

UNIVERSITE DE LILLE

Ecole doctorale Biologie-Santé (ED446)

## THESE

Pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

Spécialité : Neuroscience

Présenté par

**Manon DUQUENNE**

---

**Les tanycytes véhiculent la leptine dans le cerveau métabolique : mécanismes moléculaires et rôle dans la physiopathologie de la résistance hormonale et l'obésité/diabète**

---

Soutenue le 18 décembre 2019 devant le jury composé de :

<b>Dr. Catherine POSTIC</b>	Directeur de recherche INSERM, Paris	Président du jury
<b>Dr. Philippe CIOFI</b>	Chargé de recherche INSERM, Bordeaux	Rapporteur
<b>Dr. Julie DAM</b>	Chargé de recherche INSERM, Paris	Examinateur
<b>Dr. Jean-Sébastien ANNICKOTTE</b>	Directeur de recherche CNRS, Lille	Examinateur
<b>Dr. Gilles MITHIEUX</b>	Directeur de recherche INSERM, Lyon	Examinateur
<b>Dr. Vincent PREVOT</b>	Directeur de recherche INSERM, Lille	Directeur de thèse



# Remerciements

**J'adresse d'abord tous mes remerciements à :**

Madame le docteur Catherine Postic et Monsieur le docteur Philippe Ciofi pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Merci pour votre temps, vos commentaires et remarques.

Monsieur le docteur Gilles Mithieux, pour sa présence au sein de ce jury en tant qu'examinateur.

Madame le docteur Julie Dam et Monsieur le docteur Jean-Sébastien Annicotte d'être également mes examinateurs. Merci pour toutes nos discussions scientifiques autour de ce travail, ce fut un réel plaisir de travailler en collaboration avec vous.

**Je tiens à remercier vivement :**

Monsieur le docteur Vincent Prévot pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et encadrée mes travaux de Master et de Doctorat. Je vous suis reconnaissante de m'avoir permis de mener ce projet de recherche dans d'excellentes conditions et d'avoir pu le présenter au cours de multiples congrès. Merci pour votre confiance durant plus de cinq ans, pour votre enthousiasme et votre passion qui m'ont permis de toujours me dépasser.

**J'adresse un grand merci à mes encadrants des premiers jours :**

Madame le docteur Charlotte Vanacker, tu as certainement été la première m'accorder ta confiance et pour cela, je te serais éternellement reconnaissante. Merci pour ta gentillesse, ton soutien et ton aide tout au long de ma thèse.

Monsieur le docteur Andrea Messina, pour m'avoir permis d'acquérir une partie de ton savoir à propos de la technique de tri cellulaire, pour ton humour et ta bienveillance.

**Je remercie chaleureusement**

Mesdames les docteurs Ariane Sharif, Bénédicte Dehouck et Virginie Mattot pour leur soutien et leur regard pertinent sur mon travail.

Mesdames Anne Loyens et Danièle Mazur pour m'avoir guidé techniquement sur beaucoup de mes « manips », pour leur aide au quotidien et pour toutes nos conversations matinales.

Mes collaborateurs de choc, Madame le docteur Cintia Folgueira ainsi qu'à Anisia Silva, Marion Millet et Cyril Bourouh. Merci pour votre aide technique et scientifique très précieuse ainsi que pour votre bonne humeur pendant nos expérimentations communes.

Madame Nathalie Jouy, merci pour ton aide en cytométrie et ta gentillesse, j'ai énormément appris au cours de toutes ces après-midis au trieur.

Madame le docteur Emilie Caron et à Sarah Gallet pour leur expertise et leur disponibilité. Merci d'avoir répondu présentes quand j'avais besoin d'aide et de soutien.

Mesdames les docteurs Fanny Langlet, Eglantine Balland, Sophie Steculorum qui m'ont précédée dans la folle aventure de l'hypothalamus et des tanycytes. Merci pour vos conseils avisés et vous voir lors des congrès restent de superbes souvenirs.

***Je pourrais écrire des pages de remerciements pour l'ensemble des étudiants et postdocs du laboratoire (My lab family) :***

*Les docteurs Nadia Chachlaki, Giuliana Pellegrino, Sam Malone qui m'ont suivi depuis mes premiers pas au sein du laboratoire. Vous avez été de véritables exemples pour moi.*

*Mesdames les docteurs Maria Manfredi, Monica Imbernon et Daniela Fernandois pour tous vos conseils et votre gentillesse dans le laboratoire et en dehors. Merci pour ces soirées qui m'ont permis de décompresser.*

*Monsieur le docteur Mauro Silvia pour ta bienveillance, ta sympathie et tes petits déjeuners à l'improviste qui ont toujours su me réconforter.*

*Mesdames les docteurs Valerie Leysen et Nour Mimouni, pour tous ces bons moments partagés au cours de notre thèse. Nous l'avons fait !!*

*Mesdames Mégane Piet, Marion Martin, Tori Lhomme et Messieurs Romain Ouin, Florent Sauve et Gaëtan Ternier, merci pour toutes ces conversations et ces fous rires. Je vous souhaite encore de belles découvertes et beaucoup de bonnes ondes pour le reste de votre thèse et vos différents projets.*

*Bonne chance également aux nouveaux arrivants au laboratoire, Virginia, Eleonora, Laura et Adrian !*

*Merci à tous d'avoir rendu mon quotidien au laboratoire inoubliable.*

***Je remercie également***

*Céline Brand, Sophie Lesage, Michèle Revez et Nathalie Perrais pour leur aide au secrétariat, vous nous facilitez le quotidien et toujours avec le sourire.*

*L'équipe de l'animalerie EOPS1 pour le gros travail de gestion et entretien de nos lignées d'animaux.*

*Karim et Thomas pour nous permettre de travailler dans de bonnes conditions.*

***Je souhaiterais remercier ma famille et mes proches***

*Mes parents, mes frères, pour leur soutien sans faille tout au long de ma scolarité. Merci pour votre écoute, pour m'avoir remonté le moral dans les moments de doute et pour l'intérêt que vous avez eu pour mon travail.*

*Mes grands-parents, tantes et oncles pour toutes leurs attentions, j'espère vous rendre fiers à travers cette thèse.*

*Enfin, je remercie infiniment Pasquale d'avoir soutenu la grande stressée que je suis. Merci pour ton amour et d'avoir cru en moi depuis le début.*

*Je vous dédis ce travail.*

Le travail que j'ai réalisé au cours de ma thèse a donné lieu aux communications scientifiques suivantes :

### Articles scientifiques

Duquenne M., Folgueira C.\*, Bourouh C.\* , Millet M.\* , Silva A.\* , Clasadonte J., Imbernon M., Caron E., Rasika S., Jouy N., Oishi A., Mazzone M., Trinquet E., Tavernier J., Ory S., Jockers R., Schwaninger M., Boehm U., Nogueiras R., Annicotte JS., Gasman S., Dam J., Prévot V. **Impairment of leptin-receptor-mediated tanycytic shuttle for blood-borne leptin into the hypothalamus causes decreased β-cell function.** En révision dans Nature Metabolism. \* These authors contributed equally to this work.

Folgueira, C., Beiroa, D., Porteiro, B., Duquenne, M., Puighermanal, E., Fondevila, M. F., Barja-Fernández, S., Gallego, R., Hernández-Bautista, R., Castelao, C., et al. **Hypothalamic Dopamine Signalling Regulates Brown Fat Thermogenesis.** *Nature Metabolism* 2019, 1 (8), 811–829. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0099-7>.

Guillebaud F\*., Duquenne M\*., Djelloul M., Pierre C., Poirot K., Roussel G., Riad S., Lanfray D., Morin F., Jean A., Tonon MC., Gaigé S., Lebrun B., Dallaporta M., Leprince J., Prevot V. and Troadec JS. **Glial endozepines reverse high fat diet-induced obesity by restoring hypothalamic sensitivity to peripheral leptin.** Soumis dans Molecular Metabolism \* These authors contributed equally to this work.

Duquenne M., Dehouck B., Prevot V. **Programming the Brain from the Womb: Maternal Obesity Perturbs the Hypothalamic Blood-Brain Barrier,** *Endocrinology*, Volume 157, Issue 6, 1 June 2016, Pages 2201–2203, <https://doi.org/10.1210/en.2016-1262>

### Articles scientifiques en préparation

Vanacker C\*, Duquenne M\*, Messina A, Mazur D, Hrabovszky E, Pfrieger F.W, Giacobini P, Prevot V. **Calcium-dependent exocytosis in GnRH neurons is required for sexual maturation and body weight homeostasis but not hypothalamic targeting in female mice.**\* These authors contributed equally to this work.

### Communications dans le cadre de congrès nationaux et internationaux

#### *Communications orales*

- **Manon DUQUENNE**, Cintia FOLGUEIRA, Cyril BOUROUH, Marion MILLET, Anisia SILVA, Emilie CARON, Jérôme CLASADONTE, Franck W PFRIEGER, Ruben NOGUEIRAS POZO, Jean-Sébastien ANNICOTTE, Stéphane GASMAN, Julie DAM, Vincent PREVOT *Implication of leptin receptors expressed in hypothalamic tanycytes in the central control of energy homeostasis* - Ecole thématique de EGID, 2-4 octobre 2019
- **Manon DUQUENNE**, Cintia FOLGUEIRA, Cyril BOUROUH, Marion MILLET, Anisia SILVA, Emilie CARON, Jérôme CLASADONTE, Franck W PFRIEGER, Ruben NOGUEIRAS POZO, Jean-Sébastien ANNICOTTE, Stephane GASMAN, Julie DAM, Vincent PREVOT *Implication of leptin receptors expressed in hypothalamic tanycytes in the central control of energy homeostasis* – Think Tank EGID 27 juin 2019

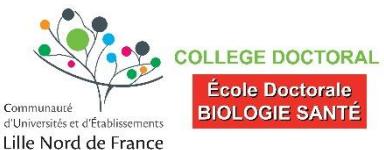
- **Manon DUQUENNE**, Emilie CARON, Jérôme CLASADONTE, Frank W. PFRIEGER, Vincent PREVOT *A role for tanycyte exocytosis in the central control of energy homeostasis?* 42e Colloque de la Société de Neuroendocrinologie à Dijon (FRANCE), le 20 septembre 2017 – Prix de la meilleure présentation orale
- **Manon DUQUENNE**, Emilie CARON, Jérôme CLASADONTE, Frank W. PFRIEGER, Vincent PREVOT *A role for tanycyte exocytosis in the central control of energy homeostasis?* Invitée au Workshop 1: “Disorders and Diseases Associated with Weight Loss” of Keystone Symposia: Neuronal Control of Appetite, Metabolism and Weight, Copenhagen (DENMARK) le 10 mai 2017

#### *Communications affichées*

- **Manon DUQUENNE**, Cintia FOLGUEIRA, Cyril BOUROUH, Marion MILLET, Anisia SILVA, Emilie CARON, Jérôme CLASADONTE, Franck W PFRIEGER, Ruben NOGUEIRAS POZO, Jean-Sébastien ANNICKOTTE, Stéphane GASMAN, Julie DAM, VINCENT PREVOT *Implication of leptin receptors expressed in hypothalamic tanycytes in the central control of energy homeostasis* - Ecole thématique de EGID, 2-4 octobre 2019
- **Manon DUQUENNE**, Emilie CARON, Jérôme CLASADONTE, Frank W. PFRIEGER, Vincent PREVOT "Both expression of the leptin receptor and synaptobrevins 1-3 activity in tanycytes are involved in the central control of energy homeostasis" Keystone Symposia: Drivers to Type 2 Diabetes - From gene to Environment Seoul (SOUTH KOREA) le 10 octobre 2018
- **Manon DUQUENNE**, Emilie CARON, Frank W. PFRIEGER, Vincent PREVOT "A role for tanycyte exocytosis in the central control of energy homeostasis?" 41<sup>e</sup> Colloque de la Société de neuroendocrinology, le 7 octobre 2016

## Résumé

**Titre :** Les tanocytes véhiculent la leptine dans le cerveau métabolique : mécanismes moléculaires et rôle dans la physiopathologie de la résistance hormonale et l'obésité/diabète

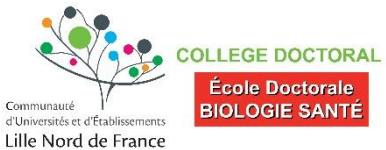


**Mots clés :** Leptine, Hypothalamus, Tanocyte, Obésité, Diabète

Le contrôle de la balance énergétique, permettant le maintien de la masse corporelle nécessite un dialogue continu entre la périphérie et l'hypothalamus dans le cerveau. L'accès des hormones périphériques à cette structure cérébrale est essentiel au bon fonctionnement des circuits neuronaux qui régule l'homéostasie énergétique. Toutefois, peu d'éléments concernant sur les mécanismes de transport de ces signaux métaboliques à l'hypothalamus sont actuellement connus. L'éminence médiane, une structure hypothalamique formant le plancher du 3<sup>e</sup> ventricule, contient des cellules épendymogliales hautement spécialisées appelées tanocytes. Il a été démontré que les tanocytes transportent les signaux métaboliques tels que la leptine jusqu'au liquide céphalorachidien par un mécanisme de transcytose. Identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans ce transport est essentiel à notre compréhension au phénomène de résistance centrale aux hormones, observé chez les patients obèses et aux patients atteints d'un diabète de type 2. Au cours de ma thèse, après l'infusion d'une protéine de fusion recombinante (TAT-Cre) dans le 3<sup>e</sup> ventricule d'un modèle de souris floxées pour le gène codant pour les récepteurs à la leptine (LepR(IoxP/IoxP)), nous avons étudié le rôle des LepR dans les tanocytes dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique chez la souris. Nos résultats montrent que la perturbation de l'expression des LepR sélectivement dans les tanocytes entraîne une augmentation de la masse corporelle, de l'adiposité, de la cholestérolémie, de la triglycéridémie et une diminution de la concentration sérique en noradrénaline. Ceci est associé avec une augmentation de la prise alimentaire, une diminution de la sensibilité périphérique à la leptine sans affecter la sensibilité centrale ainsi qu'un développement progressif d'intolérance au glucose. L'activité du pancréas et du tissu adipeux de notre modèle est également affectée. En parallèle, nous avons étudié les mécanismes sous-jacents à l'action anorexigénique des endozépines. Nos résultats que les endozépines activent la voie de signalisation ERK, nécessaire au transport de la leptine dans le cerveau, au sein de tanocytes en culture et que ces molécules ont besoin de l'expression tanocytaire des LepR pour permettre la phosphorylation de STAT3 dans l'hypothalamus. Enfin, nous avons analyser l'effet de l'expression de la neurotoxine botulique de sérotype B (BoNTB) dans les tanocytes sur le contrôle de l'homéostasie énergétique, grâce à l'infusion de TAT-Cre dans le « e » ventricule du modèle BoNT/B(IoxP-STOP-IoxP). La BoNTB inactive, grâce à un clivage protéolytique, les synaptobrénives 1-3 et altère l'exocytose associé à ces protéines. Nos résultats montrent la perturbation de l'activité de ces protéines dans les tanocytes affecte la prise alimentaire, la sensibilité à la leptine et la tolérance au glucose, comme dans le précédent modèle animal. Toutefois, nous avons constaté des différences concernant l'activité du pancréas et du tissu adipeux. L'ensemble de ces données démontre pour la première fois, le rôle clé des tanocytes hypothalamiques dans la régulation du métabolisme énergétique *in vivo*, ainsi que l'implication de l'expression des LepR dans les tanocytes dans l'activité de la leptine et des endozépines dans le cerveau métabolique.

## Abstract

**Titre:** Tanyocytes shuttle leptin into metabolic brain: molecular mechanisms and role in hormonal resistance physiopathology and diabetes



**Key Words:** Leptin, Hypothalamus, Tanyocyte, Obesity, Diabetes

The control of energy balance that allows for the maintenance of body mass requires a continued dialogue between the periphery and the hypothalamus in the brain. The access of peripheral hormones to that structure is essential to the proper functioning of neural circuits that regulate energy balance. However, little is known about the transport mechanisms of circulating metabolic signals into the hypothalamus. The median eminence, a hypothalamic structure forming the floor of the 3<sup>rd</sup> ventricle, contains specialized ependymoglia cells called tanyocytes. Tanyocytes have been shown to shuttle metabolic signals such as leptin into the cerebrospinal fluid, via transcytosis. Identifying the molecular mechanisms involved in this transport is essential to our understanding of the phenomenon of central hormone resistance found in obese and type 2 diabetes patients. During my thesis, after an infusion of a recombinant fusion protein (TAT-Cre) into the 3<sup>rd</sup> ventricle of leptin receptor gene-floxed mouse model (LepR(loxP/loxP)), we investigated the role of the LepR in tanyocytes on the central control of energy homeostasis in mice. Our results show that selectively impairing LepR expression in tanyocytes increases body weight, adiposity, cholesterolemia, triglyceridemia and decreases noradrenaline serum concentration. It's associated with an increase of food intake, peripheral but not central leptin anorectic effect and glucose intolerance. Pancreas and adipose tissue activity of our model is also affected. In parallel, we studied the mechanisms underlying the anorexigenic action of endozepines. Our results show that endozepines induce ERK activation necessary for leptin transport into the brain in primary culture of tanyocytes and require tanyctic LepR expression to promote STAT3 phosphorylation in the hypothalamus. Finally, we also investigated the effect of the expression of the type B botulinum neurotoxin BoNTB, in tanyocytes on the central control of energy homeostasis in mice. BoNTB inactivates synaptobrevins 1-3 by proteolytic cleavage and thus alters synaptobrevin-mediated exocytosis. Our results show that selectively impairing synaptobrevin function in tanyocytes affects as in the previous model the basal food intake, leptin sensitivity and glucose tolerance in mice. However, we noticed some differences in pancreas activity compared to the model in which we selectively impaired LepR expression in tanyocytes. Altogether, these data demonstrate for the first time the key role of tanyocytes in the central control of energy regulation *in-vivo* and the involvement of LepR expression in tanyocytes for circulating leptin and endozepines action in the metabolic brain.

*« Dans la communication, le plus compliqué n'est ni le message, ni la technique, mais le récepteur. »*

Dominique Wolton



# Table des matières

Résumé .....	6
Abstract .....	7
Table des matières .....	10
Liste des abréviations .....	15
Liste des figures .....	18
INTRODUCTION .....	20
Chapitre 1 : Obésité et diabète, les conséquences d'une dérégulation de la balance énergétique .....	22
I. Définitions, épidémiologie et conséquences .....	22
1. L'obésité .....	22
2. Le diabète .....	22
3. Conséquences socio-économiques de l'obésité et du diabète .....	23
II. Facteurs impliqués dans le développement du diabète et de l'obésité .....	23
1. Facteurs environnementaux .....	23
1.1. Alimentation .....	24
1.2. Environnement périnatal .....	24
1.3. Sommeil .....	25
1.4. Stress .....	25
2. Facteurs génétiques .....	25
III. La régulation de la balance énergétique .....	26
1. Les signaux régulateurs de la prise alimentaire à court terme .....	27
2. Centres intégrateurs et régulateurs des signaux métaboliques à court terme .....	28
3. Les signaux régulateurs de la prise alimentaire à long terme .....	28
4. Les centres intégrateurs et régulateurs des signaux métaboliques à long terme .....	28
4.1. L'hypothalamus .....	28
4.2. Le noyau arqué et les neurones du premier ordre .....	29
4.3. Les neurones du second ordre et le système à mélanocortine .....	30
5. La régulation des dépenses énergétiques .....	32
IV. La leptine et ses récepteurs : acteurs majeurs de la régulation de l'homéostasie .....	33
1. Structure et production de la leptine .....	33
2. La structure des récepteurs à la leptine .....	34
3. La signalisation des récepteurs à la leptine .....	35
3.1. Signalisation JAK/STAT3 .....	35
3.2. Signalisation SHP2/MAPK .....	36
3.3. Signalisation JAK2/PI3K/Akt .....	36
3.4. Signalisation AMPK .....	37

4. Les récepteurs à la leptine : expression et rôle dans la régulation centrale du métabolisme énergétique.....	38
4.1. Cartographie de l'expression du LepRb dans le cerveau .....	38
4.2. Rôle des neurones LepRb de l'ARC dans la régulation centrale du métabolisme énergétique.....	39
4.3. Rôle des neurones LepRb des VMH et DMH .....	39
4.4. Rôle des neurones LepRb dans la LHA.....	40
4.5. Rôle des neurones LepRb dans le PVH.....	40
4.6. Rôle des neurones LepRb dans les structures extrahypothalamiques .....	40
5. Rôle des récepteurs à la leptine dans d'autres phénomènes physiologiques.....	41
5.1. Mémoire .....	41
5.2. Reproduction .....	41
5.3. Métabolisme osseux .....	41
5.4. Système immunitaire .....	42
V. La résistance à la leptine : contribution au développement de l'obésité.....	42
1. Résistance à la leptine endogène ou exogène ?.....	43
2. La résistance à la leptine est sélective .....	43
3. Perte du transport de la leptine au cerveau .....	44
4. Modification de la signalisation liée au LepRb.....	44
4.1. Signal inhibitor suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3).....	45
4.2. Les protéines tyrosine phosphatases (PTPs).....	45
4.3. Rôle de l'inflammation .....	45
4.4. Rôle du stress du réticulum endoplasmique .....	46
Chapitre 2 : La communication cerveau-périphérie dans la régulation du métabolisme énergétique.....	49
I. Généralités sur le système nerveux autonome .....	49
II. Régulation de l'homéostasie glucidique par le système nerveux autonome .....	50
1. Communication avec le foie .....	50
2. Communication avec le pancréas .....	51
3. Communication avec le muscle.....	52
III. Régulation de l'homéostasie lipidique par le système nerveux autonome .....	53
IV. Régulation de la dépense énergétique par le système nerveux autonome .....	55
1. Rôle du tissu adipeux brun .....	55
2. Rôle du muscle .....	56
Chapitre 3 : Les barrières du système nerveux central, protection et communication ? .....	57
I. Éléments en charge de la protection du cerveau vis-à-vis du contenu sanguin .....	58
1. Au sein de la barrière hématoencéphalique (BHE) .....	58
1.1. Les jonctions serrées de la barrière hématoencéphalique .....	59
1.2. La structure des vaisseaux de la barrière hématoencéphalique .....	59

2. Au sein de la barrière hématocérébroventriculaire (BHCV) .....	60
2.1. Au niveau des plexus choroïdes .....	61
2.2. Au niveau des organes circumventriculaires.....	62
II. Éléments en charge de la communication entre le sang et le cerveau dans les différents types de barrières cérébrales .....	63
1. Au sein de la barrière hématoencéphalique (BHE) .....	63
1.1. Le transport médié par les lipides.....	63
1.2. Le passage médié par un transporteur.....	63
1.3. Le passage actif médié par un transporteur couplé à l'ATP .....	63
1.4. Le passage par transcytose .....	64
2. Au niveau de la barrière hématocérébroventriculaire (BHCV).....	64
2.1. Au niveau des plexus choroïdes .....	65
2.2. Au niveau des organes circumventriculaires.....	67
Chapitre 4 : L'éminence médiane et les tanocytes, acteurs de l'interface sang/hypothalamus dans la régulation du métabolisme énergétique .....	69
I. Description anatomique de l'interface sang/hypothalamus .....	69
1. La circulation sanguine de l'interface sang/hypothalamus .....	69
2. Les vaisseaux de l'interface sang/hypothalamus.....	69
3. L'épendyme de l'interface sang/hypothalamus.....	70
3.1. Les cellules épendymales cubiques.....	70
3.2. Les tanocytes .....	70
II. Implication des tanocytes dans la régulation du métabolisme énergétique .....	72
1. La plasticité de la BHCV de l'hypothalamus médiobasal.....	72
2. Le contrôle de la sécrétion neuroendocrine de TRH.....	73
3. La plasticité tanyctaire impliquée dans la saisonnalité .....	74
4. Les tanocytes en tant que senseurs métaboliques.....	74
5. Les tanocytes, cellules progénitrices neurales .....	75
6. Les tanocytes en tant que transporteurs des hormones : accent sur la leptine .....	77
7. Les tanocytes et résistance à la leptine .....	79
Objectifs .....	81
RESULTATS .....	82
Etude 1 : Impact de l'obésité maternel sur le développement de la structure de l'éminence médiane .....	84
I. Introduction.....	84
II. Résultats .....	85
III. Références.....	88
Etude 2 : Le rôle des récepteurs à la leptine (LepR) dans le transport tanyctaire de la leptine .....	90
I. Introduction.....	90

II.	Résultats .....	92
1.	LepR is expressed and active in tanocytes of the median eminence .....	92
2.	EGFR-mediated LepR signaling is required for the transcellular trafficking of leptin in tanocytes .....	97
3.	Mice lacking LepR in adult tanocytes show increased weight gain linked to restricted access of blood-borne leptin to the hypothalamus .....	103
4.	Mice lacking LepR in tanocytes sequentially develop insulin resistance and defective insulin-secretory capacity.....	110
5.	Impaired access of leptin to the hypothalamus could mediate central effects on glucose and lipid metabolism through altered melanocortin signaling and sympathetic tone	
	116	
III.	Matériel et Méthodes .....	116
Etude 3 : Implication des endozépines centrales dans l'amélioration de phénotype d'obésité induit par un régime gras.....		127
I.	Introduction.....	127
II.	Résultats .....	129
1.	ODN is Expressed by Glial Cells in Brain Structures Related to Food Intake .....	129
2.	DBI Transcripts are enriched in tanocytes bordering the 3V and the 4V.....	131
3.	Endozepines Modify Food Intake and Meal Patterns.....	133
4.	OP Targets Prototypical Anorexigenic Neuronal Pathways .....	135
5.	Chronic OP Treatment Reverses HFD-induced Obesity.....	138
6.	OP Fails to Reduce Food Intake and to Improve Glucose Homeostasis in Obese, Leptin- deficient Mice.....	143
7.	OP Induces STAT3 Phosphorylation in Leptin-sensitive Hypothalamic Neurons in HFD- induced, but Not Leptin-deficient, Obese Mice .....	146
8.	OP Enhances Central Sensitivity to Peripheral Leptin.....	146
9.	Glucose and Insulin Regulate Tanyctic ODN Secretion.....	148
10.	OP Stimulates Tanycyte-mediated Leptin Transport.....	151
III.	Materials and Methods .....	153
IV.	References .....	161
RESULTATS SUPPLEMENTAIRES .....		168
Rôle de l'exocytose dépendante des synaptobrévines 1-3 (VAMP1-3) dans le relargage de la leptine par les tanocytes hypothalamiques .....		170
I.	Introduction.....	170
II.	Résultats .....	171
1.	L'altération du trafic vésiculaire des tanocytes <i>in vivo</i> émousse l'accès de la leptine à l'ARH .....	171
2.	L'expression de BoNT/B dans les tanocytes provoque une intolérance au glucose et une intolérance à l'insuline.....	175
3.	L'expression de la BoNT/B dans les tanocytes, amplifie l'effet du régime gras .....	178
III.	Matériel et Méthodes .....	179

DISCUSSIONS .....	184
Etude 1 : Impact de l'obésité maternel sur le développement de la structure de l'éminence médiane .....	186
Etude 2 : Le rôle des récepteurs à la leptine (LepR) dans le transport tanyocytaire de la leptine .....	187
Etude 3 : Implication des endozépines centrales dans l'amélioration de phénotype d'obésité induit par un régime gras.....	190
Discussion sur les résultats supplémentaires.....	194
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES .....	196
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	202

# Liste des abréviations

ACC : Acétyl-CoA carboxylase	DBI : Diazépam Binding Inhibitor/Inhibiteur de liaison des diazépam
ACTH : Adrénocorticotropine	Dio : Deiodinase
AgRP : Protéine reliée à la protéine Agouti/Agouti-related protein	DIO: Régime induisant l'obésité (Régime gras) /Diet induced obesity
AKT ou PKB : Protéine kinase B	DMH : Hypothalamus dorsomédial
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	DMV : Noyau dorsal moteur du vague
AMPK : Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate	DVC : Complexe vagal dorsal
AP : Area postrema	EGF : Facteur de croissance épithélial
ARC : Noyau arqué de l'hypothalamus	eIF2α : α eukaryotic translation initiation factor 2
ARCdm : Noyau arqué dorsomédian	ERK : Protéine kinase régulée par le milieu extracellulaire / extracellular-regulated protein kinase
ARCvm : Noyau arqué ventromédian	EW : Noyau Edinger-Westphal
ARN <sub>m</sub> : Acide ribonucléique messager	FAS : Acide gras synthase
ATF4 : Facteur de transcription activateur 4	FGF10 : Facteur de croissance fibroblastique 10
ATP : Adénosine tri-phosphate	FGF21 : Facteur de croissance fibroblastique 21
BAT: Tissu adipeux brun / Brown adipose tissue	FOXO : Facteur de transcription de la famille Forkhead box
BHCV : Barrière hémato-cérébro-ventriculaire	FSH : Hormone folliculostimulante
BHE : Barrière hématoencéphalique	GFAP : Glial fibrillary acidic protein
BoNT/B : Neurotoxine botulique de sérotype B	GFP : Green Fluorescent Protein/ Protéine fluorescente verte
CaMKK : Protéine Kinase Kinase dépendante du complexe Calcium-Calmoduline	GLP-1 : Glucagon-like peptide 1/ Peptide proche du glucagon
CART : Transcrit régulé par la cocaïne et l'amphétamine/ Cocaïne and amphetamine-regulated transcript	HFD : High fat diet/Régime gras
CCK : Cholecystokinine	HHG : Axe hypothalamo-hypophysogonadique
CHOP: CCAAT/enhancer-binding protein homologous	HHT : Axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien
CPE : Carboxypeptidase E	ICV : Intracérébrocentriculaire
CPT-1 : Carnitine palmitotransferase I	IGF1 : facteur de croissance de type insuline 1
CPT-A : Carnitine Palmitoyl Transferase 1	
CRH : Corticolibérine	
DT2: Diabète de type 2	

IL : Interleukine	NPY : Neuropeptide Y
IML : Noyau intermédiaire	NTS : Noyau du tractus solitaire
IRE1: inositol-requiring protein-1	ODN : Octadécaneuropeptide
IRS : Substrat au récepteur à l'insuline / Insulin Receptor Substrate	OMS : Organisation mondiale de la santé
IκKβ/NFκB: IκB Kinase β/nuclear factor-κB	OP : Octapeptide C-terminal de l'ODN
JAK : Kinase Janus	PACAP : Polypeptide d'activation de l'adénylate cyclase de l'hypophyse
JNK : c-Jun N-terminal kinase signalling	PAG : Noyaux gris péréiaqueduaux
LAN : Antagoniste des récepteurs à la leptine	PAM : Peptidyl α-amidating monooxygenase
LCFA-CoA : Acyl-CoA à acides gras à longue chaîne / Long chain fatty acids acyl-CoA	PBL : Noyau parabrachial latéral
LCR : Liquide céphalorachidien	PC : Protéines convertases
LepR : Récepteur à la leptine	PDK1: Kinase 1 Dépendante du Phosphoinositide
LH : Hormone lutéinisante	PERK: PKR-like endoplasmic reticulum kinase
LHA : Hypothalamus latéral	PI3K : Phosphoinositide-3-Kinase
LKB1 : Protéine kinase du foie B1 / Liver Kinase B1	PIP2 : Phosphoinositol 4-5 bisphosphate
MC4R : Récepteur aux mélanocortines de type 4	PIP3 : Phosphoinositol 3-4-5 triphosphate
MCH : Hormone concentrant la mélanine / Melanin concentrating hormone	PMV : Noyau prémamillaire ventral
MCR3/4 : Récepteurs aux mélanocortines/ à l'αMSH de type 3 et 4	POMC : Pro-opio-mélanocortine
MCT : Transporteur au monocarboxylate	PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxysome
MeA : Noyau médian de l'amygdale	PTP1B/PTPN1 : Phosphotyrosine phosphatase 1B
MnPO : Aire préoptique médiane	PVH : Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
MSH: Melanocyte-stimulating-hormone/ Hormone stimulant les mélanocytes	PVN : Noyau parabrachial
mTOR : Cible de la rapamycine chez les mammifères	PYY3-36 : Peptide YY
NA : Noyau accumbens	RE : Réticulum endoplasmique
NC : Normal Chow/Régime alimentaire normal	SF1 : Facteur de transcription stéroidogénique 1
NCA : Noyau central de l'amygdale	SH : Domaine d'homologie Scr
NOS : Synthétiseur d'oxyde nitrique / Nitric Oxide Synthase	SH2B1 : Protéine adaptatrice contenant un domaine SH2
	Shh : Ligand de la signalisation Hedgehog
	SNA : Système nerveux autonome

**SNARE** : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) Attachment protein Receptor

**SOCS** : Supresseur de signal aux cytokines

**Sox2** : SRY-related HMG-box gene 2

**SPRR1A** : Cornifine A

**STAT** : Signal transactivateur de la transcription

**SGZ** : Zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe

**SVZ** : Zone sous-ventriculaire du ventricule latéral

**T3**: Triiodothyronine (forme active)

**T4**: Thyroxine

**TAT** : Trans-activator of Transcription

**TH** : Tyrosine Hydrolase

**TLR4** : Toll like receptor 4

**TRH** : Hormone thyréotrope

**Trhde** : Enzyme capable de dégrader la TRH

**Trhde** : Enzyme de dégradation de la TRH

**TRPV1** : Transient receptor potential vanilloid 1

**TSH**: Thyréostimuline

**Tyr** : Résidu tyrosine

**UCP-1** : Protéine découplante 1

**UPR** : Unfold protein response

**VAMP** : Vesicule-associated-membrane-protein / Synaptobrénine

**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor

**VIP** : Vasoactive intestinal peptide

**VMH** : Hypothalamus ventromédial

**VTA** : Aire tegmentale ventrale

**WAT** : Tissu adipeux blanc / White adipose tissue

# Liste des figures

## Chapitre 1

Figure 1: Représentation schématique de la régulation de l'homéostasie énergétique et les facteurs influant sur son activité

Figure 2 : La régulation de la prise alimentaire sur le court et le long terme

Figure 3 : Projection dans l'hypothalamus

Figure 4 : Les différentes isoformes des récepteurs à la leptine

Figure 5 : La signalisation intracellulaire liée à l'activation des récepteurs à la leptine

Figure 6 : Schéma résumant les processus impliqués dans l'inflammation intracellulaire et du stress du réticulum induits par le régime gras à court et long terme dans le développement de la résistance à la leptine et de l'obésité

## Chapitre 2

Figure 7 : Le système nerveux autonome

Figure 8 : Résumé des actions de la leptine dans l'hypothalamus et les réponses autonomes associées au niveau des organes périphériques

## Chapitre 3

Figure 9 : Représentation schématique des différentes barrières sang/cerveau

Figure 10 : Schéma de l'unité neurovasculaire

## Chapitre 4

Figure 11 : Schéma représentant l'organisation de l'interface sang/cerveau au niveau de l'hypothalamus médo-basal

Tableau résumant les différents marqueurs détectés dans les tanocytes permettant de suggérer leur rôle en tant que cellules neurogéniques

Figure 12 : Photographies montrant l'internalisation de la ghréline et de la leptine fluorescente par les tanocytes de l'éminence médiane suite à leur injection dans le sang

Figure 13 : Schéma résumant le transport de la leptine par les tanocytes.

## Résultats supplémentaires

Figure 14 : Résumé du rôle des protéines SNAREs dans la fusion des membranes vésiculaires et membranaires lors du processus d'exocytose.



# INTRODUCTION



# Chapitre 1: Obésité et diabète, les conséquences d'une dérégulation de la balance énergétique

## I. Définitions, épidémiologie et conséquences

### 1. L'obésité

Le surpoids et l'obésité se définissent comme une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle susceptible de nuire à la santé. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) déclare qu'en 2016, plus de 1,9 milliard d'adultes (39% des plus de 18 ans) se trouvaient en surpoids, dont 650 millions d'obèses (13% de la population adulte). La prévalence de l'obésité touche presque autant les femmes que les hommes adultes (40% et 39% respectivement). Elle a, pour ainsi dire, triplé au niveau mondial entre 1975 et 2016. À l'échelle mondiale, il y a plus de décès liés au surpoids et l'obésité qu'à l'insuffisance pondérale (Principaux repères sur l'obésité et le surpoids, <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>).

La mesure la plus répandue pour estimer le surpoids ou l'obésité est l'indice de masse corporelle (IMC). Il se détermine par le ratio entre le poids et le carré de la taille (en kg/m<sup>2</sup>). Pour l'adulte, l'OMS définit le surpoids et l'obésité de la manière suivante : le surpoids correspond à un IMC supérieur ou égal à 25 et l'obésité à un IMC supérieur à 30.

La cause principale de l'obésité et du surpoids est un déséquilibre énergétique entre la quantité de calories ingérée et dépensée. En effet, l'augmentation de la consommation d'aliments très caloriques, dont l'accès est facilité, et la diminution de l'activité physique ont été observées au niveau mondial à cause d'un mode de vie plus sédentaire et une rapide urbanisation. Le développement de l'obésité augmente le risque de contracter un certain nombre de maladies chroniques telles que des maladies cardiovasculaires, diabète, troubles musculosquelettiques comme l'arthrose ou encore certains cancers (de l'endomètre, du sein, des ovaires, de la prostate, du foie, de la vésicule biliaire, du rein et du colon).

L'OMS reconnaît l'obésité comme étant un problème de santé mondiale et développe un certain nombre de stratégies ou plans afin de réduire l'exposition de la population à ces maladies non transmissibles et associées directement à l'augmentation de l'IMC (Stratégie mondiale de l'OMS pour l'alimentation, l'exercice physique et la santé, adoptée en 2014 ; le Plan d'action pour la lutte contre les maladies non transmissibles 2013-2020, adopté en 2011).

### 2. Le diabète

Selon l'OMS, le diabète est défini comme une maladie chronique caractérisée par une hyperglycémie, c'est-à-dire un taux de sucre dans le sang supérieur à 1,26g/l après un jeûne de 8 heures. Le pancréas des patients atteints de cette pathologie ne produit pas assez d'insuline ou cette hormone n'est pas bien utilisée par l'organisme. En 2014, la population mondiale comptait au moins 8,5% de diabétiques. Le diabète a causé le décès de 1,6 million de personnes en 2015 à travers le monde.

La seule méthode de diagnostic de la maladie à un stade précoce est la mesure de la glycémie à jeun. Si cette dernière se situe entre 1,10 et 1,26 g/L de sang, le patient est considéré comme prédiabétique. Si la glycémie dépasse 1,27g/l lors de 2 dosages successifs, le diabète est déclaré.

Il existe 2 types de diabètes. Le diabète de type 1 (ou diabète insulinodépendant ou juvénile) est caractérisé par une production insuffisante d'insuline par le pancréas et nécessite une administration quotidienne d'insuline. La cause principale est une destruction des cellules β du pancréas par des anticorps ou des lymphocytes. Le diabète de type 2 peut résulter quant à lui de

deux problèmes : le pancréas continue de fabriquer de l'insuline, mais en quantité insuffisante pour maintenir une glycémie normale (insulinopénie) ou une mauvaise utilisation de l'insuline par l'organisme (insulinorésistance). Ce type 2 constitue la majeure partie des diabètes rencontrés dans le monde. Contrairement au type 1, il est étroitement associé à la surcharge pondérale. En effet, près de 80% des diabétiques de type 2 sont obèses ou en surpoids, mais il est important de rappeler que « seuls » 20 à 30% des obèses deviennent diabétiques (*Bernard et al., 2013*). L'activité du tissu adipeux étant très dépendante de l'insuline, plus la quantité de masse graisseuse est importante, plus l'organisme a besoin de cette hormone pour maintenir son fonctionnement. Ainsi, une personne obète a 3 fois plus de risques d'être diabétique qu'une personne présentant un IMC « normal ». Maladie chronique et multifactorielle, c'est sur le long terme que le diabète entraîne des complications et augmente les risques de développer certaines autres maladies. Parmi elles, nous comptons par exemple, l'augmentation du risque de souffrir d'accidents cardiaques ou vasculaires cérébraux, la rétinopathie ou encore l'insuffisance cardiaque. Ces symptômes ne sont pas visibles aux prémices de la maladie, ce qui rend son diagnostic compliqué augmentant la difficulté de la traiter. Il existe un lien entre l'obésité et le diabète.

En matière de prévention, l'OMS recommande aux patients atteints de cette maladie de limiter la prise du poids grâce à une alimentation saine associée à de l'exercice physique. En effet, les déséquilibres nutritionnels concomitants au mode vie sédentaire participent également à la prévalence du diabète de type 2 (Sources : principaux repères sur le diabète ; <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> + <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/diabete-type-2>).

### **3. Conséquences socio-économiques de l'obésité et du diabète**

Les coûts financiers dus au surpoids, l'obésité et le diabète sont très conséquents que cela soit les coûts directs (traitements et prise en charge des pathologies) ou indirects (arrêt de travail, baisse de productivité au travail). L'OMS estime le coût direct annuel de l'obésité et du diabète supérieur à 827 milliards de dollars.

## **II. Facteurs impliqués dans le développement du diabète et de l'obésité**

Nous savons maintenant que la cause principale du développement de l'obésité et du diabète de type 2 est un déséquilibre entre la quantité d'énergie absorbée et utilisée. Si les mécanismes de régulation de la balance énergétique vont être abordés plus loin dans le texte, de nombreuses études ont pu montrer l'implication et l'interaction de plusieurs facteurs génétiques et non génétiques (environnementaux) dans ce développement. Chez l'Homme, les premières études de patients atteints de maladies héréditaires ou présentant des mutations ponctuelles ont permis de faire le lien entre les facteurs génétiques et la gravité de la maladie. Plus tard, l'utilisation d'outils comme les modèles animaux génétiquement modifiés, permettant des approches plus ciblées (perturbation d'un gène, d'un tissu ou organe spécifique), a permis de mettre en évidence des polymorphismes, des liaisons génétiques impliquées dans l'obésité et le diabète, enrichissant les connaissances sur les mécanismes impliqués dans ces pathologies.

### **1. Facteurs environnementaux**

L'implication du mode de vie de l'individu semble évidente quand la principale source de prise de poids ou d'obésité est un déséquilibre entre prise alimentaire et dépense énergétique. De nombreuses méta-analyses ont montré que l'environnement, dans lequel un individu évolue, a un impact significatif dans le risque de développer une obésité (*Papas et al., 2007*). Selon l'étude de Neels, l'obésité et le diabète semblent être des maux associés à une mauvaise adaptation de l'Homme au monde moderne, génétiquement « programmé » à faire face à des périodes de famine.

C'est ce que l'on appelle le génotype de l'économie d'énergie (Neels et al., 1962). La moindre augmentation de prise alimentaire devait servir à augmenter les stocks énergétiques en prévision des « périodes de vache maigre ». Mais depuis le développement industriel, l'accès à la nourriture est plus simple et ce qui était un avantage évolutif devient un facteur de risque d'exposition à des maladies métaboliques.

### 1.1. Alimentation

Même si la probabilité de famine dans les pays développés était faible au début des années 2000, le nombre de calories ingérées par jour et par individu a augmenté de manière significative en comparaison aux années 70 (2618 kcal/jour en 2000 contre 2450 kcal/jour entre 1971 et 1974). Cette augmentation a davantage affecté les femmes que les hommes aux États-Unis (Données de la National Health and Nutrition Examination Survey en 2004). Si la quantité de calories est à prendre en considération, la qualité de la nourriture ingérée l'est tout autant. La nourriture industrielle, hautement transformée et néfaste, est plus riche en graisses, sucres et pauvre en fibres. Elle contribue à un mauvais maintien de la masse corporelle. La nourriture grasse est plus palatable pour l'Homme et le rongeur, encourageant l'individu à manger davantage (Berthoud, 2012). Les graisses contiennent également plus de calories, ce qui accentue le problème. Toutefois, certains régimes alimentaires particulièrement riches en acides gras insaturés, comme les omégas 3 (type méditerranéens) sont considérés comme protecteurs à l'excès de poids. Il est donc difficile de faire la différence entre l'impact du gras et des sucres sur le risque de prise de poids. D'autant que l'excès de sucre est stocké dans l'organisme sous forme de gras. Constituant la principale source d'énergie dans l'alimentation moderne, les carbohydrates sont connus pour favoriser le développement de l'obésité. Chez la femme, la simple et courte restriction en sucre peut contribuer à la perte de poids (Gardner et al., 2007). Les fibres quant à elles pourraient avoir un effet positif sur le maintien d'une masse corporelle stable, en augmentant la satiété de l'individu grâce à une distension gastrique plus importante (sensation d'avoir l'estomac plein) et une digestion incomplète de ces éléments (Howarth et al., 2001). Il est également important de noter que les effets délétères de l'alimentation grasse et sucrée peuvent être exacerbés par un manque d'activité physique (Schoeller et al., 1998).

### 1.2. Environnement périnatal

En étudiant le comportement des oiseaux, Konrad Lorenz a décrit, dans les années 1970, le concept de « période critique » ou « période sensible ». C'est-à-dire qu'un stimulus environnemental se présentant durant une période déterminée du début de la vie peut entraîner une empreinte définitive sur un individu. Autrement dit, cela peut impacter son comportement global dans le futur ou la réaction de son organisme face à son environnement, et ce, tout au long de sa vie (Lorenz, 1970 ; Bornstein, 1989). Si plusieurs moments de la vie ont été décrits comme tels, l'environnement périnatal est une période critique pour les animaux comme les humains. La plus grande partie des organes se développent et deviennent matures, au cours de la gestation et des 2 premières années de vie. Par exemple, le pic de neurogenèse a lieu au cours de la 20<sup>e</sup> semaine de gestation, la fin de la multiplication des cellules gliales, au cours de la 2<sup>e</sup> année de vie chez l'Homme (Dobbing et al., 1970). Après avoir observé que les adultes qui ont présenté une masse corporelle supérieure ou égale à 12,3 kg, à l'âge d'un an, avaient un risque de mortalité plus faible que ceux qui au même âge pesaient 8,2 kg, Barker en a conclu que la croissance et la nutrition au cours de la première année de vie avaient un impact sur la santé à l'âge adulte (Barker, 1990). Par la suite, plusieurs autres études ont montré que la malnutrition périnatale (faible ou importante prise de poids) pouvait être à l'origine de l'obésité (Oken et al., 2003, Rolland-Cachera et al., 2013), la résistance à l'insuline et le diabète (Eriksson et al., 2002), l'hypercholestérolémie (Kuzawa et al., 2003), l'hypertension artérielle (Adair et al., 2005) et un risque élevé de maladie

cardiovasculaire (Leon et al., 1998 ; Huxley et al., 2007). Enfin, le stress maternel durant la grossesse a également été considéré comme délétère dans le développement du syndrome métabolique (Barker et al., 1990).

#### 1.3. Sommeil

Tant la qualité que la quantité de sommeil sont des facteurs essentiels pour maintenir un poids constant (Kim et al., 2012). Il a été montré que les personnes qui dorment moins de 7 heures par nuit présentent un IMC plus important comparé à ceux qui dorment entre 7 et 8 heures par nuit (Patel et Hu, 2008 ; Cedernaes et al., 2015). Le lien entre obésité et sommeil pourrait s'expliquer par la perturbation de la sécrétion des hormones régulant la satiété (augmentation de la présence d'hormones augmentant la prise alimentaire et diminution des signaux de satiété dans le sang ; Spiegel et al., 2004) et une altération de la thermogenèse (Jung et al., 2011 ; Markwald et al., 2013).

#### 1.4. Stress

De nombreuses études ont montré une association entre le stress avec la prise de poids ou l'adiposité. La probabilité qu'un tel lien existe est augmentée si le patient est déjà en surpoids (Dallman et al., 2005 ; Torres and Nowson, 2007) ou s'il présente de fortes concentrations de glucose ou d'insuline circulantes (Rajita and Jastreboff, 2013). Les changements dans les comportements alimentaires comme lors de l'altération de la réponse motivée par la prise alimentaire peuvent être à l'origine de ce phénomène. Toutefois, ils sont dépendants de beaucoup d'autres paramètres et sont difficiles à décrire comme la composante émotionnelle liée à la nourriture propre à chaque individu (Alsio et al., 2012). Mais en cas de stress aigu, l'organisme répond au stimulus stressant en stimulant à la l'axe hypothalamo--hypophyso-surrénalien. Cela entraîne une augmentation de la sécrétion des glucocorticoïdes par les glandes surrénales et un dérèglement du système nerveux autonome (McEwen, 2007). L'exposition aux glucocorticoïdes entraîne une augmentation des taux plasmatiques d'hormones métaboliques et altère l'expression des neuropeptides régulant la prise alimentaire (Hanson and Dallman, 1995 ; Maniam and Morris, 2012).

## 2. Facteurs génétiques

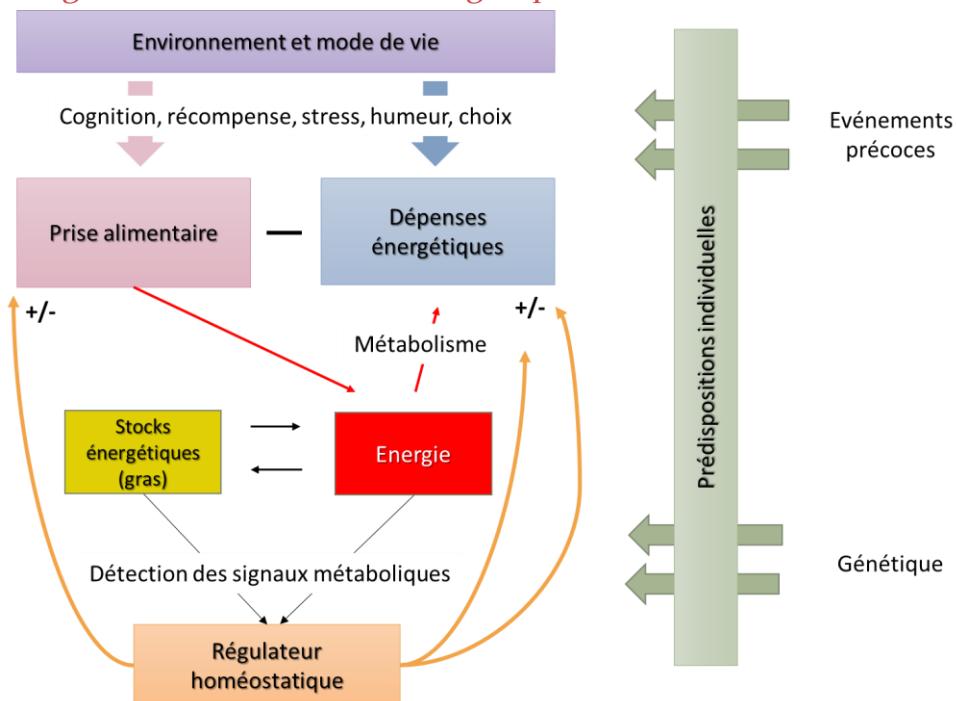
Dans la majorité des cas, la perturbation simultanée de l'expression de plusieurs gènes est nécessaire pour entraîner le développement de l'obésité. Ce sont les formes polygéniques d'obésité. Ces mutations prises individuellement n'ont pas forcément un impact sur la prise de poids, mais quand elles sont groupées, résultent en une prédisposition importante. Sous le poids de la composante environnementale, il est possible que la prise de poids puisse être plus importante. Ainsi, les individus présentant un polymorphisme du gène codant pour le récepteur  $\beta 2$  adrénergique (ADRB2 Gln27Glu) a 2,56 fois plus de chances de développer l'obésité sous un régime majoritairement composé de carbohydrates (Martinez et al., 2003).

Dans le cas des formes oligogéniques à pénétrance variable, la mutation peut toucher un groupe de protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire, comme les récepteurs. La modification, influant sur l'activité de ces protéines, perturbant la sensibilité de l'individu à son environnement. Par exemple, la mutation du récepteur aux mélancortine 4 (MC4R), de la dioxygénase dépendante à l' $\alpha$ -cétoglutarate (FTO) ou du récepteur gamma activé par l'activateur des peroxysomes (PPARG) entraîne une obésité associée à une augmentation importante de la prise alimentaire (Frayling et al., 2007 ; Loos et al., 2008 ; Altshuler et al., 2000).

Enfin, il existe des mutations génétiques qui, à elles seules, entraînent une obésité sévère sans aucune implication du comportement ou de l'environnement. Ces gènes jouent donc un rôle clé

dans la régulation du métabolisme énergétique et sont le siège de mutations monogéniques à pénétrance complète. Parfois, l'obésité monogénique peut être associée à des anomalies développementales, nous parlons dans ce cas d'obésités syndromiques. Par exemple, le syndrome de Prader-Willi ou le syndrome de Bardet-Biedl (mutations autosomiques associées à un retard mental et un hypogonadisme). Dans d'autres cas, l'obésité sévère est liée à un trouble du système endocrinien comme dans la mutation du gène codant pour la leptine (LEP) (Montague *et al.*, 1997 ; Strobel *et al.*, 1998) ou le récepteur à la leptine (DB) (Clement *et al.*, 1998).

### III. La régulation de la balance énergétique



**Figure 1 :** Représentation schématique de la régulation de l'homéostasie énergétique et les facteurs influant sur son activité (inspiré de Lenard and Berthoud, 2008)

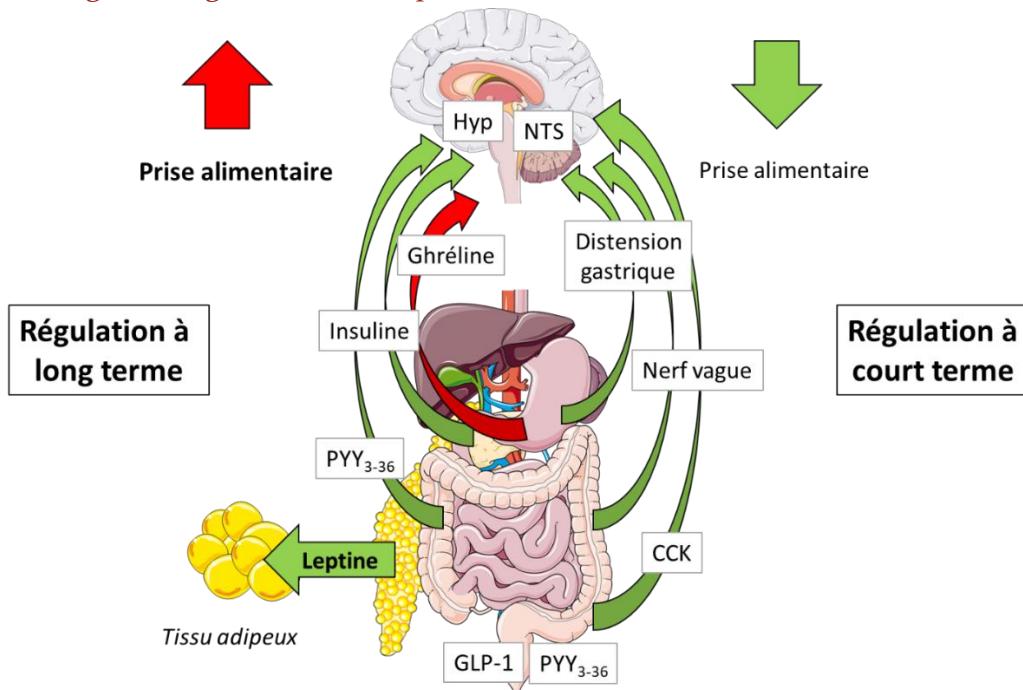
Un individu est capable d'adapter sa prise alimentaire ainsi que son niveau d'énergie dépensée en fonction de son environnement. C'est un mécanisme de survie qui permet de maintenir un équilibre énergétique, favorable au bon fonctionnement du corps, que l'on appelle aussi balance énergétique. Cet équilibre est visible macroscopiquement par un poids de consigne (« Fat mass set point »), dépendant de chacun en fonction des gènes qu'il a hérités ainsi que de l'environnement dans lequel il évolue. Elle est exprimée en calorie (cal) soit la quantité d'énergie requise pour éléver la température d'un gramme d'eau d'un degré Celsius.

Il existe 3 principales formes de source d'énergie qu'un individu peut ingérer : les glucides ou carbohydrates (4 kcal/g), les lipides (9 kcal/g) et les protéines (5 kcal/g). Quand ils ne sont pas utilisés directement par l'organisme, ces éléments sont stockés sous forme de graisses dans le tissu adipeux ou de glycogène par le foie. La dépense énergétique possède 3 composantes différentes : le métabolisme de base (énergie nécessaire à l'activité vitale, peu variable, mais dépendante de l'individu, représentant entre 60 et 75% de la production d'énergie), la thermogenèse (production de chaleur qu'elle soit postprandiale afin de permettre l'assimilation des aliments ou adaptative afin de maintenir la température corporelle constante) et l'activité physique (20-30% de la dépense énergétique, seule composante réellement variable conscientement).

L'homéostasie énergétique, définie comme le retour du métabolisme énergétique à une valeur bénéfique pour l'organisme, est un mécanisme stable et robuste. Un individu avec un IMC « normal » est protégé d'une prise de poids excessive lors d'un écart alimentaire (Sims *et al.*, 1973). Cela indique qu'un certain nombre de mécanismes biologiques centraux et périphériques protègent de la prise de poids. Ces mécanismes répondent à l'intégration de multiples signaux et régulent le métabolisme à court comme à long terme (Morton *et al.*, 2006).

L'obésité, d'origine génétique ou environnementale, implique donc ces mécanismes de défense et les perturbations engendrées sont le résultat d'interactions délétères entre l'environnement obésogène et ce système de protection. La balance énergétique est dès lors positive (plus d'énergie ingérée que dépensée), l'organisme doit alors stocker davantage d'éléments dans le tissu adipeux, augmentant sa proportion.

### 1. Les signaux régulateurs de la prise alimentaire à court terme



**Figure 2 : La régulation de la prise alimentaire sur le court et le long terme.** Le noyau du tractus solitaire (NTS) est un relai intégrateur. Pour la majeure partie de la régulation à court terme de la prise alimentaire, il intègre des signaux périphériques principalement nerveux. Parmi eux, on trouve la distension gastrique provenant des mécanorécepteurs de l'estomac ou les afférences vagales qui relayent les signaux anorexigènes de la cholécystokinine (CCK) ou le glucagon-like-peptide-1 (GLP-1). L'hypothalamus (Hyp) est un relais métabolique qui intègre les signaux métaboliques circulants anorexigènes comme la leptine, l'insuline ou le peptide YY3-36 (flèches vertes) ou orexigènes comme la ghéline (flèche rouge). Adapté de Luquet, 2008 dans Médecine/Sciences.

Chez beaucoup de vertébrés, la prise alimentaire est réalisée au cours de repas. C'est-à-dire durant des périodes définies par un début et une fin. La régulation à court terme de la prise alimentaire correspond à l'ensemble des processus impliqués dans la sensation de faim, le processus de rassasiement et dans l'état de satiété entraînant l'absence de prise alimentaire interprandiale au cours d'une journée. Il était assez difficile d'établir de réels facteurs d'initiation de la prise alimentaire. D'abord c'est la contraction de l'estomac qui a été suggérée comme étant le facteur stimulateur principal de la prise alimentaire (Cannon and Wasburn, 1912). Puis, la détection de l'hypoglycémie a été reconnue comme étant le premier signal stimulant l'appétit (Mayer, 1953). Plus récemment, la ghéline, produite et sécrétée par l'estomac a été décrit comme un facteur initiateur de la prise alimentaire (Cummings *et al.*, 2001).

Les facteurs de « satiation » (perception d'être rempli initiant l'arrêt de la prise alimentaire) ou de « satiéte » (réduction de l'attrait pour la nourriture après un repas ; Guyenet and Schwartz, 2012) sont quant à eux mieux définis. Une fois la prise alimentaire initiée, l'estomac se remplit entraînant sa distension et active des mécanorécepteurs qui renseignent des centres du tronc cérébral sur l'état de remplissage via le nerf vague (Ritter, 2004). La chalcocystokinine (CCK) est sécrétée par l'intestin grêle en réponse à la détection du gras et des protéines présentes dans le bol alimentaire et active le nerf vague afin de stopper la prise alimentaire (Gibbs et al., 1973 ; Kissileff et al., 1981). L'intestin sécrète également le glucagon-like peptide-1 (GLP-1), le peptide YY (PYY3-36) et l'entérostatine en réponse à la prise alimentaire (Cummings and Overduin, 2007). Le pancréas est aussi un des acteurs de la régulation énergétique postprandiale en sécrétant le polypeptide pancréatique, le glucagon ou l'amyline (Katsuura et al., 2002 ; Okada et al., 1991 ; Geary and Smith, 1982) pour diminuer la sensation de faim.

## **2. Centres intégrateurs et régulateurs des signaux métaboliques à court terme**

Les principaux centres qui intègrent les signaux régulateurs de la prise alimentaire à court terme sont situés au niveau du cerveau postérieur. Il s'agit du noyau du tractus solitaire (NTS), le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMV) et de l'area postrema (AP). La majeure partie des signaux sont intégrés via l'activation des fibres afférentes du nerf vague, comme lors de l'activation des mécanorécepteurs de l'estomac (Ritter, 2004). Les hormones de satiéte, produites par les organes périphériques en réponse au bol alimentaire, passent dans le sang et sont capables d'atteindre directement les neurones du NTS, au niveau de l'area postrema, une zone ne présentant pas de barrière hématoencéphalique (BHE, voir chapitre 3). Enfin, l'activation des voies nerveuses régulatrices de la prise alimentaire, présentes au niveau de l'hypothalamus peuvent aussi envoyer des projections axonales jusqu'au NTS afin que ce centre puisse être informé des signaux régulateurs à long terme et les intégrer au message final (Morton et al., 2005).

## **3. Les signaux régulateurs de la prise alimentaire à long terme**

Au-delà de pouvoir gérer la prise alimentaire au quotidien, l'organisme a besoin de messagers qui lui permettent de connaître l'état des stocks énergétiques dont le corps dispose. Ces messages et les mécanismes qui leur sont associés permettent de maintenir les réserves d'énergie, et donc un poids stable sur de longues périodes. Parmi les signaux à long terme, il existe la leptine, l'insuline et l'amyline. La leptine est produite majoritairement par les adipocytes du tissu adipeux en proportion de la quantité de gras présente. Ce signal informe le cerveau, en temps réel, de l'état du centre principal de stockage d'énergie. La leptinémie varie donc peu et principalement en fonction du style de vie. Toutefois, nous avons vu précédemment qu'elle peut également intervenir dans la régulation de la prise alimentaire à court terme (Chin-Chance et al., 2000). L'insuline et l'amyline sont quant à elles produites par les cellules  $\beta$  pancréatiques en réponse à l'augmentation de la glycémie et fait état de la disponibilité du glucose. L'insuline joue également un rôle primordial dans le stockage du glucose circulant dans les tissus périphériques, diminuant ainsi la glycémie.

## **4. Les centres intégrateurs et régulateurs des signaux métaboliques à long terme**

### **4.1. L'hypothalamus**

L'hypothalamus est une structure du système nerveux central situé à la base du crâne. Il est composé de plusieurs groupes de neurones ou noyaux, entourant le 3<sup>e</sup> ventricule donc le plancher est formé par l'éminence médiane. Les noyaux impliqués dans la régulation de la balance énergétique sont, du plus ventral au plus dorsal, le noyau arqué (ARC), l'hypothalamus ventromédial (VMH), dorsomédial (DMH), latéral (LHA) et paraventriculaire (PVH). Les signaux métaboliques sont intégrés de manière séquentielle, d'abord par les neurones dits de premier ordre, présents au sein du ARC. Ils sont connectés avec des neurones dits de second ordre présents

dans le VMH, le DMH, la LHA, le PVH ou dans des zones extrahypothalamiques le NTS, le DMV ou noyau parabrachial (PVN).

L'hypothalamus est le principal centre intégrateur des signaux de satiété à long terme, en raison de l'expression des récepteurs à la leptine et à l'insuline sur ses neurones (Cheung *et al.*, 1997 ; Benoit *et al.*, 2002, Baskin *et al.*, 1999 ; Marks *et al.*, 1990).

#### 4.2. Le noyau arqué et les neurones du premier ordre

Au sein du noyau arqué, il existe deux populations de neurones qui sont des éléments clés dans la régulation de la prise alimentaire. L'une d'entre elles exprime des peptides anorexigènes qui entraînent la diminution de la prise alimentaire. Ce sont les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) et au transcrit régulé par la cocaïne et l'amphétamine (CART, neurones POMC-CART). L'autre population des peptides orexigènes, augmentant la prise alimentaire, les neurones à Neuropeptide Y (NPY) et à la Agouti related protein (AgRP, neurones NPY-AgRP). Ces neurones sont sensibles aux signaux métaboliques périphériques (leptine, insuline, ghréline) car ils expriment leurs récepteurs spécifiques, mais également aux métabolites énergétiques (glucose, acides gras et acides aminés) (Zhang *et al.*, 2003 ; Laugerette *et al.*, 2005 ; Berthoud and Morrison, 2008). Ils interagissent entre eux, régulant mutuellement leur activité et envoient leurs projections vers d'autres neurones impliqués dans les réponses adaptatives endocrines et autonomes du comportement alimentaire. Par exemple, pour diminuer la prise alimentaire, le mode d'action le plus décrit dans la littérature est la stimulation de la production et activité de l'hormone mélanoïtropique ( $\alpha$ -MSH) sur son récepteur MC4R présent sur des neurones du noyau paraventriculaire (Cowley *et al.*, 1999).

##### 4.2.1. Les neurones anorexigènes POMC/CART

Les neurones à POMC sont présents dans l'ARC, mais on en trouve également au niveau du cerveau postérieur où ils contrôlent la taille de repas (Kanoski *et al.*, 2012). Quand ces neurones sont détruits ou quand le gène codant pour la POMC est muté, les individus sont obèses, ce qui montre leur rôle crucial dans l'homéostasie énergétique (Mercer *et al.*, 2013 ; Gautron *et al.* 2015 ; Muller *et al.*, 2016 ; Caron *et al.*, 2018). Au cours de l'état « nourri », les neurones POMC sont dépolarisés grâce à l'activité les signaux métaboliques sur leur récepteurs (Cowley *et al.*, 2001). En parallèle, une signalisation intracellulaire permet l'expression de la POMC. C'est un précurseur protéique qui sera, par la suite, clivé par les protéines convertases 1 et 2 (PC1 et PC2), la carboxypeptidase E (CPE) et la peptidyl  $\alpha$ -amidating monooxygénase (PAM) pour générer l'adrénocorticotropine (ACTH), l' $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ -Melanocyte-Stimulating-Hormone (MSH) et la  $\beta$ -endorphine (Toda *et al.*, 2017). L' $\alpha$ -MSH est une protéine qui sert d'agoniste à de nombreux récepteurs présents dans l'hypothalamus pour inhiber la prise alimentaire. Parmi eux se trouve le récepteur à la mélanoïtropine de type 4 (MC4R). Après sa production, l' $\alpha$ -MSH va être ensuite sécrété au niveau des terminaisons axonales des neurones à POMC qui se projettent notamment dans le PVH, entraînant la diminution de la prise alimentaire. L'activité des neurones à POMC est finement régulée à l'aide de nombreux messagers provenant de la périphérie, mais également grâce à d'autres neurones. Tout d'abord, les neurones AgRP/NPY, présents autour d'eux, les inhibent en cas de jeûne (Horvath *et al.*, 1992 ; Cowley *et al.*, 2001). Les neurones noradrénergiques du locus coeruleus et du cerveau postérieur, les neurones cholinergiques du DMH sont eux aussi capables de les inhibiter via leurs projections dans le noyau arqué (Bouret and Richmond, 2015 ; Jeong *et al.*, 2017). Il existe plusieurs populations de neurones à POMC. Certains expriment les récepteurs à la leptine, d'autres à l'insuline ou encore à la sérotonine. Ces neurones sont stimulés par ces ligands sécrétés après la prise alimentaire, mais ils sont également inhibés en l'absence de ces peptides. Enfin, les neurones à POMC peuvent être activés par les œstrogènes réduisant ainsi la prise alimentaire (Steyn *et al.*, 2018).

#### 4.2.2. Les neurones orexigènes NPY/AgRP

La production des peptides NPY et AgRP dans l'ARC est directement liée à l'état énergétique global. En effet, l'expression de ces neuropeptides varie en réponse aux signaux orexigènes et anorexigènes dans le but de réguler la prise alimentaire (Broberger *et al.*, 1998 ; Hahn *et al.*, 1998). La situation de jeûne entraîne une augmentation de l'expression de ces peptides et la consommation de nourriture diminue leur production (Swart *et al.*, 2002). Le niveau d'expression de AgRP et NPY est donc le reflet de la quantité de nourriture ingérée (Su *et al.*, 2017). Les neurones NPY/AgRP sont également stimulés par l'hormone orexigène produite par l'estomac : la ghréline. En se fixant sur son récepteur, elle entraîne l'augmentation de l'oxydation des acides gras, associée à une augmentation de la respiration mitochondriale et une augmentation de l'activité de l'(AMPK) dans les neurones. Ces éléments vont stimuler la production d'AgRP et NPY (Andrews *et al.*, 2008 ; Horvath *et al.*, 2009). L'activité des neurones NPY/AgRP est aussi modulée par la leptine et l'insuline ainsi que plusieurs types de neurones provenant du PVH : les neurones glutamatergiques (Liu *et al.*, 2012) ou exprimant l'hormone sécrétant de la thyrotropine (TRH ; Krashes *et al.* 2014). NPY es neurones NPY/AgRP sont également des neurones GABAergiques. Leurs projections sécrétant le GABA, inhibent les neurones POMC du ARC ou les neurones exprimant le MC4R dans le PVH. Le peptide AgRP, lui-même, est considéré comme un agoniste inverse des récepteurs aux mélanocortines (Ollmann *et al.*, 1997 ; Tolle and Low, 2008). Les terminaisons axonales des neurones NPY/AgRP projettent également vers des neurones du DMH, du télencéphale et du pont pour réguler la prise alimentaire (Singru *et al.*, 2017). Leur activité intervient également dans la régulation de la sensibilité à l'insuline dans le tissu adipeux brun via des connexions avec l'hypothalamus latéral et la stria terminalis (Steculorum *et al.*, 2016) ou dans le comportement impliqué dans la quête de nourriture grâce aux projections dans le noyau médian de l'amygdale (MeA) (Padilla *et al.*, 2016) entre autres. Ce sont des neurones capables de moduler leur mode d'action en fonction de l'environnement énergétique. Lors du passage à un régime gras et palatable, les circuits neuronaux impliquant AgRP tendent davantage à stimuler les circuits de l'émotion plutôt que ceux de la prise alimentaire pure (Denis *et al.*, 2015).

#### 4.3. Les neurones du second ordre et le système à mélanocortine

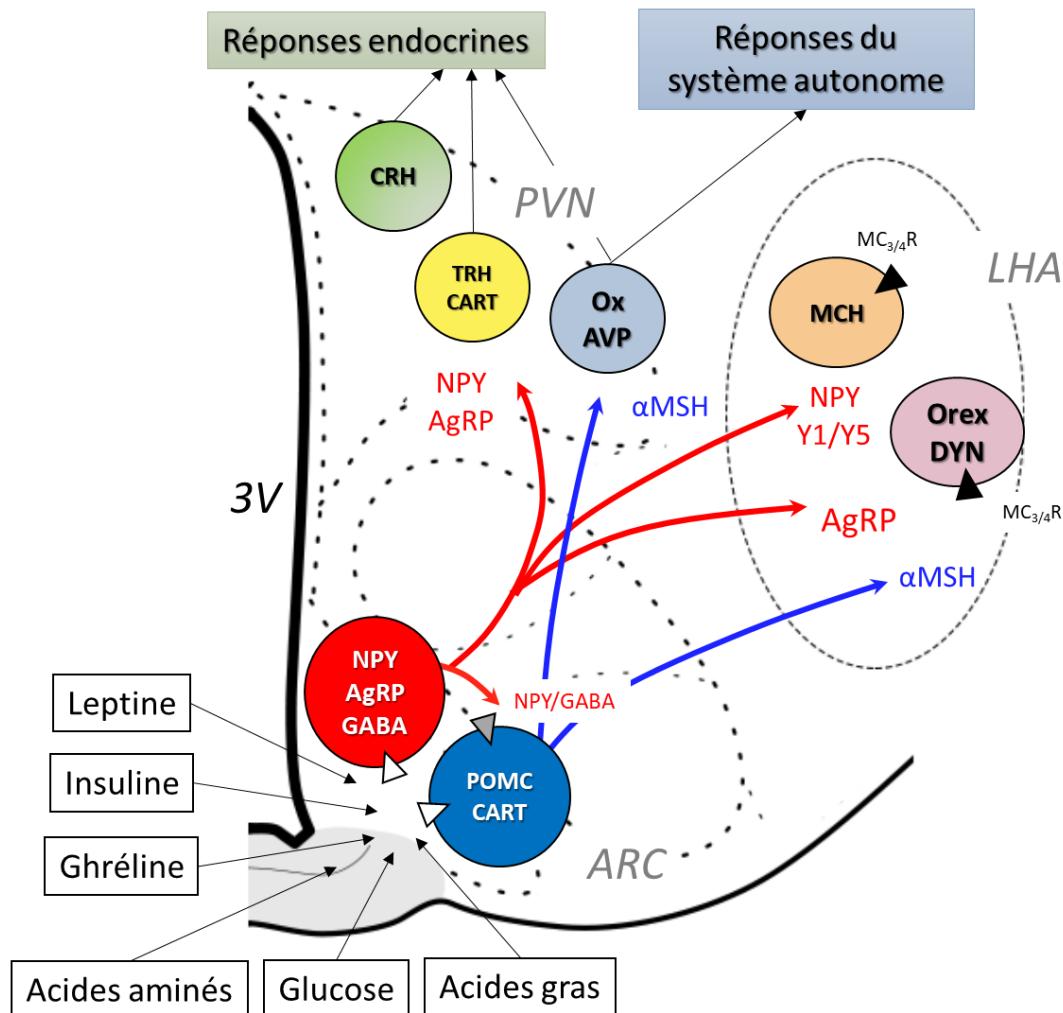
Les neurones du premier ordre sont capables de moduler l'activité des neurones du second ordre. Les neurones à AgRP/NPY peuvent inhiber les neurones anorexigènes et activer les voies orexigéniques grâce à leur activité GABAergique ou l'action du NPY sur leur récepteurs Y1R et Y5R (Fekete *et al.*, 2001). Les projections des neurones à POMC sécrètent l' $\alpha$ -MSH et viennent stimuler les récepteurs aux mélanocortines pour activer les voies anorexigènes. Ces neurones du ARC se projettent d'autres noyaux de l'hypothalamus comme, le VMH, le DMH, le LH et le PVH, mais également dans des noyaux extrahypothalamiques. De façon schématique, les noyaux du VMH et PVH sont considérés comme les centres de la satiété et contiennent des neurones anorexigènes à corticolibérine (CRH), TRH et oxytocine. L'hypothalamus latéral est quant à lui le centre de la faim et contient des neurones orexigènes à melanin-concentrating-hormone (MCH) et orexine (Schwartz *et al.*, 2000). Ces neurones du second ordre vont ensuite projeter vers le NTS, où l'ensemble des afférences seront intégrées et un message efférent produit pour maintenir l'homéostasie énergétique.

Parmi les 5 récepteurs aux mélanocortines, les récepteurs de type 3 et 4 (MC3/4R) sont les plus importants dans la régulation du métabolisme. Les MC3R et MC4R font partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) et sont exprimés à la surface des neurones du second ordre au niveau des terminaisons axonales. Les neurones du premier ordre transmettent leur message grâce à la sécrétion d' $\alpha$ -MSH ou d'AgRP, capables de moduler l'activation des MC3/4R. Ces résultats ont permis de mettre en lumière la corrélation entre la régulation de la prise

alimentaire et l'activation de ces neurones exprimant MC4R (Wang *et al.*, 2015 ; Mountjoy *et al.*, 1994). De plus, chez l'Homme comme chez le rongeur, l'absence de l'activité du MC4R (mutation ou recombinaison) entraîne hyperphagie, baisse de la dépense énergétique, augmentation de la masse grasse, perturbation de l'homéostasie du glucose et baisse du tonus sympathique (Yeo *et al.*, 1998 ; Huszar *et al.*, 1997 ; Butler *et al.*, 2001). C'est au travers de la modulation de l'activité des neurones glutamatergiques que le récepteur MC4R intervient dans la régulation du métabolisme énergétique. Les neurones GABAergiques ne semblent pas avoir un rôle important. En effet, dans le cas où les deux populations de neurones sont inactives, seule la réactivation de neurones glutamatergiques améliore le phénotype d'obésité (Shah *et al.*, 2014).

Au sein du PVH, il y a une segmentation fonctionnelle des neurones. Tous les neurones exprimant MC4R ne jouent pas un rôle dans l'homéostasie énergétique. L'activation de MC4R au niveau des neurones exprimant le facteur de transcription Sim1 (Single minded 1) entraîne la diminution de la prise alimentaire, limitant ainsi le stockage des lipides dans le tissu adipeux, mais n'affecte pas la dépense énergétique (Balthasar *et al.*, 2005 ; Holder *et al.*, 2004). L'implication des neurones dopaminergiques dans ces mécanismes a également été démontrée, dans une plus faible proportion (Cui *et al.*, 2013). Toutefois, les neurones dopaminergiques sécrétant la CRH, l'ocytocine, l'arginine-vasopressine ou la prodynorphine du PVH n'ont apparemment aucun impact, seuls, sur la balance énergétique (Shah *et al.*, 2014). Bien que les neurones exprimant le récepteur à l'ocytocine activent les neurones MC4R du PVH, il semblerait donc nécessaire que ces neurones agissent ensemble pour avoir une incidence visible sur le phénotype.

Les neurones exprimant le MC4R sont également impliqués dans la régulation de la glycémie. En effet, une hyperglycémie associée à une hyperinsulinémie a été observée chez les rongeurs n'exprimant pas le MC4R, bien avant le développement de l'obésité. Cela semble indiquer que l'activité de ces neurones est impliquée dans la régulation de la glycémie, sans lien direct avec la présence de gras en excès (Huszar *et al.* 1997 ; Ste Marie *et al.*, 2000). La régulation centrale de la glycémie se fait via le système nerveux autonome impliquant les MC4R présents sur les neurones du noyau intermédiaire de la moelle épinière (IML) et le noyau dorsal médial du nerf vague (DMV). Toutefois ces neurones n'interviennent pas dans la sécrétion d'insuline. À l'inverse, l'activation du MC4R sur les neurones exprimant le gène Paired-like homeobox 2b (Phox-2b) dans le DMV entraîne une inhibition du tonus parasympathique qui va inhiber le relargage de l'insuline par le pancréas, mais n'affecte pas le tonus glycémique. Toutefois, de manière intéressante, la délétion du gène MC4R dans les neurones du système nerveux autonome entraîne une baisse du tonus sympathique. Toutefois le phénotype observé correspondrait à celui rencontré lors une excitation sympathique exacerbée (augmentation du relargage du glucose dans la circulation) suggérant que, dans ce contexte, la composition corporelle y joue un rôle (Berglund *et al.*, 2014).



**Figure 3 : Les principaux circuits hypothalamiques impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique.** Les signaux métaboliques périphériques, activent leurs récepteurs spécifiques sur les neurones du premier ordre orexigènes (NPY/AgRP) ou anorexigènes (POMC) présents dans l'ARC. Les terminaisons axonales de ces neurones vont stimuler les neurones du second ordre, notamment dans le PVN et la LHA (Inspiré de Baldini and Phelan, 2019)

### 5. La régulation des dépenses énergétiques

La dépense énergétique regroupe 3 processus différents capables de produire de la chaleur (métabolisme de base, chaleur produite par l'activité physique et la thermogénèse). Ils ont pour point commun d'être régulés grâce à une communication fine entre le système nerveux central avec le tissu adipeux blanc (WAT) ou le tissu adipeux brun (BAT). De nombreuses structures hypothalamiques participent à cette régulation : l'ARC (Coppari *et al.*, 2005), le VMH (Perkins *et al.*, 1981), le DMH (Jeong *et al.*, 2015), le PVH (Madden and Morrison, 2009) ou l'hypothalamus latéral (LHA) (Zhang *et al.*, 2010).

Cette communication peut se faire de manière nerveuse, via des fibres sympathiques afférentes et efférentes (Bartness *et al.*, 2010 ; Vaughan *et al.*, 2014) dont l'activation entraîne la thermogénèse du BAT et la lipolyse du WAT. La thermogénèse permet de maintenir la température corporelle de l'individu, mais également de dissiper la chaleur produite après la prise alimentaire. Le BAT, localisé entre les épaules chez le rongeur joue un rôle majeur dans ce processus. L'activation sympathique du BAT active les récepteurs  $\beta_3$  adrénnergiques présents sur les adipocytes, entraînant l'augmentation de l'expression de l'uncoupling-protein-1 (UCP1). Cette protéine va découpler la chaîne mitochondriale, activer la chaîne de phosphorylation oxydative présente dans les mitochondries et produire ainsi de l'adénosine triphosphate (ATP) et de la

chaleur. L'injection centrale d'agonistes des récepteurs aux mélanocortines augmente le tonus sympathique dans le BAT, ce qui suggère l'implication des neurones exprimant MC4R dans la régulation de ce processus (Brito et al., 2005).

Toutefois, certaines hormones peuvent également servir de messager. Les plus connus sont les hormones thyroïdiennes. La production de cette hormone est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (HHT). La stimulation des neurones de l'hypothalamus produisant l'hormone thyréotrope (TRH) augmente le tonus sympathique (Kim, 2008) au niveau du BAT ainsi que la sécrétion des hormones thyroïdiennes (T3 et T4). Ces molécules, surtout la T3, sont capables d'induire l'augmentation du métabolisme de base, mais également la thermogenèse dans le BAT. Au niveau hypothalamique, les neurones du VMH expriment le récepteur aux hormones thyroïdiennes (TR) et leur stimulation par la T3 entraîne une augmentation du tonus sympathique associé à la lipogenèse du WAT. Dans le BAT, l'administration de la T3 active l'expression de UCP1 (Bianco et al., 2002, Silva et al., 1995 ; Lopez et al., 2010). Une autre hormone produite, elle, par le WAT est également impliquée dans la régulation des dépenses énergétiques. Il s'agit de la leptine.

#### IV. La leptine et ses récepteurs : acteurs majeurs de la régulation de l'homéostasie

##### 1. Structure et production de la leptine

La leptine (du grec « leptos » qui veut dire « mince ») est une protéine découverte en 1994, de 16 kDa produite par l'expression du gène humain *LEP* ou murin *ob* localisé sur le chromosome 7 et 6 respectivement. Les 21 premiers acides aminés représentent le signal de sécrétion qui permet la translocation de la molécule dans le réticulum endoplasmique (RE). Dans cette organelle, elle est clivée pour pouvoir être sécrétée (Zhang et al., 1994). C'est une protéine hautement conservée (homologie de séquence supérieure à 65% chez les mammifères) au travers des espèces animales dont la structure en 4 hélices  $\alpha$  antiparallèles est très proche de celles des cytokines à longue chaîne comme le « ciliary neurotrophic factor » (CNTF) ou l'interleukine 6 (Denver et al., 2011 ; Zhang, 1997). Elle est produite en majorité par le tissu adipeux blanc en proportion de la quantité de triglycérides présente. Sa sécrétion par le tissu adipeux est constitutive. Ainsi, la leptine est le reflet de l'état des stocks énergétiques d'un individu, capable d'informer l'ensemble des organes de ce dernier à long terme (Frederich et al., 1995, Myers and Leibel, 2015). Mais la leptine a également un effet satiétophège à court terme (Ahima, 2005). D'autres tissus sont connus pour produire et sécréter de la leptine dans une plus petite proportion, comme la muqueuse de l'estomac (Bado et al., 1998), le placenta (Mise et al., 2007), le muscle (Ahima and Flier, 2000) ou encore l'hypophyse (Jin et al., 2000).

L'expression et la sécrétion de la leptine sont dépendantes du rythme circadien, de facteurs circulants (cytokines inflammatoires, glucocorticoïdes, insuline), de la noradrénaline, des taux intracellulaires d'AMPc, de la mélatonine, mais également du statut énergétique (à jeun, nourri, etc...) (Dagogo-Jack, 2001 ; Trayhurn et al., 1999 ; Rasmussen et al., 1999 ; Mantzoros et al., 1996). En effet, une mise à jeun entraîne une diminution des taux circulants de leptine et dans le cas de l'obésité, nous observons une augmentation importante de la leptinémie (Ahima et al., 1996). Il existe également un dimorphisme sexuel concernant les taux de leptine circulants. La synthèse de leptine étant stimulée par les œstrogènes et inhibée par la testostérone, les femmes ont une leptinémie plus élevée que les hommes (Moon et al., 2013).

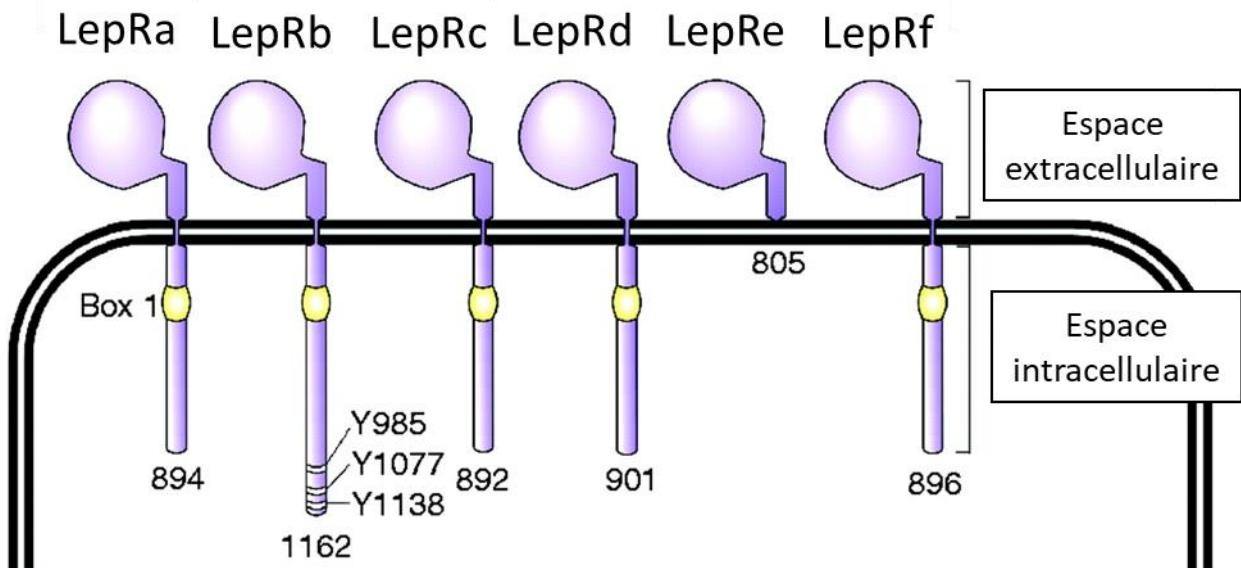
L'importance de cette adipokine dans la physiologie générale a été mise en évidence bien avant sa découverte, grâce à l'étude de patients et de rongeurs (Souris ob/ob pour « obese ») présentant

une mutation ponctuelle sur le gène codant pour la leptine (Montague et al., 1997). L'absence de cette hormone entraîne une obésité très importante dès le plus jeune âge, associée à l'augmentation de la prise alimentaire, à la baisse de la dépense énergétique, à l'infertilité et au diabète entre autres (Myers and Leibel, 2015). Les expériences de parabiose de Coleman en 1973 chez ces animaux obèses ont pu mettre en évidence qu'un facteur circulant était capable de rétablir un poids normal chez la souris (Coleman, 1973). De plus, chez l'Homme, la totalité des troubles observés a été renversée par le seul traitement des individus à la leptine (perte de poids, régulation de l'homéostasie glucidique, restauration de la fertilité...) (Farooqi et al., 2002). Toutefois, si la présence du peptide qui est importante, celle de ses récepteurs spécifiques le sont tout autant car transduisent son action au sein des différents organes.

## 2. La structure des récepteurs à la leptine

C'est à nouveau, lors des expériences de parabiose de Coleman, sur les souris *db/db* (pour « diabète »), qu'il a été démontré que l'effet du facteur sérique étudié passait par un récepteur. Le gène humain *LEPR* ou murin *db* code pour les récepteurs à la leptine (*LepR*). La protéine a été isolée pour la première fois dans les plexus choroïdes de souris en 1995 (Tartaglia et al., 1995). C'est grâce à l'épissage alternatif que six isoformes différentes des récepteurs à la leptine sont produites (*LepR<sup>a-f</sup>*; Lee et al., 1996; Wang et al., 1996). Ils font tous partie de la famille des récepteurs à cytokines de type I, mais ont des tailles et des structures différentes. Il est possible de les regrouper en 3 groupes : long, court et soluble. Tous se composent d'une partie N-terminale, extracellulaire, où le ligand vient se fixer pour former d'un dimère de récepteurs. Cinq isoformes possèdent une partie transmembranaire de 34 acides aminés (*LepR<sup>a,b,c,d,f</sup>*). Les formes courtes (*LepR<sup>a,c,d,f</sup>*) possèdent une partie intracellulaire de 32 à 40 acides aminés. Celle de la forme longue (*LepR<sup>b</sup>*), codant pour différents motifs de signalisation, fait 303 acides aminés (*LepR<sup>b</sup>*, forme longue). La longueur de cette partie intracellulaire dépend de l'épissage et donne la fonction au récepteur. La forme longue est la seule forme active du récepteur à la leptine. Elle est la seule à permettre la transmission totale du signal induit par la fixation de la leptine à son récepteur. Les autres formes sont proposées pour médier le transport de la leptine (Bjorbaek et al., 1998). Enfin, l'isoforme *LepR<sup>e</sup>* est la forme soluble des *LepR*. Elle ne possède pas de domaine transmembranaire. Elle est supposée avoir un rôle dans l'inactivation de la leptine circulante et son transport (Li et al., 1998).

La mutation ponctuelle constatée chez le rongeur *db/db* est localisée sur le gène codant pour les *LepR*, mais n'affecte que la forme b du récepteur. En effet, cela provoque un changement dans l'épissage aboutissant à l'expression d'une forme longue du récepteur tronquée dans sa partie intracellulaire (Chen et al., 1996). Ne pouvant médier son signal correctement (Ghilardi et al., 1996), cette forme est donc inactive. D'autres mutants (*db<sup>3J</sup>/db<sup>3J</sup>* et *db<sup>PAS</sup>/db<sup>PAS</sup>*) présentent des *LepR<sup>b</sup>* qui ne possèdent pas de segment intracellulaire et transmembranaire. Le phénotype associé à ces mutants est similaire à celui des *ob/ob* justifiant ainsi son rôle essentiel dans la régulation homéostatique et son rôle médiateur de l'activité de la leptine.



**Figure 4 : Les différentes isoformes des récepteurs à la leptine.** Les récepteurs à la leptine ont 6 isoformes différentes, obtenues par épissage alternatif. Même si le domaine extracellulaire est commun à toutes les isoformes, le domaine intracellulaire diffère d'un variant à l'autre. Le nombre indiqué sous chacun d'entre eux indique leur nombre d'acide aminé caractéristique. Le motif Box1 est nécessaire pour l'interaction avec JAK et son activation. Seule la forme longue (LepRb) contient les motifs protéiques pour induire la voie de signalisation JAK/STAT. Les trois résidus tyrosine dont la phosphorylation est importante pour la signalisation liée à la leptine sont indiqués sous sa représentation. Y985 interagit avec la SH2-containing protein tyrosine phosphatase 2, Y1077 avec STAT5, and Y1138 avec STAT3.

### 3. La signalisation des récepteurs à la leptine

Les LepR sont des récepteurs à cytokine de type I ne possédant pas d'activité kinase intrinsèque. Ces récepteurs sont recrutés à la membrane sous forme de complexes inactifs. Il s'agit souvent de dimères. Ils peuvent être composés de deux récepteurs identiques ou différents. En effet, il a été suggéré que des complexes « Forme longue-Forme courte » se forment, mais uniquement en présence du ligand naturel (Nakashima *et al.*, 1997 ; White and Tartaglia, 1999 ; Bacart *et al.*, 2010). La fixation de la leptine entraîne un changement de conformation de ces complexes permettant le recrutement et l'activation optimale de protéines médiatrices comme JAK2 (Kinase Janus 2) (Hegyi *et al.*, 2004). Cette protéine, une fois recrutée, se fixe au niveau d'une zone intracellulaire, le motif riche en proline « box 1 », présent dans les formes courtes et longues du LepR. JAK2 s'active ensuite par autophosphorylation et phosphoryle des résidus tyrosines afin de recruter d'autres protéines et transmettre le message intracellulaire lié à la leptine (Myers *et al.*, 2002, Banks *et al.*, 2000). L'induction de ces cascades de transduction est spécifique à un résidu et n'est possible que sur le LepRb, car il s'agit de la seule forme contenant des résidus tyrosines phosphorylables (Tyr979, Tyr985, Tyr 1077 et Tyr 1138). Toutefois, les formes courtes peuvent également présenter un signal plus faible (Murakami *et al.*, 1997).

#### 3.1. Signalisation JAK/STAT<sub>3</sub>

La phosphorylation du résidu tyrosine 1138 entraîne le recrutement et la fixation de la protéine STAT3 (Signal transducteur et activateur de la transcription 3) sur le motif riche en proline « box3 » grâce à son domaine SH2 (« Src homology 2 »). JAK2 va ensuite phosphoryler STAT3 sur son résidu tyrosine 705 (Banks *et al.*, 2000). Cela entraîne la dissociation de pSTAT3 du récepteur qui va ensuite s'associer avec une autre protéine pSTAT3 ou avec une autre phosphoprotéine de la famille STAT (pSTAT1, pSTAT5 ou pSTAT6). Cette homo ou hétérodimérisation va permettre aux complexes de migrer vers le noyau et servir de facteur de transcription. Il est également possible que 2 protéines STAT3 non phosphorylées se dimérisent entre elles dans le cytoplasme pour être ensuite phosphorylées par JAK2 (Mohr *et al.*, 2012).

pSTAT3 sert de facteur de transcription pour les gènes *Socs3*, *Ptp1b*, *Pomc*, *Cart*, *Npy*, *AgRP*. L'activation de STAT3 entraîne l'augmentation de l'expression des peptides anorexigéniques POMC et CART ainsi que SOCS3 et PTP1B et diminue l'expression des peptides NPY et AGRP via une activation ou une inhibition de leurs gènes respectifs (Bates *et al.*, 2003 ; Münzberg *et al.*, 2003 ; Mesaros *et al.*, 2008). Les protéines Supresseur de signal aux cytokines 3 (SOCS3) et Phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP1B) sont capables d'atténuer le signal dépendant du LepR via une boucle régulatrice négative, inactivant JAK2 et sa cascade associée (Bjorbaek *et al.*, 1999 ; Dunn *et al.*, 2005).

Cette voie de signalisation est essentielle dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Les animaux s/s qui présentent une substitution au niveau de la tyrosine 1138 empêchant la fixation et l'activation de STAT3 ont un phénotype obèse et hyperphagique proche des *db/db*. Toutefois, à la différence des *db/db*, ces animaux ne présentent pas d'infertilité ou une hyperglycémie (Bates *et al.*, 2004 ; Bates *et al.*, 2005). Enfin la perte d'expression de STAT3 spécifiquement dans le cerveau de rongeur (Gao *et al.*, 2004) ou dans les neurones exprimant les LepRb (Piper *et al.*, 2008) entraîne également l'obésité et l'hyperphagie, mais un maintien de la normoglycémie.

### *3.2. Signalisation SHP2/MAPK*

La phosphorylation du résidu tyrosine 985 du LepRb intervient dans le recrutement, en ce même point du récepteur, de SHP2, une protéine phosphatase, via son domaine SH2. Cela entraîne l'activation de la voie de signalisation ERK1 et ERK2 (Protéine kinase régulée par le milieu extracellulaire 1/2).

L'activation de cette voie de signalisation par la leptine entraîne une diminution de la masse corporelle associée à une baisse de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique dépendante de l'activité du système nerveux sympathique dépendante de la leptine, au niveau du BAT. (Rahmouni *et al.*, 2009). Elle est également connue pour son effet neurotrophique, notamment dans le développement du réseau hypothalamique impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. Dans le cas où cette voie est inhibée, cela entraîne une perturbation dans le développement du réseau (Bouret *et al.*, 2004).

### *3.3. Signalisation JAK2/PI3K/Akt*

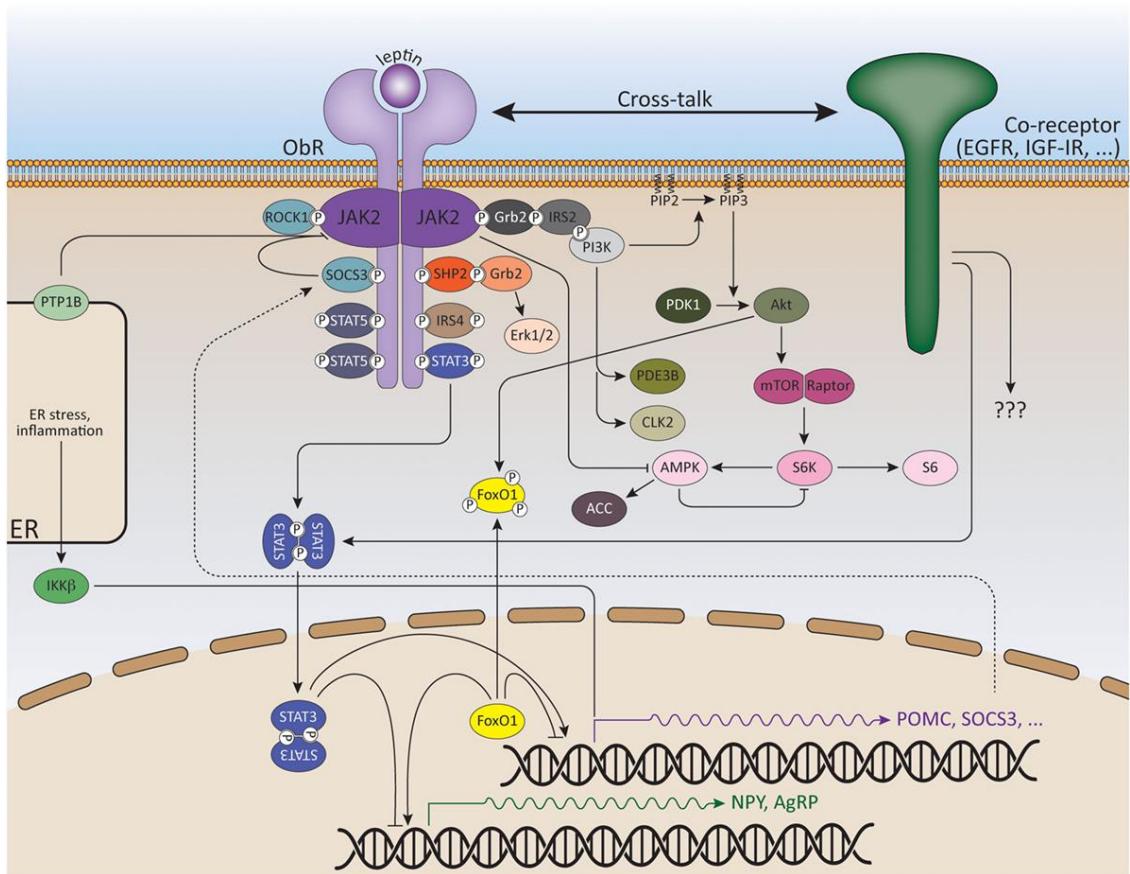
*In vivo*, la leptine est capable d'activer des protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline. En activant JAK2 sur le LepR, IRS (Substrat au récepteur à l'insuline) est recrutée au contact de JAK2 grâce à la protéine SH2B1 (Protéine adaptatrice contenant un domaine SH2). JAK2 va ensuite la phosphoryler (Ren *et al.*, 2005) lui permettant de recruter PI3K (Phosphoinositide-3-Kinase) via le domaine SH2 de la sous-unité p85 (Carvalheira *et al.*, 2003). Après un changement de conformation, PI3K va venir catalyser la phosphorylation PIP2 (Phosphoinositol 4-5 bisphosphate) en PIP3 (Phosphoinositol 3-4-5 triphosphate) permettant le recrutement de deux protéines séries/thréonines kinases PDK1 (Kinase 1 dépendante du Phosphoinositide) et AKT (protéine kinase B ou PKB). La proximité de ces 2 protéines kinase entraînera la phosphorylation d'AKT par PDK1 sur son résidu thréonine 308 la rendant accessible à la phosphorylation de la sérine 473 par le complexe mTOR 2 (mTORC2) (Vanhaesebroeck *et al.*, 2012). Ainsi, AKT devient active et elle peut phosphoryler de multiples protéines dont mTOR et le facteur de transcription de la famille Forkhead box FOXO1.

La protéine mTOR est présente dans les neurones NPY/AgRP et POMC. Une fois phosphorylée par AKT, mTOR va pouvoir activer S6K (S6 Kinase 1) entraînant une réduction de la prise alimentaire (Cota *et al.*, 2006), une augmentation du tonus sympathique au niveau du WAT et une baisse de la masse grasse (Plum *et al.*, 2007).

FOXO1 est un facteur de transcription, également exprimé dans les neurones orexigènes et anorexigènes de l'ARC, du VMH et DMH. Dans sa forme active, non phosphorylée, FOXO1 est transloquée dans le noyau où elle induit l'expression de NPY, AgRP et inhibe l'expression de POMC. Ainsi, la phosphorylation de FOXO1 induite par l'activité du LepRb entraîne sa rétention dans le cytoplasme bloquant ses effets sur la production de neuropeptides orexigènes et favorisant la production de POMC dans les neurones hypothalamiques (Kim *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2012). De plus, les sites de liaison pour les facteurs FOXO1 et STAT3 sur les gènes *Npy*, *AgRP*, *Pomc* étant très proches, pour produire ces peptides régulateurs, il est indispensable d'activer STAT3 et inhiber FOXO1 (Ernst *et al.*, 2009).

### 3.4. Signalisation AMPK

L'AMPK (Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate) est une sérine/thréonine kinase composée d'une sous-unité  $\alpha$  catalytique et de plusieurs sous-unités régulatrices bêta et gamma. C'est une protéine importante dans la régulation de l'homéostasie énergétique grâce à son rôle de senseur des concentrations en ATP intracellulaire et d'intégrateur de signaux métaboliques tant en périphérie qu'au niveau central (Minokoshi *et al.*, 2004 ; Hardie *et al.*, 2012). En périphérie, la leptine active l'activité de AMPK au niveau du muscle augmentant l'oxydation des acides gras (Merril *et al.*, 2003). Dans l'hypothalamus, l'AMPK est active en situation de jeûne au cours duquel la sous-unité  $\alpha$  est phosphorylée sur sa thréonine 172 via la protéine CaMKK  $\beta$  (Protéine Kinase Kinase dépendante du complexe Calcium-Calmoduline) et/ou la LKB1 (Protéine kinase du foie B1) (Hawley *et al.*, 2003 ; Racioppi and Means, 2012). La prise alimentaire ou l'injection intracérébroventriculaire (ICV) de leptine l'inactive dans les régions de l'ARC et du PVN afin de réduire la prise alimentaire et la prise de poids. La leptine entraîne la phosphorylation de la serine 491 de la sous-unité  $\alpha 2$  de l'AMPK, réduisant son activité (Minokoshi *et al.*, 2004). La protéine S6K est proposée pour médier cet effet. La diminution de la phosphorylation de la protéine ACC (Acétyl-CoA carboxylase) augmente ainsi la concentration en malonyl-CoA dans les neurones hypothalamiques (Anderson *et al.*, 2004). Cela va ensuite diminuer l'activité de la CPT-A (carnitine palmitoyl transferase 1) réduisant l'oxydation mitochondriale des acides gras et augmentant les LCFA-CoA (long chain fatty acyl-CoA). Cela réduit la production hépatique de glucose et initie la diminution de la prise alimentaire (Obici *et al.*, 2003). L'inactivation de l'AMPK dans l'hypothalamus entraîne également l'augmentation du tonus sympathique dans le tissu adipeux blanc et brun (Minokoshi *et al.*, 2002).



**Figure 5 : La signalisation intracellulaire liée à l'activation des récepteurs à la leptine.** Tiré de de Wauman et al, 2017 (Doi : [doi.org/10.3389/fendo.2017.00030](https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00030)).

#### 4. Les récepteurs à la leptine : expression et rôle dans la régulation centrale du métabolisme énergétique

Au vu du phénotype des animaux (souris *db/db*), les effets de la leptine sont essentiellement liés à l'activation du LepRb. Visualiser l'expression de ce dernier, dans les tissus régulateurs du métabolisme énergétique, permet de connaître les zones et cellules impliquées dans ce processus. S'il est connu que ce récepteur est exprimé dans les tissus périphériques, la réexpression des LepRb dans le cerveau des souris *db/db* permet la restauration quasi totale du phénotype métabolique (Chua et al., 2004). Cela démontre ainsi le rôle primordial et majeur du cerveau dans la médiation du signal leptine, d'un point de vue métabolique. De précédentes études ont montré grâce à l'hybridation *in situ* ou expression de protéines fluorescentes sous contrôle du promoteur du LepRb, une cartographie des cellules ainsi que les projections exprimant la forme longue du récepteur à la leptine au sein du système nerveux central (Scott et al., 2009 ; Caron et al., 2010 ; Patterson et al., 2011).

##### 4.1. Cartographie de l'expression du LepRb dans le cerveau

L'hypothalamus regroupe les sites les plus riches en ARNm et LepR fonctionnels. L'ARC présente un marquage très dense sur la quasi-totalité du noyau qui concorde avec une forte activité P-STAT3 (5360 neurones de l'ARC en moyenne coexpriment LepRb et P-STAT3, soit 98% des neurones LepRb de la structure). Le LepRb est également fortement exprimé dans le LHA et la partie dorsale et ventrale du DMH avec une très faible proportion en son centre, plus compact. L'expression est ensuite plus hétérogène au niveau du PVN, mais également du VMH, où le LepR est présent dans sa partie médiane surtout. Le noyau prémamillaire ventral (PMV), ainsi que l'aire préoptique médiane (MnPO) exprime aussi de manière robuste le LepRb. Les projections et les somas des

neurones LepRb sont majoritairement regroupés aux mêmes endroits, sauf à quelques exceptions (partie ventrale et latérale l'ARC et l'aire ventrale et médiale du PMV) démontrant que les neurones LepR peuvent aussi connecter différentes structures cérébrales entre elles.

D'autres structures extrahypothalamiques expriment également le LepRb. Dans le cerveau moyen et postérieur, le LepR est exprimé majoritairement dans le noyau raphé dorsal, le gyrus denté de l'hippocampe, les noyaux gris péliaqueducaux (PAG), l'aire tegmentale ventrale (VTA), le noyau Edinger-Westphal (EW), le noyau dorsal moteur du vague (DMV), le noyau parabrachial latéral (PBL) et autour du NTS. À nouveau, les projections et les somas positifs au LepRb sont majoritairement regroupés. La signalisation de leptine dans ces noyaux est impliquée dans la régulation de la prise alimentaire motivée (VTA) ainsi que la régulation des repas à court terme (DMV et NTS).

D'autres parties du cerveau n'expriment pas beaucoup de neurones LepRb comme le cortex préfrontal, la corne d'Ammon (CA1,2,3) de l'hippocampe, l'amygdale et le thalamus. Toutefois, certaines zones qui ne présentent que très peu ou pas de corps cellulaires positifs au LepRb reçoivent beaucoup de leurs projections. Parmi elles on compte le noyau accumbens (NA), le PVH et le noyau central de l'amygdale (NCA), indiquant que les neurones LepRb forment un véritable réseau, interconnectant de multiples structures cérébrales entre elles. Cela suggère que l'activité de la leptine peut avoir un effet indirect sur de nombreuses aires cérébrales.

#### 4.2. Rôle des neurones LepRb de l'ARC dans la régulation centrale du métabolisme énergétique

Situé sur les bords latéraux du 3<sup>e</sup> ventricule et au-dessus de l'éminence médiane, l'ARC a une place privilégiée pour la réception de multiples facteurs régulant le métabolisme énergétique, dont la leptine. Ce noyau est une structure essentielle dans la régulation de l'homéostasie glucidique et de l'activité locomotrice liée à la leptine (Coppari et al., 2004). Les deux populations de neurones majoritaires dans la régulation de la balance énergétique, présents au sein du noyau, que sont les neurones POMC/CART et les neurones NPY/AgRP expriment les LepRb (Lam et al., 2017). La leptine, en activant son récepteur, induit la dépolarisation des neurones POMC (Cowley et al., 2001) et l'expression de la POMC via la voie de signalisation PI3K/FOXO1 (Kwon et al., 2016). Cette même voie va également activer le canal cationique TrpC5 (Transient receptor potential cation 5) permettant de maintenir la dépolarisation des neurones à POMC (Qiu et al., 2014 ; Gao et al., 2017). Le pré-propeptide POMC est ensuite clivé en αMSH (α-melanocyte-stimulating hormone) sous l'action d'une pro-convertisse. L'αMSH va alors activer les neurones de second ordre exprimant le MC4R, réduisant la prise alimentaire et augmentant la dépense énergétique (Elmquist et al., 2005 ; Morton et al., 2006). L'activation des LepRb dans l'ARC inhibe également les neurones orexigènes NPY/AgRP ne pouvant plus exercer leur effet inhibiteur sur les neurones POMC (Krashes et al., 2013 ; Aponte et al., 2011). D'autres populations neuronales exprimant le LepRb, présentes en grande partie dans le DMH, sont capables de réguler l'activité des neurones POMC. Une population de neurones GABAergiques indépendante des peptides orexigènes inhibe les neurones POMC et la délétion de ces neurones GABAergiques entraîne un phénotype marqué d'obésité (Vong et al., 2011). Enfin, des neurones NOS1 régulent l'expression de *Pomc* (Lesman et al., 2012).

#### 4.3. Rôle des neurones LepRb des VMH et DMH

L'administration de leptine entraîne l'activation des neurones du VMH et du DMH. Une majorité des neurones du VMH exprimant LepRb sont des neurones exprimant SF1 (Facteur de transcription stéroïdogénique 1) et PACAP (Polypeptide d'activation de l'adénylate cyclase de l'hypophyse). La leptine entraîne la dépolarisation de ces neurones dont l'effet induit est assez limité sur la balance énergétique de base. Toutefois, ils régulent la dépense énergétique lors d'un régime riche en graisse (Dhillon et al., 2006 ; Hawke et al., 2009). L'ablation de neurones glutamatergiques

exprimant le LepRb dans le VMH n'induit qu'une prise de poids légère (Vong et al., 2011). De plus, les neurones à prodynorphine exprimant le LepRb, présents dans le VMH et également dans le DMH, ne semblent pas non plus être de grands médiateurs de l'action de la leptine sur le métabolisme énergétique (Allison et al., 2015). Ces résultats suggèrent le VMH comme un modulateur plutôt qu'un centre régulateur majeur.

L'activité des neurones de la partie dorsale du DMH exprimant le LepR dont les neurones activateurs de la sécrétion de prolactine promeuvent la dépense énergétique via l'augmentation de la production de chaleur via UCP1 dans le tissu adipeux brun (Rezai-Zadeh et al., 2014). En revanche, peu de choses sont connues à ce jour sur le rôle des LepRb présents dans la partie ventrale du DMH.

#### 4.4. Rôle des neurones LepRb dans la LHA

À nouveau, l'injection de leptine entraîne l'activation de P-STAT3 dans les neurones de la LHA dans le but de réduire la prise alimentaire et le poids. Les neurones de la LHA exprimant le LepRb sont majoritairement GABAergiques et forment un groupe à part des autres neurones majoritairement orexigéniques (neurones à orexine et « melanin concentrating hormone » (MCH)). En effet, le marquage P-STAT3 ne colocalise pas avec celui de l'orexine ou MCH dans la LHA (Leininger et al., 2009) indiquant que la leptine a un effet indirect sur ces neurones. Ces effets pourraient provenir de neurotransmetteurs transmis localement, de l'activation de neurones exprimant les LepR, provenant d'autres noyaux hypothalamiques comme l'ARC, capables de projeter leurs axones vers la LHA (Nahon, 2006) ou d'autres peptides comme la galanine (Laque et al., 2013). La LHA est connue comme étant un centre régulateur de la motivation à la prise alimentaire (Fulton et al., 2000) et envoie beaucoup de projections vers la VTA où les neurones dopaminergiques modulent les comportements motivés (Berthoud, 2012). La leptine, via les neurones de la LHA exprimant les LepR et la neurotensine viennent moduler l'activité dopaminergique du VTA (Lenninger et al., 2011).

#### 4.5. Rôle des neurones LepRb dans le PVH

L'activation directe des neurones du PVH par la leptine a été démontrée lors de l'application de cette adipokine sur des tranches de cerveau (Powis et al., 1998). Les neurones exprimant la tyrotropin releasing hormone (TRH) sont stimulés par la leptine et la TRH inhibe la prise alimentaire via le système mélancortine décrit précédemment (Huo et al., 2004 ; Harris et al., 2001). Il en va de même pour les neurones à oxytocine (Håkansson et al., 1998). Toutefois, il semblerait que le PVH répond aux signaux périphériques essentiellement de manière indirecte, indiquant l'importance d'un réseau neuronal entre le PVH et les autres structures cérébrales pour réguler le métabolisme énergétique. En effet, une population de neurones LepRb de l'ARC produisant l'α-MSH en réponse à la leptine, se projette sur des neurones du PVH (dont des neurones à TRH) et les stimulent. De plus, de manière intéressante, l'expression de la TRH est également régulée par l'AgRP et le NPY (Kim et al., 2000 ; Kim et al., 2002).

#### 4.6. Rôle des neurones LepRb dans les structures extrahypothalamiques

Le NTS présente des neurones capables d'intégrer le message de multiples facteurs circulants ou électriques provenant de la périphérie permettant la régulation à court terme de la prise alimentaire. Ces mêmes neurones sont sensibles à la leptine qui augmente leur sensibilité aux facteurs de la satiété.

Comme indiqué précédemment, les neurones de la LHA viennent moduler l'activité des neurones dopaminergiques de la VTA. Toutefois, dans le VTA il semblerait que ce soit les neurones non

dopaminergiques exprimant LepRb qui régulent l'activité des neurones impliqués dans la motivation (Hommel et al., 2006).

## 5. Rôle des récepteurs à la leptine dans d'autres phénomènes physiologiques

### 5.1. Mémoire

Il est connu que le régime alimentaire impacte les fonctions cognitives via la régulation de l'expression de certains gènes dans le cerveau (Martin et al., 2008). De plus, l'obésité a également été associée à une perte de la fonction cognitive (Farr et al., 2008). Le cortex et l'hippocampe étant des régions cérébrales fortement impliquées dans les processus cognitifs, la détection du LepRb dans ces zones, chez l'Homme et le rongeur, ont permis de suggérer rapidement l'importance de la signalisation de la leptine dans ces processus. En effet, l'injection de leptine dans l'hippocampe augmente les capacités d'apprentissage chez les rongeurs (Farr et al., 2006). Elle facilite, notamment la transmission synaptique médiaée par les récepteurs glutamatergiques NMDA (Acide N-méthyl-D-aspartique), grâce à une augmentation de l'entrée de calcium dans la cellule, nécessaire au déclenchement de l'exocytose des vésicules synaptiques (Shanley et al., 2001). Ce processus est impliqué dans la potentialisation et la dépression à long terme (LTP et LTD), important dans les processus mnésiques et perturbés dans les neurones de l'hippocampe (Corne d'Amnon 1) des modèles murins déficients en leptine ou sa signalisation (Li et al., 2002). Enfin, il a récemment été démontré que la signalisation liée à la leptine est essentielle à la mise en place du passage d'un signal GABAergique excitateur à inhibiteur dans l'hippocampe de rongeur, au cours du développement post-natal (Dumon et al., 2018).

### 5.2. Reproduction

La fonction de reproduction, orchestrée par l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique (HHG), est essentielle à la survie de l'espèce, mais est également couteuse en énergie. En effet, la mise en place de la puberté comme le maintien de la fertilité nécessite des réserves énergétiques équilibrées sous forme de gras, dans l'optique, notamment, d'assurer la gestation, la lactation chez la femelle et le maintien de la fonction testiculaire chez le mâle (Casanueva and Dieguez, 1999 ; Tena-Sempere, 2008). Ainsi, les individus présentant des troubles métaboliques (anorexie, déprivation énergétique ou obésité sévère) ont également des problèmes de fertilité. Malgré leurs stocks lipidiques importants, les animaux et patients déficients en leptine ou présentant des mutations sur le LepRb sont infertiles, démontrant ainsi l'importance de l'hormone et de sa signalisation via son récepteur dans la puberté et la fertilité (Roa et al., 2009 ; Farooqi and O'Rahilly, 2014). Au niveau central, la leptine module l'activité de l'axe HHG. Elle permet la sécrétion de la Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), entraînant celle de l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculostimulante (FSH) et régulant la production de stéroïdes sexuels et gamètes (Watanobe et al., 2002). Si la présence du LepRb dans les neurones à GnRH est absente, l'activation de ces neurones par la leptine, de manière indirecte (via les neurones NPY, AgRP, POMC de l'ARC, les neurones exprimant le LepRb dans le PMV ou les neurones à Nitric Oxide Synthase (NOS) entre autres) est démontrée (Donato et al., 2011 ; Elias and Purohit, 2012 ; Chachlaki et al., 2017). Au niveau de la région préoptique, la leptine est impliquée dans la genèse du pic de LH pré-ovulatoire grâce à la stimulation des neurones NOS (Bellefontaine et al., 2014).

### 5.3. Métabolisme osseux

Les individus exprimant pas la leptine ou dont la signalisation est altérée présentent une masse osseuse importante (Ducy et al., 2000). Toutefois, le manque de leptine entraîne des effets opposés s'il s'agit d'os axiaux (augmentation de la formation d'os) ou appendiculaires (diminution de la formation d'os), suggérant que la leptine régule le métabolisme osseux de plusieurs façons (Hamrick et al., 2002). Une voie de signalisation périphérique augmente la masse osseuse et une

voie centrale la diminue. Le premier effet est direct et local. Les adipocytes de la moelle osseuse sécrètent la leptine, activant les récepteurs présents sur les ostéoblastes, mais surtout les chondrocytes (cellules formant le cartilage) et entraîne leur prolifération et la production de matrice extracellulaire (Laharrague *et al.*, 1998 ; Driessler and Baldock, 2010 ; Figenschau *et al.*, 2001). Grâce aux neurones du PMV, la leptine active le système nerveux sympathique, envoyant un signal noradrénal à l'ostéoblaste (Takeda *et al.*, 2002). Après activation du récepteur  $\beta_2$  adrénergique, la leptine promeut l'inhibition de la prolifération des ostéoblastes via la cycline D1 et l'activation des ostéoclastes via l'expression du RANKL (ligand activateur du récepteur au NF- $\kappa$ B) augmentant la résorption de l'os (Karsenty, 2006 ; Fu *et al.*, 2005, Elefteriou *et al.*, 2005). Enfin, la leptine peut également inhiber la production de sérotonine, connue pour bloquer les neurones du VMH responsables du tonus sympathique (Yadav *et al.*, 2009).

#### 5.4 Système immunitaire

Nous avons décrit précédemment les LepR comme faisant partie de la même famille que les récepteurs à interleukine 6, eux-mêmes impliqués dans la régulation du système immunitaire et activant les mêmes voies de signalisation (Tartaglia *et al.*, 1995 ; Sanchez-Margalef and Martin-Romero, 2001, Sanchez-Margalef *et al.*, 2003). De plus, les récepteurs à leptine sont exprimés à la surface des principaux acteurs de l'immunité innée ou adaptative, affirmant l'implication de la leptine dans ces deux processus. La leptine stimule la production de monocytes (Zarkesh-Esfahani *et al.*, 2001) ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , IL-6 ou IL-12 (Gainsford *et al.*, 1996 ; Loffreda *et al.*, 1998). Elle augmente également leur action phagocytaire via l'activation de la phospholipase (Mancuso *et al.*, 2004). Les neutrophiles polynucléaires expriment les formes courtes du LepR, capables de prévenir l'apoptose de ces cellules via l'activation du CD11b (ITGAM ou intégrin  $\alpha$  M) et d'augmenter la sécrétion de radicaux libres dérivés de l'oxygène (Zarkesh-Esfahani *et al.*, 2004 ; Ottonello *et al.*, 2004). Chez les lymphocytes Natural Killer (cellules tueuses naturelles), grâce à la phosphorylation de STAT3, la leptine augmente l'activité cytotoxique ainsi que la production de perforine et d'IL-2 (Tian *et al.*, 2002 ; Zhao *et al.*, 2003). Dans le cas de l'immunité adaptative, la leptine intervient dans la production de cytokines pro-inflammatoire par les lymphocytes T et protège les cellules du thymus en réponse à un stress important (Howard *et al.*, 1999). Enfin, il semblerait que la leptine active les lymphocytes B, en partie responsable de la réaction inflammatoire présente dans le tissu adipeux blanc viscéral des sujets obèses (DeFuria *et al.*, 2013).

### V. La résistance à la leptine : contribution au développement de l'obésité

L'étude des patients et animaux n'exprimant pas la leptine a donné beaucoup d'espoir à la communauté scientifique et médicale qui voyait la leptine comme un potentiel traitement aux troubles associés à l'obésité (Zhang *et al.*, 1994, Farooqi and O'Rahilly, 2005). Toutefois, le traitement à la leptine n'induit qu'une perte de poids modeste chez une majeure partie des individus obèses (Mantzoros and Flier, 2000). En effet, chez ces derniers, la leptine est bien présente et, en raison de la quantité importante de tissu adipeux chez ces individus, les taux circulants de leptine sont même exacerbés comparés aux individus minces (Maffei *et al.*, 1996 ; Considine *et al.*, 1996). Pourtant les individus obèses présentent un phénotype métabolique proche de celui des *ob/ob* (surpoids, hyperleptinémie), suggérant que, dans le cas de l'obésité, la forte concentration plasmatique de leptine ne parvient plus à exercer ces effets sur les cellules cibles. Ce phénomène n'était pas sans rappeler ce qui avait déjà été constaté pour l'insuline dans le développement du diabète de type 2. Nous parlons, dans notre cas, de résistance cellulaire à la leptine. L'obésité ou la consommation d'un régime gras (DIO, diet induced obesity) y sont communément associées (El-Haschimi *et al.*, 2010). À partir de ce moment, beaucoup d'études

ont cherché à savoir si l'obésité était une cause ou une conséquence à la résistance à la leptine et les mécanismes impliqués dans son développement.

### 1. Résistance à la leptine endogène ou exogène ?

Dans le cadre de l'obésité induite par l'application d'un régime gras, les rongeurs ne répondent plus aussi bien à la leptine exogène. En partant du principe que l'obésité représente un déséquilibre de la balance énergétique, une hypothèse suggère d'abord que l'administration d'un régime gras ou palatable entraîne l'augmentation de la prise alimentaire, au travers de l'activation augmentée du système hédonique central. Cela suggère également une augmentation de la masse grasse ainsi que de la production de leptine. Au niveau basal (sans injection de leptine), les animaux placés sous régime gras présentent plus de cellules positives à pSTAT3 (marqueur direct de l'activation des LepRb) dans l'hypothalamus en comparaison avec des animaux sous régime normal (Balland *et al.*, 2014 ; Balland *et al.*, 2019). Cela suggère qu'il y a plus LepRb activés, en raison de la plus grande production de son ligand (Munzberg *et al.*, 2004). Mais cela augmenterait également le rétrocontrôle négatif de la signalisation leptine dans l'hypothalamus par l'intermédiaire de plusieurs acteurs (SOCS3, inflammation, stress du réticulum endoplasmique). Cette inhibition exacerbée peut perturber la production du signal anorexigène relatif à l'augmentation de l'apport énergétique. Ce qui entraîne par conséquent l'augmentation de la masse corporelle et de l'adiposité (Myers *et al.*, 2010) et peut expliquer le manque de réponse à la leptine exogène (Coppari and Bjørbaek, 2012). Ce mécanisme a été, au moins partiellement, remis en question à la suite d'une étude démontrant que l'injection d'un antagoniste aux LepR, bloquant ainsi les effets de la leptine endogène, entraînait la même augmentation de la prise alimentaire ainsi que la même diminution de pSTAT3 et d'expression de Socs3 chez les souris minces et sous régime gras. Cela suggère que la leptine endogène est toujours capable d'agir sur les neurones de l'hypothalamus chez la souris obète, malgré une sensibilité différente à la leptine exogène (Ottaway *et al.*, 2015). Cette étude souligne l'importance de la différence entre l'effet endogène de la leptine et celui induit par une injection de leptine exogène qui peut occulter le premier.

### 2. La résistance à la leptine est sélective

L'étude de certains modèles animaux a permis de montrer que la résistance à la leptine peut être sélective. En effet, les animaux « Agouti yellow », dont l'expression ectopique de la protéine AgRP entraîne une inhibition constante des MCR3 et 4, sont obèses, hyperleptinémiques et sont résistants aux signaux anorexigènes de la leptine. Toutefois, l'activité sympathique de ces animaux n'est pas altérée et leur pression artérielle est augmentée (Correira *et al.*, 2002). Ce qui indique que la résistance à la leptine peut affecter la régulation de la balance énergétique sans affecter pour autant la totalité de ses sites d'action.

Il semble donc que la compréhension des mécanismes impliqués dans la résistance à la leptine et son développement lors de l'obésité nécessite de prendre en considération de multiples paramètres. Toutefois, il est admis qu'il existe 2 phases concomitantes dans l'acquisition de la résistance centrale à la leptine : la perte du transport de la leptine jusqu'à l'hypothalamus et la perte des effets biologiques de la leptine en réponse à l'état métabolique de l'individu (El-Haschimi *et al.*, 2000). Lin et ses collaborateurs ont décrit trois phases dans le développement la résistance à la leptine et l'obésité liée au régime chez la souris C57Bl6/J. Une période, au début de la mise sous régime gras, durant laquelle la leptine exogène a toujours son activité. Puis l'animal présente une réduction de la prise alimentaire associée à une leptinémie importante, signe que les animaux sont toujours sensibles à la leptine centrale. Enfin une dernière étape, où l'animal mange de façon exacerbée et n'est plus sensible à la leptine (Lin *et al.*, 2000).

### **3. Perte du transport de la leptine au cerveau**

L'action centrale de la leptine est indispensable pour le maintien de l'homéostasie énergétique. La BHE est composée de cellules endothéliales, présentant des jonctions serrées et formant des vaisseaux étanches. L'expression de LepRa, suggéré comme transporteur de l'hormone au sein de ces structures, suggère que le transport de la leptine serait dépendant de ce récepteur au sein des vaisseaux (Bjorbaeck *et al.*, 1998 ; Kastin *et al.*, 1999). Toutefois, cela n'a pas été constaté (Halaas *et al.*, 1997). Le transport de la leptine est décrit comme étant saturable. C'est-à-dire qu'il n'augmente pas proportionnellement à sa concentration plasmatique (Banks, 2004). De plus, il n'est pas identique en tout point du cerveau. En effet, quand la concentration en leptine est importante, le transport de l'hormone, au niveau du tronc cérébral et du pont, est augmenté quand il est diminué au niveau de l'hypothalamus (Pan and Kastin, 2001). De plus, à la suite de son injection en périphérie, la cinétique d'expression de pSTAT3 dans l'hypothalamus, commence dans l'ARC puis monte au fil du temps vers le VMH, PVN et DMH. Alors que l'injection en ICV active très rapidement et quasi simultanément la totalité des noyaux hypothalamiques (Faouzi *et al.*, 2007). Puisque l'ARC joue un rôle intégrateur primordial des signaux périphériques, sa proximité du 3<sup>e</sup> ventricule et du liquide céphalorachidien (LCR) suggère une communication fonctionnelle entre ces structures pour assurer la transmission des signaux. Ainsi, l'étude de cette interface présente un intérêt non négligeable pour comprendre des mécanismes impliqués dans la résistance à la leptine. L'implication de cette zone sera décrite dans le chapitre 4. De plus, chez l'animal mince, la concentration en leptine dans le LCR est étroitement liée à celle du sang (Schwartz *et al.*, 1996). Dans la circulation sanguine, la leptine peut circuler sous une forme active, libre, ou inactive, liée au LepRe (soluble) (Sinha *et al.*, 1996). Chez un individu mince, 65% de la leptine circulante est liée à son récepteur. Par contre, une personne obèse présente environ 85% de la leptine totale sous forme libre donc active (Magni *et al.*, 2005 ; Houseknecht *et al.*, 1996). Le transport de la leptine du sang vers le cerveau pourrait donc être facilité. Toutefois, chez l'animal obèse ou sous régime gras, le LCR n'est pas enrichi en leptine comme nous pourrions nous y attendre. Au contraire, le mini-porc et l'Homme, le ratio « Leptine dans le LCR sur Leptine dans le sang » est diminué de 3-4 fois en moyenne (Chimielewski *et al.*, 2019 ; Schwartz *et al.*, 1996, Caro *et al.*, 1996). Si le transport de la leptine est saturable au niveau de la BHE, il est possible que les hautes concentrations plasmatiques de leptine saturent les récepteurs et bloquent ce transport (Schwartz *et al.*, 1996, Caro *et al.*, 1996). Au sein de l'éminence médiane, un groupe de cellules gliales, bordant le 3<sup>e</sup> ventricule, a été décrits comme transporteurs de la leptine entre le sang et le LCR : les tanocytes. Au cours du régime gras ou chez les souris db/db, ces cellules présentent un défaut de transport de la leptine (Balland *et al.*, 2014). Nous nous attarderons plus longuement sur l'implication de ces cellules dans le transport de la leptine et leur rôle dans le développement de la résistance à la leptine dans le chapitre 4. Enfin, une autre explication serait que, dans le cas de l'obésité, les cellules transportant la leptine présentent des taux plus importants d'acides gras et de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  modifiant leur capacité de transport (Oh-I *et al.*, 2005).

### **4. Modification de la signalisation liée au LepRb**

L'activité de la leptine dans une structure est habituellement étudiée au travers des variations de l'expression de pSTAT3, témoin direct de l'activation du LepRb. Lors de l'injection de leptine en périphérie chez les animaux obèses ou sous régime gras, des variations de cette phosphorylation pSTAT3 est constatée, notamment au sein de l'ARC (El Haschimi *et al.*, 2000 ; Munzberg *et al.*, 2004). Plusieurs mécanismes ont été décrits comme ayant une influence sur la signalisation liée à la leptine et suggérés pour avoir un rôle dans le développement de la résistance à la leptine.

#### 4.1. Signal inhibitor suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3)

Les souris déficientes en Socs3 au sein du cerveau présentent une meilleure sensibilité à la leptine exogène et sont résistantes au régime gras, suggérant son implication dans le développement de la résistance à la leptine (Howard *et al.*, 2004). Socs3 est connu pour être exprimé à la suite de l'activation d'un récepteur de type cytokine. Sa présence dans le milieu intracellulaire entraîne la suppression du signal induit par la cytokine par une boucle de rétrocontrôle négatif (Starr *et al.*, 1997, Minamoto *et al.*, 1997). Dans le cas du signal leptine, l'expression et la production de Socs3 s'effectue à la suite de la phosphorylation de STAT3 (Banks *et al.*, 2000). Cette protéine, via son interaction avec le résidu tyrosine 985 (chez la souris) va inhiber la phosphorylation de JAK2, STAT3 et ERK, induite par la leptine (Kershaw *et al.*, 2013) par un mécanisme encore mal décrit. Toutefois, récemment une étude montre que la surexpression de Socs3 chez des souris DIO n'affecte pas le poids, suggérant que l'expression seule de Socs3 n'est pas la cause de la résistance à la leptine (Pedroso *et al.*, 2014).

#### 4.2. Les protéines tyrosine phosphatases (PTPs)

C'est au cours de la phosphorylation de plusieurs protéines que la leptine entraîne ses principaux effets. Il semble donc logique que des phosphatases interviennent dans l'inhibition de ce signal. Plusieurs d'entre elles ont été décrites comme intervenant dans la signalisation du récepteur à la leptine. PTP1B dont l'expression est augmentée chez les animaux résistants à la leptine, déphosphoryle JAK2 sur ses résidus tyrosine 1007 et 1008 (White *et al.*, 2009 ; Myers *et al.*, 2001). Dans les neurones POMC, PTP1B joue un rôle dans la sensibilité à la leptine, sans intervenir dans la signalisation de l'insuline (Dodd *et al.*, 2015). La délétion de cette protéine, dans les neurones, augmente la dépense énergétique et rend les animaux résistants au régime gras (Bence *et al.*, 2006). Elle semble donc être une cible thérapeutique prometteuse et l'injection d'oligonucléotides anti-sens pour *Ptp1b* est en phase II d'essai clinique (Isis Pharmaceuticals Inc, 2009). PTPN2 déphosphoryle STAT3. Elle est également surexprimée dans l'hypothalamus des animaux soumis au régime gras. Son inhibition dans l'hypothalamus, en augmentant la signalisation de LepRb, entraîne une perte de poids et l'augmentation de la dépense énergétique (Loh *et al.*, 2011). C'est cette phosphatase qui, dans les neurones POMC, affecte la sensibilité à l'insuline (Dodd *et al.*, 2005). Il existe donc une réelle synergie entre ces 2 protéines. Enfin, PTPε est capable de déphosphoryler ERK ainsi que JAK2. Son rôle semble toucher davantage les femelles que les mâles et peut servir d'approche dans la compréhension du dysmorphisme sexuel de l'homéostasie énergétique (Toledano-Katchalski *et al.*, 2003).

#### 4.3. Rôle de l'inflammation

Il est maintenant établi que l'exposition chronique au régime gras ou l'obésité est associée à l'augmentation de l'inflammation dans les tissus périphériques, mais également dans le système nerveux central (Zhang *et al.*, 2005, De Souza *et al.*, 2005). Plusieurs types cellulaires présents dans l'hypothalamus sont impliqués dans ce processus. L'application d'un régime gras active le recrutement d'astrocytes, augmentant l'inflammation dès les premiers jours d'exposition, en plus de diminuer l'accessibilité de la leptine aux neurones cibles (Horvath *et al.*, 2010). De plus, l'activation de la microglie environnante entraîne également des perturbations de l'activité des neurones POMC (Gao *et al.*, 2014).

Chez le rongeur, un seul jour d'exposition au régime gras ou une seule injection d'acide gras entraîne une réaction inflammatoire dans l'hypothalamus (Posey *et al.*, 2009). Cette exposition courte joue un rôle neuroprotecteur qui est aboli, si l'exposition se prolonge. Un régime enrichi en acides gras saturés active les récepteurs Toll like receptor 4 (TLR4) présents majoritairement dans la microglie et les astrocytes hypothalamiques. Ces récepteurs sont surexprimés en cas de régime gras et entraînent la production de cytokines pro-inflammatoires (Milanski *et al.*, 2009). Ces

cytokines, telles que l'interleukine 1 (IL-1), IL-6 et TNF- $\alpha$  vont stimuler leurs récepteurs respectifs (IL-6R et TNF-R2) exprimés sur les neurones POMC et AgRP de l'hypothalamus (De Souza et al., 2005) et induire les voies de signalisation pro-inflammatoires associées dont celle l'IkB Kinase  $\beta$ /nuclear factor- $\kappa$ B (IkK $\beta$ /NF $\kappa$ B) et la c-Jun N-terminal kinase signalling (JNK) (Thaler et al., 2014, Milanski et al., 2009). Cela entraîne la production accrue de cytokines inflammatoires, mais également du facteur NF- $\kappa$ B. Ce facteur est alors capable de se fixer sur le promoteur du gène *Pomc* inhibant sa transcription en raison d'une hyperméthylation du promoteur associé à une sous-unité de NF- $\kappa$ B (Jang et al., 2010 ; Shi et al., 2013). *In vitro*, NF- $\kappa$ B est également capable de se fixer sur P-STAT3 et d'empêcher son action sur ses cibles transcriptionnelles (Shi et al., 2013). Enfin, l'activation de la voie IkK $\beta$ /NF $\kappa$ B entraîne également la transcription de SOCS3, PTP1B, l'augmentation du stress du réticulum endoplasmique et une baisse de l'autophagie (Zhang et al., 2008 ; Zabolotny et al 2008).

Enfin, les astrocytes sont sensibles au TNF- $\alpha$  grâce à l'expression du récepteur TNF-R1. La stimulation de ce récepteur amplifie l'expression de cytokines pro-inflammatoires déjà produite par les cellules gliales ne faisant qu'augmenter la réaction inflammatoire présente dans l'hypothalamus (Bélanger et al., 2011).

#### 4.4. Rôle du stress du réticulum endoplasmique

Depuis 2004, des études ont pu démontrer qu'il existe un lien entre le stress du réticulum endoplasmique (RE), l'obésité et la résistance à la leptine (Ozcan et al., 2004 ; Ozcan et al., 2009). Mais il a également été observé une augmentation du stress du RE au sein de l'hypothalamus chez des animaux développant l'obésité via transgenèse ou DIO (Zhang et al., 2008). En effet, l'induction pharmacologique du stress du RE *in vitro*, entraîne l'inhibition de la phosphorylation de STAT3 dans l'hypothalamus (Hosoi et al., 2008 ; Williams et al., 2014). L'injection intracérébroventriculaire (ICV) de ces molécules chez la souris entraîne une résistance à la leptine associée à une prise de poids et l'administration d'inhibiteurs du stress du RE suffit à améliorer le phénotype (Won et al., 2009 ; Cakir et al., 2013).

L'origine pressentie de l'augmentation du stress du RE serait la lipotoxicité des neurones de l'hypothalamus à la suite de l'exposition prolongée aux acides gras. En effet, le régime gras augmente la quantité d'acides gras présente dans l'organisme et détectée au niveau des neurones de l'hypothalamus, notamment les neurones à POMC et peut donc jouer un rôle dans la perturbation de la régulation du métabolisme énergétique par l'hypothalamus (Milanski et al., 2009 ; Martinez de Morentin et al., 2010). Le traitement de lignées cellulaires hypothalamiques aux acides gras, comme le palmitate, augmente le stress du RE ainsi que l'autophagie (Mayer et al., 2010 ; Choi et al., 2010).

Le réticulum endoplasmique est une organelle présente dans le cytoplasme, assurant de multiples rôles comme la synthèse des acides gras, l'homéostasie du calcium et du glucose (associés au réticulum endoplasmique lisse), mais surtout la synthèse et la conformation des protéines sécrétées et transmembranaires (associées au réticulum endoplasmique rugueux). Il possède un système de vérification de l'état des protéines et les envoie vers le protéasome en cas de mauvaise conformité (Ruggiano et al., 2014). Dans le cas d'un stress du RE, ce dernier ne fonctionne plus de manière optimale, ce qui entraîne l'accumulation de protéines mal conformées dans le cytoplasme. En parallèle, le RE va activer une série de voies intracellulaires que l'on regroupe sous le terme de réponse UPR pour unfolded protein response (Walter et al., 2011). Cette réponse est négativement régulée, en condition normale, par la fixation d'une protéine chaperonne de type immunoglobulin heavy chain BIP/GRP78. Mais lors d'un stress, elle augmente l'activité de conformation des

protéines et se détache de 3 protéines (PERK, IRE1, ATF6), régissant la réponse UPR, les rendant actives (Lee and Ozcan, 2014).

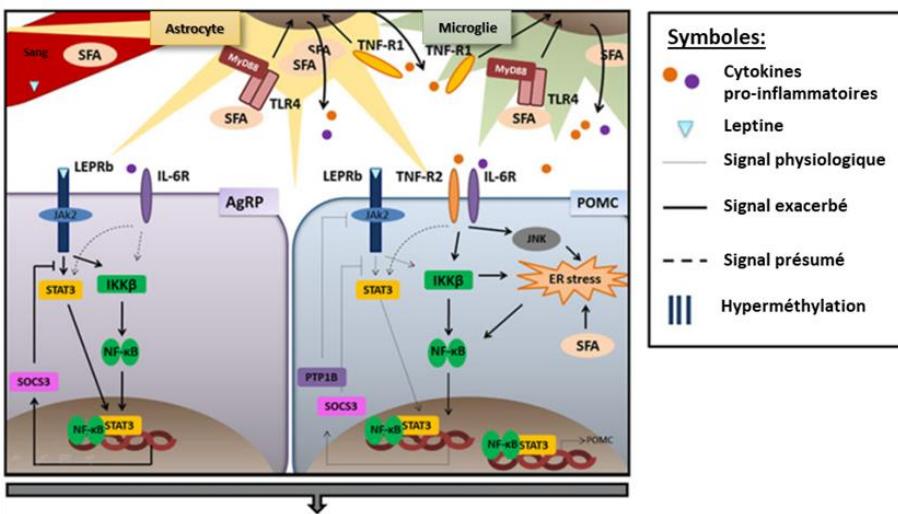
La PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) se dimérisé suite au détachement de BiP/GRP78 pour s'activer par autophosphorylation (Ma et al., 2002). Elle va ensuite réduire la transcription de multiples protéines du RE en phosphorylant le facteur de transcription  $\alpha$  eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 $\alpha$ ), le maintenant en dehors du noyau. Cette voie de signalisation va également induire la voie pro-apoptotique associée à la protéine CCAAT/enhancer-binding protein homologous (CHOP) (Rutkowski et al., 2006).

Une fois libérée de la protéine BIP/GRP78, l'inositol-requiring protein-1 (IRE1) se dimérisé et s'autophosphoryler pour entraîner l'épissage de l'ARNm XBP1 pour former un facteur de transcription activant la transcription des gènes impliqués dans la réponse UPR, le fonctionnement du RE et son nettoyage (Calfon et al., 2002 ; Lee et al., 2002 ; Hollien et al., 2006). Elle intervient également dans l'activation de l'apoptose médiée par les mitochondries en activant la voie pro-inflammatoire JNK et la voie pro-apoptotique ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) (Kim et al., 2006).

Le facteur de transcription activateur 6 (ATF6) va, lui, être transloqué vers l'appareil de Golgi, après le départ de BIP/GRP78. Elle sera ensuite clivée par des protéases entraînant la migration de sa partie N-terminale au noyau, pour servir de facteur de transcription (Adachi et al., 2008).

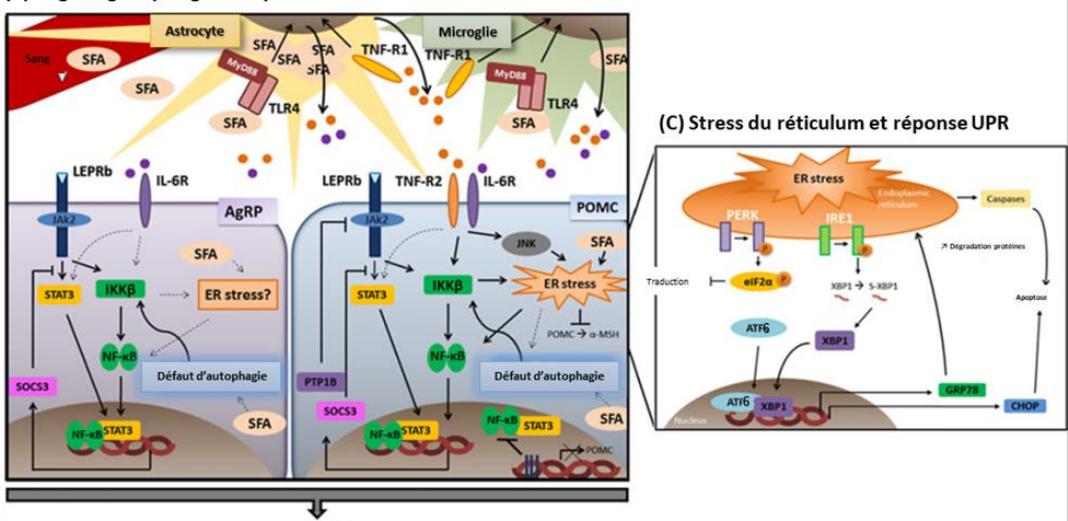
Outre l'intervention du stress du RE dans la régulation de la conformation des protéines, il a également un impact direct sur la signalisation de la leptine au sein de l'hypothalamus. Les neurones POMC semblent, d'ailleurs, être plus affectés que les neurones NPY par le stress du RE. Le régime gras entraînerait également une perte des neurones POMC par apoptose, mais pas des neurones NPY dans l'hypothalamus (Moraes et al., 2009). Les animaux DIO ne présentent pas de différence d'expression de POMC, mais une diminution de l'expression d' $\alpha$ -MSH en comparaison aux contrôles. En association avec le stress de RE, une diminution d'expression de la pro-convertase 2 (PC-2), à l'origine du clivage de POMC en  $\alpha$ -MSH et ACTH, a été constatée (Cakir et al., 2013). Enfin, il a été démontré que les activateurs du stress du RE entraînent une diminution de la dépolarisaton des neurones à POMC.

(A) Régime gras (Court-terme)



Résistance à la leptine avant l'obésité induite par le régime gras

(B) Régime gras (Long-terme)



Résistance à la leptine et développement de l'obésité

**Figure 6 :** Schéma résumant les processus impliqués dans l'inflammation intracellulaire et du stress du réticulum induits par le régime gras à court et long terme dans le développement de la résistance à la leptine et de l'obésité. (Adapté de Git and Adan, 2015)

Nous avons vu, dans ce premier chapitre, que l'obésité et le diabète sont des maladies qu'il est difficile de traiter en raison de la variété de causes envisageables ainsi que la multitude de facteurs et de tissus impliqués dans son développement. Nous avons vu le rôle primordial du cerveau dans le maintien de nombreuses fonctions physiologiques et l'impact de la leptine dans la régulation centrale de la balance énergétique. Les noyaux hypothalamiques forment ensemble un centre intégrateur de l'action de cette hormone et de nombreux paramètres intracellulaires peuvent perturber l'activité de la leptine sur le cerveau entraînant l'obésité et le diabète. Le maintien d'une communication entre ces noyaux et/ou d'autres structures cérébrales est donc essentiel pour le bon fonctionnement des circuits impliqués. Mais une fois que le signal est intégré au niveau du cerveau, comment est-il transmis aux organes périphériques en charge de la fonction ciblée ? Dans cette seconde partie, nous verrons qu'après intégration, un nouveau signal est produit pour atteindre de nombreux organes et tissus différents, toujours dans le but de répondre de la façon la plus appropriée à l'environnement intérieur et extérieur perçus par le corps.

## Chapitre 2 : La communication cerveau-périphérie dans la régulation du métabolisme énergétique

Via la présence de leurs récepteurs, les facteurs ou hormones sécrétés dans la circulation systémique ont un impact direct sur les tissus ou organes périphériques et centraux. Ainsi, la résistance ou la perturbation de l'intégration de ces signaux dans le système nerveux central entraîne des pathologies telles que l'obésité, le diabète ou encore certains cancers. Pourtant ces pathologies semblent trouver leur origine dans des dysfonctionnements des organes périphériques, suggérant une communication entre le cerveau et la périphérie. Le système nerveux autonome (SNA) est capable d'innérer de nombreux tissus et organes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique comme le tissu adipeux blanc, le tissu adipeux brun, le foie, le pancréas ainsi que le muscle. Nous allons voir dans cette partie comment ce système fait le lien entre l'hypothalamus et la périphérie dans le cadre du maintien de l'homéostasie énergétique.

### I. Généralités sur le système nerveux autonome

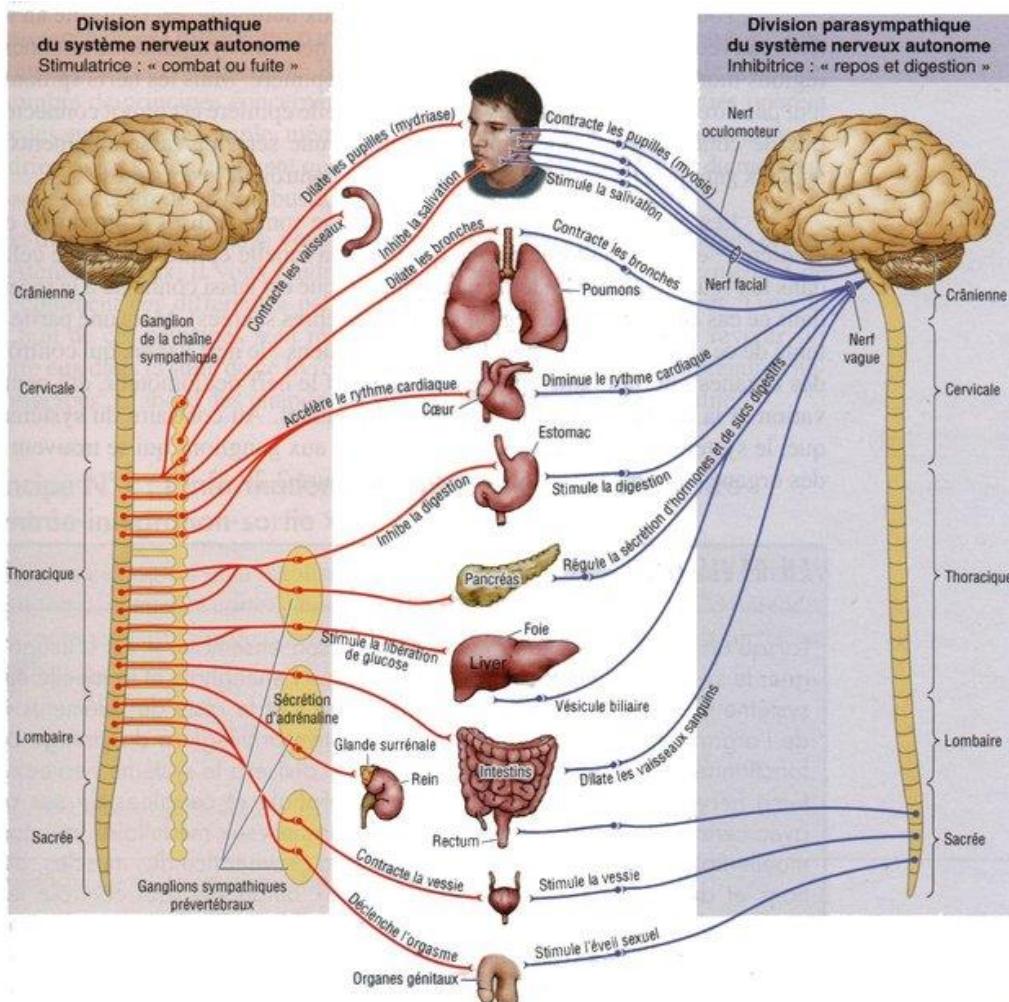
Si le système nerveux central permet l'intégration des informations au sein du cerveau, le système nerveux périphérique permet la communication entre le cerveau et la périphérie. Il se compose du système nerveux somatique, régissant les actions volontaires de l'organisme et le système nerveux autonome qui régule l'activité des organes en fonction de l'environnement. Le système nerveux autonome est impliqué dans de nombreuses fonctions ne demandant pas d'effort conscient, telles que la régulation de la pression sanguine, du rythme cardiaque, de l'excrétion des liquides, de la réaction inflammatoire, mais également la digestion, la régulation de la température corporelle, de l'homéostasie du glucose ou de la balance énergétique ([Jänig, 2006](#)). Il se divise en 2 composantes pouvant agir en synergie, de manière antagoniste ou indépendamment l'une de l'autre : Le système nerveux sympathique et parasympathique.

Le système nerveux sympathique est décrit comme activé par le stress et permet à l'organisme de faire face (fight) ou de fuir (flight) ([Cannon, 1929](#)). Toutefois, il s'agit un système actif en condition de repos, dont la régulation dépend beaucoup de l'organe cible ([Iriki and Simon, 2012](#)). Les fibres préganglionnaires qui le composent sont présentes majoritairement dans le noyau intermédiaire (IML) de la partie thoracique de la moelle épinière ([Cabot et al., 1990](#)). La répartition des fibres se fait de façon rostro-caudale en fonction de la place de l'organe cible. Les fibres innervant le tractus gastro-intestinal vont être plus caudales que celles innervant l'œil. En sortant de la racine ventrale de la moelle épinière, un premier relai est effectué dans les ganglions de la chaîne sympathique paravertébrale ou les ganglions sympathiques, où se trouvent les neurones post-ganglionnaires prévertébraux. Deux cas de figure sont donc possibles. Pour l'innervation de la partie haute du corps les fibres présynaptiques projettent vers la chaîne paravertébrale avant d'innérer directement certains organes. En ce qui concerne l'innervation des viscères, les fibres sympathiques se regroupent d'abord dans des ganglions (ciliaque, mésentérique supérieur et inférieur) avant d'innérer les organes. Les fibres post-synaptiques du ganglion ciliaque innervent l'estomac, l'intestin grêle, le foie, la rate, le pancréas et les reins. Le ganglion mésentérique supérieur envoie ses fibres vers le gros intestin. Enfin le ganglion mésentérique inférieur passe d'abord dans le plexus hypogastrique qui va ensuite pouvoir innérer le colon, la vessie et les organes génitaux.

Le système nerveux parasympathique est impliqué dans les fonctions dites « de repos » et dans la digestion. Ces fibres préganglionnaires sont présentes dans certains nerfs crâniens, la médulla, le pont et l'IML de la partie sacrée de la moelle épinière. Les fibres parasympathiques vont

directement innérer la plupart des organes alors qu'un relai ganglionnaire se présente avant l'innervation des glandes de la face.

Les voies nerveuses du système autonome sont composées de 2 neurones, contrairement au système nerveux somatique qui n'en contient qu'un. Les voies du système nerveux sympathique sont composées d'un neurone cholinergique, dont le neurotransmetteur synaptique est l'acétylcholine, suivi d'un neurone adrénergique. L'effet de la voie est ensuite dépendant du récepteur adrénergique présent sur l'organe cible. La voie parasympathique est composée de 2 neurones cholinergiques dont le second est souvent très court. L'action sur l'organe s'effectue via un récepteur muscarinique.



**Figure 7 : Le système nerveux autonome.** Schéma montrant les deux parties et les deux voies du SNA. À gauche, le système sympathique et à droite le système parasympathique, qui assurent des effets opposés au niveau de chacun des organes qu'ils innervent parfois en commun (d'après Kolb, Cerveau et comportement, 2<sup>e</sup> édition, 2006, p105)

## II. Régulation de l'homéostasie glucidique par le système nerveux autonome

### 1. Communication avec le foie

Le foie est un organe central du métabolisme énergétique. Grâce à sa position stratégique dans le tractus digestif, c'est le premier organe à capter les nutriments du bol alimentaire après la digestion. Il est impliqué dans la production des acides biliaires, mais également dans le métabolisme des acides aminés, des lipides et dans l'homéostasie du glucose (Li *et al.*, 2013 ; Perry *et al.*, 2014). En effet, il a un rôle de stockage du glucose en postprandial et peut également

libérer du glucose dans la circulation en cas d'hypoglycémie (Ramnanan et al., 2011). Le foie est innervé par le système nerveux autonome via des fibres sympathiques et parasympathiques afférentes. Enfin le foie projette également des fibres nerveuses efférents (Fliers et al., 2010 ; Yi et al., 2010). Ces fibres sont connectées à de nombreuses structures centrales dont l'hypothalamus, le tronc cérébral et les structures limbiques (LaFleur et al., 2000). Pour rappel, les fibres sympathiques, en sortant de la partie ventrale de la moelle épinière, vont rejoindre les ganglions céiliaque et mésentérique avant d'innerver le foie. Il existe plusieurs stimuli activateurs de la voie sympathique dans le foie : la stimulation des récepteurs  $\alpha$  ou  $\beta$  adrénergiques, la sécrétion de NPY, de galanine, de noradrénaline ou du vasoactive intestinal peptide (VIP) (Ulken et al., 1991 ; Burcelin et al., 2004 ; Akiyoshi et al., 1998 ; el-Salhy et al., 1993). Les fibres parasympathiques partent du DVM pour rejoindre le foie (Yi et al., 2010 ; Arvidsson et al., 1997).

Même si la réduction de la production hépatique de glucose par le foie peut être affectée par les hormones périphériques telles que l'insuline (réduction de la production hépatique de glucose), l'injection de cette hormone dans les ventricules cérébraux maintient le contrôle de la production de glucose par le foie malgré l'ablation totale du pancréas, de la rate et du tractus gastro-intestinal (Szabo and Szabo, 1975). De plus, les effets de l'injection centrale d'insuline sont abolis lors de la vagotomie et sympathectomie hépatique (Van den Hoek et al., 2008). Cela confirme que le cerveau seul agit sur la production hépatique de glucose. La stimulation du nerf splanchnique entraîne la production hépatique de glucose et diminue la synthèse de glycogène. La stimulation du nerf vague accélère la production de glycogène par le foie (Shimazu, 1971).

Parmi les différentes zones du cerveau, plusieurs noyaux hypothalamiques interviennent dans la régulation de l'activité hépatique du glucose par le foie, via le système autonome :

- La LHA : La stimulation pure de cette zone entraîne la baisse de la néoglucogenèse du foie via la baisse de production de l'enzyme PEPCK (Phoenolpyruvate carboxykinase) et une augmentation de la synthèse de glycogène par la voie parasympathique (Shimazu et al., 1975). Toutefois, la stimulation des neurones à orexine seule entraîne la production de glucose par le foie via des fibres sympathiques (Yi et al., 2009). Ce centre hypothalamique gère principalement la rythmicité de production et nécessite la bonne fonction de l'ensemble du système nerveux autonome (Tsuneki et al., 2015).
- Le VMH : La stimulation électrique de ce noyau entraîne la production hépatique du glucose et diminue la concentration en glycogène par influx sympathique (Shimazu, 1979). Récemment, l'implication des neurones glutamatergiques et GABAergiques SF-1 du VMH ont été ciblés dans la régulation de la glycémie à jeun ainsi que la sensibilité au glucagon chez le rat (Tong et al., 2007 ; Zhang et al., 2008 ; Chan et al., 2006 ; Chan et al., 2011).
- Le PVH : Cette zone est un centre intégrateur pour des neurones provenant notamment de l'ARC, le VMH et le noyau suprachiasmatique (SCN) dans le but de réguler la production hépatique de glucose via des fibres sympathiques et parasympathiques (Fliers et al., 2010). C'est au travers de l'ARC que la leptine (entre autres) exerce ces effets sur la régulation du métabolisme du glucose. En effet, rétablir l'expression des LepR dans ce noyau est suffisant pour rétablir l'insulinémie ainsi que la glycémie (Coppari et al., 2005) et la transmission de l'information passe par les neurones POMC, AgRP et NPY (Huo et al., 2009 ; Goncalves et al., 2014 ; van den Hoeck et al., 2008).

## 2. Communication avec le pancréas

Le pancréas est un organe situé à l'arrière de l'estomac. Il est composé d'ilots de Langherans contenant des cellules  $\alpha$  et  $\beta$ , chargés de produire et sécréter le glucagon et l'insuline respectivement. La régulation fine de la sécrétion de ces hormones permet la bonne gestion de la

glycémie. Le glucagon est hyperglycémiant et l'insuline, hypoglycémiant. A contrario, un dysfonctionnement dans la sécrétion peut entraîner le diabète. À nouveau, le SNA intervient dans la sécrétion des hormones pancréatiques. Le pancréas reçoit des fibres sympathiques et des fibres parasympathiques touchant tant les cellules  $\alpha$  que  $\beta$ . En réponse au glucose, la voie parasympathique stimule la libération d'insuline via la sécrétion d'acétylcholine agissant sur des récepteurs muscariniques présents sur les cellules  $\beta$  (Ionescu *et al.*, 1983). Quand la glycémie chute, la voie parasympathique active les cellules  $\alpha$  pour sécréter du glucagon et normaliser la glycémie. L'activité du système parasympathique sur le pancréas peut être modulée par des facteurs tels que le polypeptide pancréatique, la ghréline, GLP-1 et l'oxyde nitrique (Mussa and Verberne, 2012). Le système nerveux sympathique agit sur les 2 types d'îlots, mais sur des récepteurs différents. L'activation des récepteurs  $\beta 2$  adrénergiques sur les cellules  $\alpha$  entraîne la sécrétion de glucagon. La stimulation des récepteurs  $\alpha 2$  sur les cellules  $\beta$  inhibe la sécrétion d'insuline (Rodriguez-Diaz *et al.*, 2012 ; Thorens, 2014). Comme pour le foie, les fibres sympathiques afférentes partent de l'IML et les fibres parasympathiques du DMV (Rinaman *et al.*, 1987 ; Buijs *et al.*, 2001). L'activité de ces fibres est régulée des neurones du PVH (Jansen *et al.*, 1997). Toutefois, il semblerait que des connexions entre le PVH et d'autres régions hypothalamiques soient importantes en raison du phénotype résultant de leur dégradation. Parmi eux :

- Le VMH : la lésion de ce noyau entraîne une hyperinsulinémie qui peut être améliorée par une section du nerf vague (Berthoud *et al.*, 1979). Cela suggère que la stimulation du VMH entraîne une stimulation sympathique et/ou une inhibition des fibres parasympathique se projetant vers le pancréas dans le but de diminuer la sécrétion d'insuline. Le VMH est capable de sentir les variations de concentration en glucose grâce à l'expression du récepteur GLUT2 (Dunn *et al.*, 1998). La diminution de la concentration en glucose dans la structure active l'AMPK et entraîne l'augmentation de la sécrétion de glucagon par le pancréas. À l'inverse, une augmentation de la concentration en glucose diminue la sécrétion de glucagon (McCrimmon *et al.*, 2008 ; Borg *et al.*, 1997). L'augmentation de la glycémie augmente l'insulinémie. L'insuline peut être également perçue par les neurones du VMH qui expriment son récepteur. Cette détection est essentielle au bon fonctionnement des cellules  $\alpha$  et  $\beta$  et diminue également la sécrétion de glucagon chez le rat grâce à une libération du GABA par les neurones du VMH (Paranjape *et al.*, 2010 ; Paranjape *et al.*, 2011).
- L'ARC : La régulation centrale de la sécrétion pancréatique dépend de la détection centrale du glucose. Il existe donc à ce titre des neurones qui sont stimulés par le glucose et d'autres inhibis par le glucose (ou activés par la diminution de la concentration en glucose) dans le SNC. L'ARC possède ces 2 types de neurones (Oomura *et al.*, 1969 ; Routh, 2002). De plus, les neurones AgRP de l'ARC sont directement impliqués dans la régulation sympathique du pancréas (Joly-Amado *et al.*, 2012).

La leptine, injectée centralement, supprime la sécrétion d'insuline liée au glucose (Park *et al.*, 2010). Ces effets semblent être liés à son activité dans l'ARC et le VMH, car y rétablir la signalisation de la leptine dans ces noyaux, chez un animal qui en est déficient, améliore l'hyperinsulinémie liée au modèle (Coppari *et al.*, 2005).

### 3. Communication avec le muscle

Le muscle est capable de capter le glucose grâce au récepteur GLUT4 pour sa propre utilisation, mais peut également servir de stockage. Après un repas, l'augmentation de la glycémie entraîne une production d'insuline par le pancréas. L'insuline produite stimule la capture du glucose par le muscle, très sensible à l'hormone. À l'inverse, l'obésité et la résistance périphérique à l'insuline

perturbent ce mécanisme (Kahn et al., 2000 ; Marino et al., 2011). Toutefois, il est possible pour le muscle de capturer le glucose sans intervention de l'insuline grâce à l'activité du système nerveux sympathique (Nonogaki et al., 2000), via l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques. Que ce soit via l'insuline ou le système nerveux sympathique, l'implication de l'hypothalamus a été démontrée. En effet, la stimulation du VMH active la capture du glucose par le muscle, sans intervention de l'insuline, mais bien en activant la voie sympathique (Shimazu et al., 1991 ; Sudo et al., 1991 ; Minokoshi et al., 1994). De même, la micro-injection de leptine dans le VMH augmente la capture du glucose dans le muscle via l'activation du système nerveux sympathique, entraînant la stimulation de la voie AMPK dans le muscle (Minokoshi et al., 1999 ; Minokoshi et al., 2002). D'autres études ont également montré que la signalisation centrale de la leptine stimule la phosphorylation d'AKT dépendante de l'insuline dans le muscle, augmentant la translocation de GLUT4 à la membrane des myocytes, et donc la capture du glucose (Roman et al., 2010 ; Funai et al., 2009). Enfin certains neurones de la LHA sont capables de produire de l'orexine A, en réponse au glucose. L'activité de l'orexine A sur le VMH promeut la capture du glucose dépendante de l'insuline par le muscle ainsi que la production de glycogène grâce à l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques (Shiuchi et al., 2009).

### III. Régulation de l'homéostasie lipidique par le système nerveux autonome

En complément du glucose, les lipides permettent à l'organisme de faire l'état de la balance énergétique. De nombreuses enzymes sont impliquées dans le métabolisme des lipides telles que la long chain acyl-CoA synthase (ACS), la carnitine palmitoyl-transferase 1 (CPT-1), la fatty acid synthase (FAS) ou encore les récepteurs  $\gamma$  activés par les proliférateurs de peroxysome (PPAR $\gamma$ ) dans les neurones du VMH et de l'ARC. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle l'hypothalamus est capable de détecter et métaboliser les lipides, dans le but d'adapter la réponse nerveuse envoyée vers les organes périphériques, comme le foie ou le tissu adipeux blanc, en conséquence de l'état énergétique de l'organisme (Le Foll et al., 2009 ; Sarruf et al., 2009).

La gestion du glucose n'est pas la seule fonction du foie. Il intervient également dans la production d'acides gras à partir du glucose en excès, la modulation de la production et sécrétion de triglycérides, de corps cétoniques ainsi que dans l'oxydation des acides gras. La stimulation sympathique du foie augmente la sécrétion de triglycérides dans le sang, bloque la production de corps cétoniques et inhibe l'expression de CPT-1, impliqué dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Yamauchi et al., 1998 ; Carreno et Seelaender, 2004). Plusieurs études ont montré l'importance du NPY, des modulateurs de l'activité des MCR3/4 et de la MCH dans la régulation centrale du métabolisme lipidique par le foie (Lam et al., 2007 ; Leckstrom et al., 2011 ; Wang et al 2010). L'infusion centrale et chronique de NPY entraîne une augmentation de la production hépatique des triglycérides. Ces effets sont indépendants de la prise alimentaire en raison du maintien du phénotype en condition pair-fed. Un troisième groupe d'animaux, injectés au NPY n'a accès qu'à la même quantité de nourriture ingérée par les animaux injectés au véhicule. Malgré une prise alimentaire moindre, les animaux injectés au NPY produisent plus de triglycérides. (Zarjevski et al., 1993).

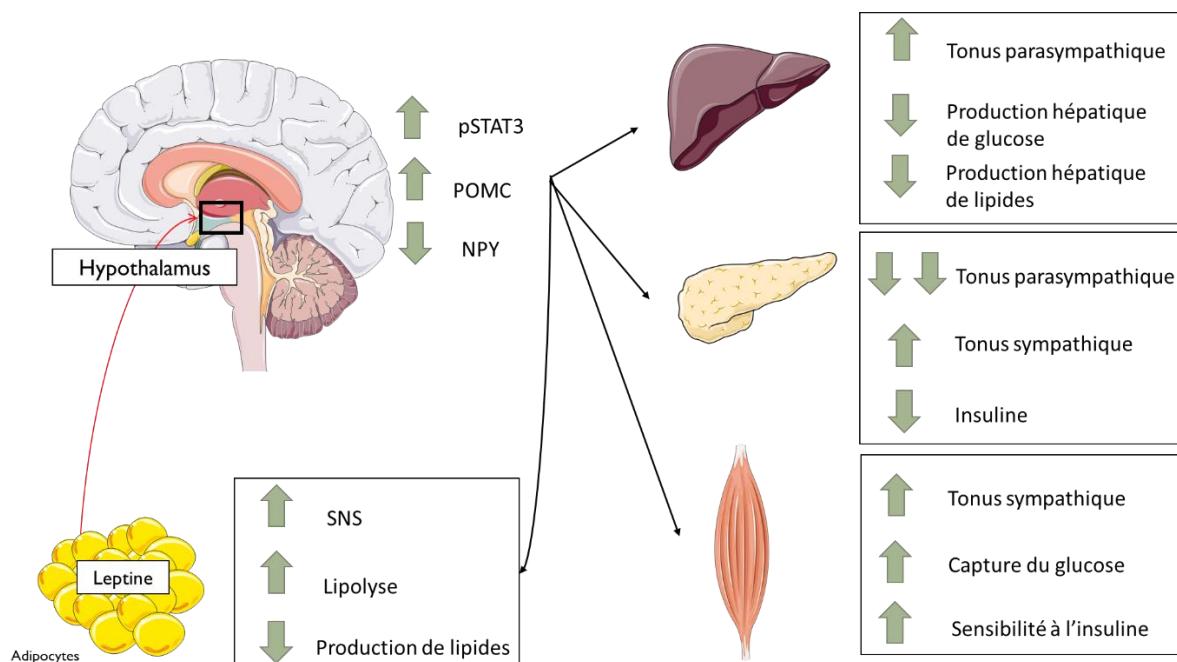
Si le métabolisme des lipides peut être modulé par le foie, le tissu adipeux blanc reste leur lieu de stockage principal. Il est à présent reconnu comme organe endocrine, grâce à la sécrétion des adipokines, mais il reste également un stock énergétique dans lequel l'organisme vient puiser si nécessaire (Ahima and Flier, 2000). Étant également richement innervé, le tissu adipeux possède de nombreuses connexions avec le système nerveux central qui pilote ses différentes fonctions. En raison de l'abondance des fibres dans le tissu, il semblerait que le système nerveux sympathique régisse majoritairement la communication entre le cerveau et le tissu adipeux blanc ainsi que la lipolyse, le nombre d'adipocytes et la sécrétion d'adipokines (Bartness et al., 2005 ; Bartness et

*al., 2010 ; Nogueiras et al., 2010*). L'implication parasympathique reste encore peu documentée (*Giordano et al., 2006 ; Kreier et al., 2007*). Chez l'Homme et le rongeur, les adipocytes expriment de nombreux récepteurs adrénnergiques dont les  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  et  $\beta 3$  qui stimulent la lipolyse et les  $\alpha 2$  qui inhibent la lipolyse en modulant l'activité de l'adénylate cyclase et de la protéine kinase A (PKA) (*van Baak, 2001 ; Fruhbeck et al., 2014*). Les fibres sympathiques innervant le tissu adipeux proviennent du tronc cérébral, mais également de l'hypothalamus indiquant son implication dans la régulation du métabolisme lipidique (*Shi and Batness, 2001*).

Les neurones à orexine A, présents dans la LHA modulent l'activité sympathique du tissu adipeux par leurs projections dans le tronc cérébral et la moelle épinière et l'activité des récepteurs à histamine H1 et H3. Plus la concentration en orexine A est importante dans la LHA, plus le système sympathique est activé (*Shen et al., 2008*). La MCH, produite dans ce même noyau, est également un médiateur de l'activité du tissu adipeux blanc. Son activité entraîne une augmentation de l'adiposité et diminue la lipolyse (*Imbernon et al., 2013*).

Le VMH intervient aussi dans l'activité du tissu adipeux blanc via les neurones CB1 et le système nerveux sympathique. De manière intéressante, la nature du régime appliqué aux animaux entraîne une modification de l'activité des neurones CB1. En régime normal, leur activité diminue la lipolyse, alors qu'en régime gras, ils promeuvent la lipolyse (*Ruffin et al., 1999 ; Cardinal et al., 2014*).

De nombreuses études ont montré que l'activité des récepteurs MCR3/4 hypothalamiques intervient dans la régulation de l'activité du tissu adipeux, indépendamment de la régulation de la prise alimentaire. Leur activation augmente le renouvellement et la sécrétion de la noradrénaline vers les adipocytes, stimulant la lipolyse et diminuant les stocks lipidiques (*Hwa et al., 2001 ; Raposo et al., 2003 ; Song et al., 2005 ; Brito et al., 2007*). Bloquer l'activité de ces récepteurs entraînera l'effet inverse (*Nogueiras et al., 2007*). De la même manière, si la sécrétion d' $\alpha$ -MSH est diminuée, la lipolyse est inhibée et les stocks lipidiques augmentent chez l'animal. Ces effets peuvent être renversés grâce à l'administration d'un agoniste des récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  adrénnergiques (*Kaushik et al., 2012*).



*Figure 8 : Résumé des actions de la leptine dans l'hypothalamus et les réponses autonomes associées au niveau des organes périphériques*

## IV. Régulation de la dépense énergétique par le système nerveux autonome

### 1. Rôle du tissu adipeux brun

Le tissu adipeux brun est directement impliqué dans la régulation de la dépense énergétique de par sa capacité à produire de la chaleur en réponse au froid ou à certains régimes (Cannon and Nedergaard, 2004 ; Morisson et al., 2014). S'il a toujours eu son importance chez les rongeurs, les animaux hibernants et les nouveau-nés, ce n'est que depuis une dizaine d'années qu'il a été détecté chez l'Homme adulte et présenté comme important dans la régulation du métabolisme énergétique (Nedergaard et al., 2007 ; van Marken Lichtenbelt et al., 2009). Il n'y a que certains dépôts qui présentent des fibres parasympathiques, mais il est toujours innervé par le système nerveux sympathique (Giordano et al., 2004). C'est au travers des récepteurs  $\beta$  adrénnergiques que le système nerveux exerce son contrôle sur ce tissu. Ils interviennent sur la production d'AMPc et l'activité de certaines kinases impliquées dans l'expression du gène UCP1. Cette protéine est présente sur la membrane interne des mitochondries du tissu adipeux brun et sert de canal à protons afin de dissiper le gradient électrochimique lié à la chaîne respiratoire mitochondriale, produisant de l'énergie sous forme de chaleur (Ricquier et al., 1991).

L'utilisation de certains virus traceurs rétrogrades, dans le tissu a permis de découvrir la provenance des fibres nerveuses autonomes responsables de l'innervation du tissu adipeux brun. À nouveau, plusieurs régions hypothalamiques sont impliquées (Bamshad et al., 1999) :

- L'ARC : Parmi les fibres détectées, on trouve les neurones CART et POMC. Leur présence est importante, car l'activation des récepteurs MC4R, via l' $\alpha$ -MSH, est indispensable pour réguler la thermogénèse sans frisson (production de chaleur due à l'activité du tissu pas à une activité musculaire) ou pour médier les effets de la leptine sur la production d'UCP1 dans le tissu adipeux brun (Berglund et al., 2014 ; Zhang et al., 2005). Mais les neurones AgRP sont également impliqués. En plus d'être des inhibiteurs des MC4R, leur activation atténue le « brunissement » du tissu adipeux blanc et active l'innervation sympathique du tissu adipeux brun (Shi et al., 2013 ; Ruan et al., 2014).
- Le VMH : Cette zone est un relai important dans la thermorégulation par le tissu adipeux brun au travers des neurones exprimant SF1. En effet, l'absence de ces neurones qui envoient des terminaisons vers l'ARC et le PVH, mais également vers des centres régulateurs du SNA comme le NTS ou le locus coeruleus, entraîne une diminution de l'expression d'UCP1 et de la dépense énergétique (Lindberg et al., 2013 ; Kim et al., 2011). Suite à l'intégration de signaux dans les neurones de cette zone du cerveau, il semblerait que l'activité de l'AMPK soit un élément essentiel à la modulation du tonus sympathique envoyé au tissu adipeux brun.
- Le DMH : Contrairement à la majorité des neurones impliqués, les neurones du DMH ne projettent pas directement vers la moelle épinière. Ils envoient plutôt des projections glutamatergiques vers le raphé pallidus qui médie leurs effets. L'activation du raphé stimule l'activité du tissu adipeux brun (Cao and Morrison, 2006). Cette structure serait également impliquée dans la limitation du phénomène de « Browning » dans le tissu adipeux blanc inguinale grâce au NPY, entraînant la diminution de la dépense énergétique. L'action de la leptine aurait un impact sur ce mécanisme notamment grâce à son rôle sur la production de NPY (Chao et al., 2011 ; Lee et al., 2013).

Toutefois, ce tissu est également extrêmement sensible à de nombreux facteurs circulants (insuline, leptine, GLP-1, hormones thyroïdiennes) pouvant interférer avec les effets du système nerveux autonome.

## **2. Rôle du muscle**

La thermogenèse par le frisson (production de chaleur grâce à une contraction des muscles) est également un moyen de régulation de la dépense énergétique sous contrôle du système nerveux autonome. La régulation de ce processus se fait essentiellement dans la région préoptique de l'hypothalamus qui intègre les informations provenant des thermorécepteurs grâce à des neurones répondant à la chaleur ou au froid et qui module le tonus sympathique envoyé aux fibres musculaires (Boulant et al., 1974).

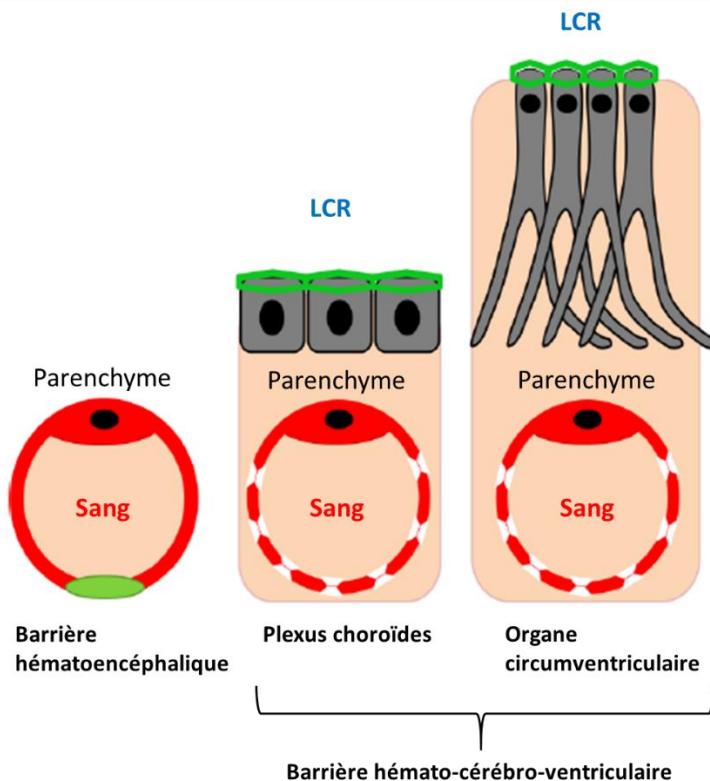
*Ainsi l'hypothalamus est capable de communiquer avec certains des principaux organes périphériques impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. Dans le premier chapitre, nous avons dans le premier chapitre qu'il est important pour les signaux métaboliques périphériques, dont la leptine, d'atteindre les noyaux hypothalamiques pour permettre leur intégration au sein d'un réseau neuronal afin de produire une réponse appropriée. Le second chapitre nous a permis de comprendre la communication de l'hypothalamus vers la périphérie. Il est donc maintenant important de saisir comment les signaux périphériques, majoritairement circulants, peuvent atteindre les noyaux hypothalamiques afin de réguler la balance énergétique. La littérature décrit principalement un accès via la BHE. Nous allons voir, au cours du troisième chapitre, qu'il existe plusieurs types de barrières au sein du cerveau et que chacune d'entre elles permettent un accès spécifique aux molécules circulantes, permettant la communication périphérie-cerveau tout en maintenant l'intégrité du tissu cérébral.*

## Chapitre 3 : Les barrières du système nerveux central, protection et communication ?

Les premiers travaux concernant les liens entre le sang périphérique et le cerveau remontent aux années 1880, avec les travaux de Paul Ehrlich. Ce dernier, en injectant un colorant dans la circulation systémique, remarqua que le colorant n'atteignait pas le système nerveux central (Ehrlich, 1904). Pensant d'abord qu'il s'agissait simplement d'une faible affinité cérébrale pour le marqueur, la notion de barrière n'apparaîtra qu'après la confrontation de cette étude avec d'autres ayant montré que certains agents n'avaient d'effet sur le cerveau que s'ils y étaient centralement injectés (Goldmann, 1913, Lewandosky, 1890). Ce n'est que dans les années 1930 que l'on commence à visualiser la structure de la barrière entre le sang et le cerveau telle que nous la connaissons actuellement, grâce à l'évolution des techniques d'étude comme la microscopie électronique. Le cerveau serait séparé de la circulation sanguine, protégé ainsi des éléments nocifs (exogène comme endogène) qu'elle peut contenir.

Plusieurs types de barrières entre la périphérie et le cerveau sont actuellement connus : la barrière hématoencéphalique (BHE), la barrière hémato-cérébro-ventriculaire (BHCV) et la barrière arachnoïdienne. Cette dernière est une structure, multicouche qui englobe la surface du système nerveux central afin de réabsorber certains composants du LCR vers le sinus sagittal. N'ayant qu'une très faible contribution dans la régulation de la balance énergétique, elle ne sera pas davantage décrite. Les notions de BHE et BHCV ont, encore récemment, été considérées comme équivalentes malgré leurs différences anatomiques et fonctionnelles. La BHE est la barrière la plus connue. Elle protège les structures centrales de leur exposition aux agents toxiques ou pathogènes présents dans le sang via l'endothélium de certains vaisseaux spécifiques, disséminés dans le parenchyme cérébral. Le système ventriculaire contenant le LCR est une zone sensible à la toxicité, car les vaisseaux proches de la structure n'ont pas de fonction de barrière. Donc contrairement à la BHE, cette fonction implique d'autres cellules présentes dans la BHCV. En fonction de l'emplacement, ce sont des cellules épithéliales ou épendymogliales qui possèdent ce rôle de barrière.

Toutefois, le sang contient également des nutriments, cytokines et autres signaux permettant la communication intra et inter-organes. Ces éléments doivent pouvoir atteindre le parenchyme cérébral afin de maintenir un milieu propice au bon fonctionnement neuronal. De plus, nous avons vu précédemment à quel point le SNC a besoin d'être informé ce qui se passe dans le reste du corps afin d'initier les processus appropriés à chaque situation. Nous verrons donc dans ce chapitre, les mécanismes impliqués dans le maintien de la protection du cerveau par ces différentes structures (BHE puis BHCV). Ensuite nous verrons les éléments intervenant dans la communication entre le cerveau et la périphérie dans la BHE et la BHCV.



**Figure 9 :** Représentation schématique des différentes barrières sang/cerveau. Il existe trois interfaces sang/cerveau actuellement décrites : La barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière hématocérébroventriculaire (BHCV) qui se compose des plexus choroïdes et des organes circumventriculaires (OCV). Ces interfaces sont constituées de cellules endothéliales (pour la BHE) ou d'une association de cellules endothéliales et cellules épendymaires (pour les plexus choroïdes et les OCV). La fonction de barrière est assurée par la présence de jonctions serrées (en vert). Au niveau de la BHE, cette fonction est portée par les cellules endothéliales, ce qui limite fortement la diffusion des molécules présentes dans la lumière du vaisseau (en rose). Pour la BHCV, les vaisseaux présentent des fenestrations (en blanc) facilitant la sortie des molécules de la circulation. Toutefois, elles ne diffusent pas librement dans le parenchyme cérébral mais restent dans l'espace périvasculaire. Leur accès vers le liquide céphalorachidien se fera via les cellules épendymaires où la fonction de barrière y est reportée. Adapté de la thèse de Fanny Langlet

## I. Éléments en charge de la protection du cerveau vis-à-vis du contenu sanguin

Même si la neurogenèse à l'âge adulte est de plus en plus décrite chez l'Homme comme chez le rongeur, elle reste très limitée et spécifique et ne permet pas réparer tous les dommages du cerveau. Il est donc essentiel qu'il se protège contre les agressions et maintienne un environnement propice à son fonctionnement optimal. Grâce à certains éléments, les différentes barrières du système nerveux central évitent l'exposition du cerveau à des molécules et pathogènes qui affectent son fonctionnement.

### 1. Au sein de la barrière hématoencéphalique (BHE)

Le parenchyme cérébral est richement vascularisé, pourtant le sang n'y diffuse pas librement. Afin de prévenir l'arrivée d'agents pathogènes dans le liquide interstitiel, présent autour des cellules du parenchyme et de maintenir un environnement propice à un bon fonctionnement du tissu cérébral, plusieurs mécanismes entrent en jeu. La notion de barrière est centrée ici sur les cellules endothéliales. Au sein de ces cellules, plusieurs protéines de structure forment ensemble des points de soudure intercellulaires observables en microscopie électronique : les jonctions serrées (Reese and Karnovsky, 1967). Ces jonctions limitent le transport paracellulaire entre le sang et le cerveau, mais polarisent également les cellules endothéliales en une zone lumineuse (vers la lumière du vaisseau) et abluminale (vers le cerveau) (Begley and Brightman, 2003 ; Wolburg et al., 2009). L'incapacité des ions à pouvoir passer du compartiment sanguin vers le compartiment intercellulaire cérébral, en vue d'équilibrer les charges, crée une résistance électrique dans les cellules endothéliales augmentant l'efficacité des jonctions serrées (Butt et al., 1990). Ce premier barrage est renforcé par la structure très spécialisée des capillaires présents. En effet, elle fait intervenir de éléments cellulaires formant un filtre supplémentaire.

### 1.1. Les jonctions serrées de la barrière hématoencéphalique

C'est à partir de complexes protéiques transmembranaires spécifiques que sont formées les jonctions serrées. Deux types de jonctions existent entre les cellules endothéliales et participent à la fonction de barrière de la BHE : les jonctions dites « très serrées » ou *zonulae occludens* et les jonctions adhérentes liant les membranes endothéliales entre elles.

Les *zonulae occludens* sont formées à partir de complexes protéiques transmembranaires et intracellulaires interagissant entre eux. Les occludines, claudines et protéines jonctionnelles (les Junctional adhesion molecule ou protéines JAM, les endothelial cell adhesion molecule ou protéines ESAM), présentes dans la membrane de chaque cellule endothéliale des capillaires de la BHE, se lient entre elles par liaison homophile (connexion avec la même protéine d'une cellule endothéliale adjacente). Bien que les occludines soient des protéines spécifiques des jonctions serrées, elles ne sont pas pour autant indispensables à leur formation. Les claudines, par contre, sont suffisantes à la formation des jonctions serrées (Furuse and Tsukita, 2006). Elles forment un large groupe de protéines dont les types 3, 5 et 12 ont été identifiés dans le SNC chez le rongeur et l'Homme. La claudine-5 est indispensable à l'intégrité de la BHE. Son absence entraîne la « fuite » des protéines allant jusqu'à 800 Da (Nitta et al., 2003). Les protéines JAMs interviennent dans la polarité cellulaire et indiquent le point de contact entre les zonulae occludens de type 1 (ZO-1) et l'occludine (Itoh et al., 2001). Les extrémités intracellulaires de ces protéines interagissent avec des protéines dites « échafaudages » via leur motif PDZ. Parmi elles, il y a ZO-1, ZO-2, les cingulines, les AF-6 et les 7H6 et servent de connecteurs avec le cytosquelette (Wolburg and Lippoldt, 2002).

Les jonctions adhérentes rapprochent les membranes cellulaires entre elles. Elles sont à nouveau composées de protéines transmembranaires, les VE-Cadhérines, interagissant entre elles via leurs parties extracellulaires (Dejana et al., 2008). De l'autre côté, les cadhérines interagissent entre autres avec des  $\beta$ -caténines, qui se fixent à leur tour à un complexe protéique intracellulaire composé d' $\alpha$ -actinines, de vinculines servant d'intermédiaire avec les filaments d'actine du cytosquelette. Ces jonctions interviennent davantage dans la régulation de la perméabilité endothéliale que dans la limitation du transport paracellulaire (Breier et al., 1996 ; Dejana et al., 2009). Toutefois, elles sont essentielles à la bonne formation des *zonulae occludens*, leur présence régulant l'expression de la claudine-3 et 5 (Liebner et al., 2008 ; Taddei et al., 2008).

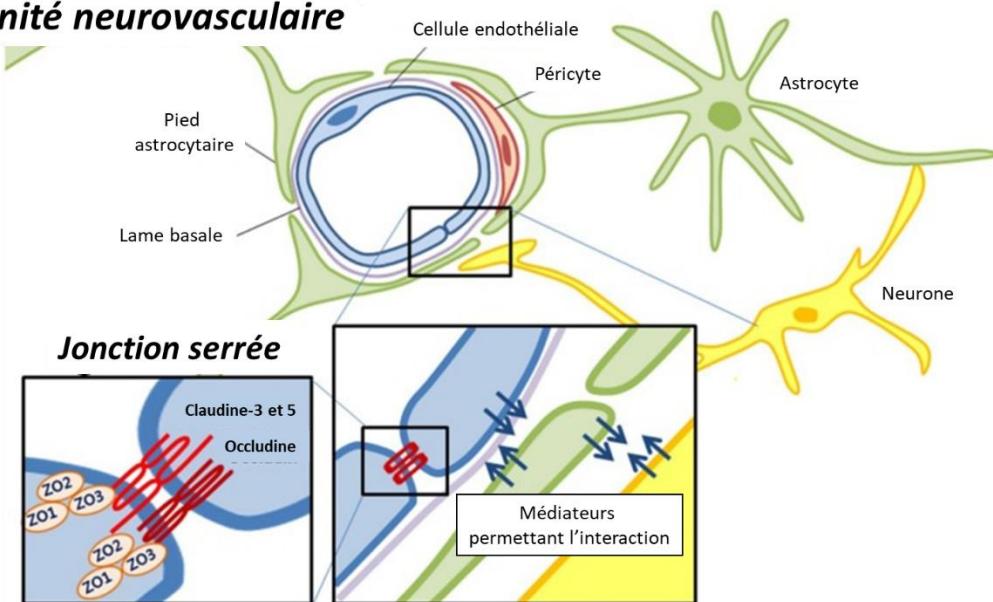
De manière ponctuelle, les cellules endothéliales expriment également des protéines transmembranaires telles que PECAM-1 intervenant dans l'intégrité de la BHE en cas de dommages (Graesser et al., 2002).

### 1.2. La structure des vaisseaux de la barrière hématoencéphalique

L'emplacement du vaisseau dans le SNC détermine certaines propriétés des vaisseaux de la BHE, certainement pour s'adapter au mieux à l'environnement local. Mais généralement, les vaisseaux de la BHE sont constitués d'une couche unicellulaire de cellules endothéliales particulièrement fine au niveau du SNC entourant la lumière du vaisseau. La présence de jonctions serrées forme une ceinture cellulaire polarisée. Associée au feuillet protoplasmique P de la membrane plasmique, l'ensemble est un endothélium continu, sans fenestrations qui limite la pinocytose (Brightman and Reese, 1969 ; Wolburg et al., 1994). Mais la face abluminale de l'endothélium présente une membrane basale surplombée d'une couche de cellules murales composée de péricytes et de cellules musculaires lisses (Sims, 1986). La membrane basale est une matrice extracellulaire sécrétée par les cellules endothéliales et les péricytes. Elle est principalement composée de collagène de type IV, de laminine et de glycoprotéines. Il y a en moyenne entre 1 et 3 péricytes pour une cellule endothéliale (Shepro and Morel, 1993). Grâce à un cytosquelette contractile, les péricytes participent à la contraction des vaisseaux, permettant la régulation du flux sanguin (Hall et

*al., 2014).* En communiquant ponctuellement avec les cellules endothéliales grâce aux jonctions adhérentes ou communicantes, les péricytes seraient impliqués dans des fonctions permettant le maintien de la fonction des vaisseaux et l'angiogenèse (*Cuevas et al., 1984 ; Armulik et al., 2011*). Une autre couche est formée par plusieurs pieds astrocytaires qui recouvrent la totalité de la structure et sécrètent une nouvelle lame basale. Ces cellules sont capables de sécréter des molécules capables de moduler la structure de la BHE (*Abbott et al., 2006*). Elles favorisent aussi les propriétés de barrière en coculture avec des cellules endothéliales ainsi qu'*in vivo* dans des structures périphériques (*Dehouck et al., 1990 ; Neuhaus et al., 1991 ; Janzer and Raff, 1987*). L'accumulation de couches cellulaires augmentent la fonction de barrière des cellules endothéliales. Mais les propriétés individuelles de chaque couche, associées à une interaction mutuelle de ces éléments entretiennent aussi une régulation fonctionnelle et structurale fine de la BHE. L'ensemble de ces couches de cellules vasculaires et neurales interagissant ensemble est appelé unité neurovasculaire.

### **Unité neurovasculaire**



*Figure 10 : Schéma de l'unité neurovasculaire.*

### **2. Au sein de la barrière hématocérebroventriculaire (BHCV)**

En plus du liquide interstitiel, le liquide céphalorachidien (LCR) est également préservé de tout contact direct avec le compartiment vasculaire, car la BHCV sépare ces 2 systèmes. Le LCR est contenu dans tout le système ventriculaire (ventricules latéraux, 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> ventricules) passant d'un ventricule à l'autre par les foramens de Monro et de Sylvius. Après un passage dans les foramens de Magendie et Luschkae il circule également autour du SNC dans les espaces subarachnoïdiens et dans les citermes internes. Le LCR est renouvelé plusieurs fois par jour, chez le rongeur (12 fois/jour) comme chez l'Homme (5-6 fois/jour). Sa composition change de façon dynamique, en fonction de son site de production, la vitesse de son flux ou encore le rythme circadien. Elle est donc primordiale au maintien de l'homéostasie du SNC (régulation de l'osmolarité, du pH environnant, transmission de signaux au parenchyme) (*Cutler et al., 1968 ; Rudick et al., 1982 ; Praetorius and Damkier, 2017*). Le LCR est produit essentiellement par les plexus choroïdes, flottant à certains endroits du système ventriculaire. Il y en a un dans chaque ventricule latéral, un dans le 3<sup>e</sup> et un dans le 4<sup>e</sup> ventricule. Ce tissu est composé d'une couche de cellules épithéliales qui surplombe un stroma richement vascularisé. La BHCV est plus permissive que la BHE. Les vaisseaux de la BHCV, présentant des fenestrations, permettent à l'eau, aux ions et aux petites

molécules de diffuser librement (Wolburg and Paulus, 2010 ; Lorke et al., 2008). C'est donc au niveau des cellules épithéliales des plexus choroïdes que la fonction de barrière est établie. De plus, certainement en lien avec une origine embryonnaire commune, les cellules épithéliales sont connectées aux cellules épendymaires qui forment la majeure partie des parois ventriculaires. Malgré la présence de ZO-1 et d'occludine, ces cellules sont liées entre elles par des jonctions gap et permettent la diffusion de certaines molécules entre le LCR et le parenchyme cérébral (Whish et al., 2015 ; Del Bigio et al., 2010).

Enfin, il existe de petites zones dans lesquelles une molécule injectée en intraveineux peut diffuser (Ueno et al., 2000). En effet, au niveau de certaines zones périventriculaires, les vaisseaux ne présentent pas les propriétés de barrière décrites pour la BHE. Ces zones ont été décrites dans les années 50 et appelées organes circumventriculaires (OCVs) (Hofer, 1958 ; Davson et al., 1987). Les cinq OCVs sont répartis en deux groupes :

- Les OCV considérés comme « senseurs » regroupant l'organe subfornical (OSF), l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) et l'area postrema. Dans ces structures, des neurones sont en contact avec les vaisseaux afin de détecter les informations transmises via le sang.
- Les OCV considérés comme « sécrêteurs » composés de l'éminence médiane (EM) et la neurohypophyse. Dans ces régions neurosécrétrices, les cellules cérébrales relarguent leurs produits directement dans les vaisseaux.

Certains auteurs ajoutent la glande pinéale dans les OCV sécrêteurs, pourtant isolée du cerveau et loin du système ventriculaire. L'organe subcommissural avait également été proposé comme étant un OCV, mais ne présente pas le même type de vaisseaux. Enfin, d'autres considèrent les plexus choroïdes comme des OCVs en raison de leur structure semblable. Ces derniers vont être décrits dans une partie à part, nous allons considérer comme OCVs les structures décrites dans la liste ci-dessus.

Dans la suite de ce paragraphe, nous allons voir les processus mis en place par les plexus choroïdes et les OCVs pour maintenir la protection du cerveau.

### ***2.1. Au niveau des plexus choroïdes***

#### ***2.1.1. Production du LCR***

Parmi ses multiples rôles, le LCR assure une protection, tout d'abord, mécanique du SNC lors d'un choc en formant une couche de fluide autour de ce dernier. De plus, pendant la phase de sommeil principalement, des échanges ont lieu entre le liquide interstitiel et le LCR par convection (Iliff et al., 2012 ; Xie et al., 2013). Le LCR facilite donc également le drainage des produits neurotoxiques accumulés dans la phase d'activité pour élimination. La production de ce liquide par les plexus choroïdes est ainsi une première source de protection par la BHCV. Cela est rendu possible grâce à un transport actif d'ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{d}'\text{HCO}_3^-$  par la pompe ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et l'activité de l'anhydrase carbonique. Ce flux d'ions entraîne un transport osmotique d'eau. La sécrétion de liquide par l'épithélium choroïde est ensuite possible grâce à la présence de canaux de type aquaporines au pôle apical (Ghersi-Egea et Damkier, 2017). Une diminution de la sécrétion de LCR a été constatée au cours du vieillissement et de maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer suggérant ainsi de ce processus est impliqué dans la protection du tissu cérébral à long terme (Serot et al., 2012 ; Carrion et al., 2001).

#### ***2.1.2. Les jonctions serrées des plexus choroïdes***

C'est, à nouveau, grâce à la microscopie électronique que l'on a découvert que les cellules épithéliales des plexus choroïdes présentent des jonctions serrées. Ces jonctions ont été observées

à des âges précoces de développement embryonnaire chez le poisson zèbre, le poulet, le mouton et l'Homme, dès la formation des plexus, révélant leur grande importance dans la protection du cerveau (Mollgaard and Saunders, 1975 ; Henson et al., 2014 ; Wakai and Hirokawa, 1981). Il a largement été démontré que comme pour les vaisseaux de la BHE, l'occludine, les claudines 1-3 ainsi que ZO1-3 apparaissent dans la formation de zonula occludens entre les cellules des plexus choroïdes, prévenant la diffusion paracellulaire. L'expression de la protéine Alix dans ces cellules épithéliales est, par contre, essentielle afin de maintenir l'expression de ces jonctions serrées au niveau du pôle apical (Campos et al., 2016). Bien que la BHE soit capable de transporter des molécules qui ne passent pas la BHCV, cette dernière ne possède pas une aussi grande résistance électrique que la BHE (Brightman and Reese, 1969). Cela peut s'expliquer par la présence de claudine-2 et de jonctions adhérentes notamment, permettant la diffusion paracellulaire d'ions et d'eau (Rosenthal et al., 2017). La BHCV est également une barrière qui semble plus adaptative que la BHE en raison de la plus grande variété de protéines exprimées et leur plasticité. Beaucoup de types différents de claudines sont exprimés dans les plexus choroïdes, plus ou moins sensibles à l'inflammation ou au stress oxydatif. De plus, il a été montré que l'expression de protéines de jonction dans les plexus choroïdes dépend de la photopériode chez l'animal saisonnier (Lagaraine et al., 2011). La perturbation de ces protéines pourrait être, entre autres, à l'origine de perturbations de la composition du LCR comme lors de l'ischémie (Ennis and Keep, 2006).

## 2.2. Au niveau des organes circumventriculaires

Les OCVs sont généralement organisés de façon similaire : une partie vasculaire, composée d'un plexus de capillaires fenestrés ; une couche intermédiaire contenant de nombreuses cellules gliales et neuronales et une couche de cellules épendymaires hautement spécialisées. Un marquage pour la protéine associée aux vésicules du plasmalemme (Plvap chez le rat et MECA-32 chez la souris), constituant de fenestrations vasculaires est observé au niveau des vaisseaux des OCVs (Ciofi et al., 2009 ; Ciofi et al., 2011). Toutefois, la présence de fenestrations au sein des vaisseaux n'entraîne pas une diffusion libre des composants du sang vers le parenchyme, cette diffusion est même plutôt faible. En effet, un certain nombre d'études semblent montrer une perméabilité vasculaire jusqu'à 10000 Da dans les OCV « sensoriels » et elle diminue dans les OCV « sécréteurs » entre 2000 et 4000 Da (Morita et al., 2015 ; Schaeffer et al., 2013). Les molécules de hauts poids moléculaires restent cantonnées dans la partie la plus centrale des vaisseaux des OCV et ne sont pas extravasées. La membrane basale de la zone vasculaire des OCV contient de la laminine, pouvant servir de barrière aux grosses molécules chargées (Hallmann et al., 2015 ; Morita et al., 2015 ; Furube et al., 2014). La présence ou non de marqueurs de jonctions serrées (Claudine-5, Occludine, ZO-1) dans les vaisseaux des OCV « sensoriels » est discutée. Quand ils sont observés, l'expression est limitée à une petite population de vaisseaux présente sur la portion distale des OCVs « sensoriels » (Langlet et al., 2013 ; Willis et al., 2007 ; Petrov et al., 1994 ; Morita et al., 2015). Ces éléments semblent renforcer l'hypothèse d'une diffusion limitée des molécules suite à leur extravasation au sein des OCV. Les parties distales des OCVs contiennent des populations de cellules gliales, exprimant fortement la Glial fibrillary acidic protein (GFAP). Grâce à la microscopie électronique, des jonctions serrées ont été décrites au niveau de ces cellules (Krisch et al., 1978 ; Petrov et al., 1994). Comme pour les plexus choroïdes, il semblerait que la fonction de barrière des OCV soit délocalisée au niveau de ces cellules épendymogliales. Au sein de l'EM, ces cellules sont appelées tanyctyes. Elles seront décrites plus précisément dans la dernière partie de cette introduction. La présence de jonctions serrées entre chaque tanyctye, empêchant la diffusion paracellulaire, leur confère la fonction de barrière entre le sang périphérique et le LCR du 3V (Mullier et al., 2010 ; Langlet et al., 2013).

## II. Éléments en charge de la communication entre le sang et le cerveau dans les différents types de barrières cérébrales

La présence de jonctions serrées au niveau des différentes barrières du SNC entraîne : l'absence de pores intercellulaires, une très faible pinocytose, ainsi que la polarisation des cellules impliquées dans cette fonction. Ces éléments leur conférant les propriétés d'une membrane continue, le maintien d'un environnement propice au fonctionnement normal du cerveau, ainsi qu'une bonne communication avec la périphérie nécessite la mise en place de plusieurs mécanismes. Nous allons voir que les mécanismes sont différents en fonction de la nature des molécules impliquées.

### 1. Au sein de la barrière hématoencéphalique (BHE)

Les mécanismes de transfert des molécules au travers de la BHE suivent la courbe d'Oldendorf. C'est une formule mathématique mettant en relation la capacité de transport de l'endothélium avec les propriétés physico-chimiques des molécules à transporter. Parmi ces propriétés, on retrouve la solubilité dans les graisses, leur masse et leur conformation dans l'espace. Au niveau de la BHE, il existe ainsi plusieurs moyens de transport permettant la communication entre le sang et le parenchyme cérébral. C'est ce que nous allons décrire.

#### 1.1. Le transport médié par les lipides

Les propriétés physico-chimiques des membranes cellulaires des cellules endothéliales autorisent passage de molécules lipophiles au travers de la BHE. En effet, les molécules qui possèdent un coefficient de partage propice à leur passage au travers de la membrane de la BHE sont liposolubles (Clark, 2003). Le coefficient dépend du poids moléculaire, de la structure moléculaire comme du nombre de ponts hydrogène (inversement proportionnel au passage dans les lipides), de leur état post-traductionnel comme le taux de sulfatation, (inversement proportionnel au transport). Le transport des hormones stéroïdiennes illustre très bien ce mécanisme. Elles traversent la BHE par un processus de diffusion transcellulaire non saturable. Mais toutes les molécules ne sont pas liposolubles et nécessitent la présence de systèmes intervenant dans l'efflux des molécules entre le sang et le LCR (Miyajima et al., 2011).

#### 1.2. Le passage médié par un transporteur

En raison de la très faible diffusion des molécules polaires de la circulation systémique dans les lipides, leur passage au travers de la BHE nécessite la présence de transporteurs spécifiques (Zhang et al., 2002). Ces derniers peuvent être exprimés sur la face lumineuse, abluminale des cellules endothéliales de la BHE ou sur les deux faces. Le transport peut être passif ou actif (impliquant des canaux ou récepteurs, uni ou bidirectionnel). Cela donne lieu à des flux adaptatifs de solutés polaires permettant de maintenir la concentration optimale de nutriments essentiels dans le milieu interstitiel. Ce mode de transport a été mis en évidence en 1965 pour le D-Glucose (Crone et al., 1965). Contrairement à la périphérie, le transporteur du glucose dans le cerveau est GLUT1 (Glucose transporter type 1). Il transporte également le mannose, le galactose, le deoxyglucose ou le 3-O-méthyl glucose. Il existe de nombreux transporteurs dédiés aux acides aminés neutres (LAT1), basiques (CAT1), à l'adénosine (CNT2), au lactate (MCT1) dont les constantes d'activité et de liaison avec un ligand ont été déterminées (pour revue voir Abbott et al., 2010 ; Kamiie et al., 2008 ; Lyck et al., 2009 ; Dahlin et al., 2009).

#### 1.3. Le passage actif médié par un transporteur couplé à l'ATP

Même si les propriétés physico-chimiques d'une molécule semblent propices à la diffusion dans les lipides (solubilité), elle ne traverse pas toujours les membranes des vaisseaux. C'est le cas pour beaucoup de médicaments et métabolites destinés à sortir du cerveau pour être éliminés de

l'organisme. Ces substances sont prises en charge par une série de transporteurs présents majoritairement sur la face lumineuse des vaisseaux de la BHE. Ils vont pouvoir créer un flux asymétrique de leurs substrats, du cerveau vers le sang, grâce à la consommation d'énergie sous forme d'ATP. Ces transporteurs sont regroupés sous le terme de transporteurs ABC (ATP-Binding-Cassette). Parmi les plus connus, il y a les glycoprotéines-P (ou ABCB pour ATP-binding Cassette subfamily B), les MRPs (Multidrug Resistance-associated Proteins) ou les BRCPs (Breast Cancer Resistance Proteins) (Begley, 2004). Leurs activités dépendent de plusieurs paramètres tels que l'âge, l'état global de santé, l'expression de certains facteurs tels que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Zeevi et al., 2010 ; Hawkins et al., 2010). En raison de la position de ces transporteurs, le rôle de ce type de transport consiste principalement à réduire la concentration de certaines molécules liposolubles, potentiellement toxiques pour le tissu cérébral. Toutefois, des études récentes ont pu montrer l'existence d'un transport actif bidirectionnel, coopératif qui ne se limite pas aux cellules endothéliales (Roberts et al., 2008 ; Wolburg et al., 2009).

#### 1.4. Le passage par transcytose

Nous avons vu précédemment que la présence de jonctions serrées au niveau de la BHE empêchait le passage de nombreuses molécules à haut poids moléculaire afin d'éviter la pénétration d'agents toxiques dans le parenchyme cérébral. Toutefois, certains peptides produits par les tissus périphériques uniquement sont utilisés par les cellules du SNC. C'est le cas de l'insuline, dont le transport vers le cerveau a été visualisé par autoradiographie dans les années 50 (Kojima et al., 2004 ; Haugaard et al., 1954). Ces peptides ou protéines sont transportés au niveau de la BHE par un procédé qui consiste à capturer le substrat dans la cellule pour le transporter vers sa cible intracellulaire ou le relarguer au pôle opposé de la cellule. C'est la transcytose. Il en existe 2 types au niveau de la BHE :

- La transcytose médiée par un récepteur : Le substrat, en se fixant sur son récepteur, initie la formation d'une vésicule puis est internalisé sous forme d'un complexe ligand-récepteur. Ce complexe va ensuite pouvoir circuler en intracellulaire pour atteindre sa cible ou être exocyté. De nombreuses protéines sont transportées par ce biais au niveau de la BHE (pour revue, voir Abbott et al., 2010). En fonction du cas, la dissociation du complexe peut être réalisée durant le transit intracellulaire ou l'exocytose. C'est un mode de transport très sélectif et rapidement saturable.
- La transcytose adsorptive : Ce mode de transport ne concerne que les molécules chargées positivement comme la poly-L-Lysine, la penetratine ou la Trans-activator of Transcription (TAT) (Hervé et al., 2008). En pharmacologie, elles sont communément utilisées en tant que transporteurs de principes actifs. Grâce à l'énergie électrostatique, le processus d'endocytose débute au contact de la protéine avec la membrane cellulaire, chargée négativement en conditions physiologiques. Ensuite, elles pourront suivre les mêmes étapes que le mécanisme décrit précédemment. Ce mode de transport est moins sélectif, mais également moins rapidement saturable.

Contrairement aux cellules endothéliales présentes dans les tissus périphériques, peu de vésicules d'endocytose sont observées dans les cellules endothéliales de la BHE (Claudio et al., 1989). Il semble donc que le transport de molécules au travers de la BHE soit fortement régulé. Ainsi la BHE n'est pas uniquement une barrière, mais forme une interface très sélective dont la composition est hétérogène en fonction de la zone du cerveau étudiée.

#### 2. Au niveau de la barrière hématocérébroventriculaire (BHCV)

En plus de ces fonctions neuroprotectrices, le LCR est connu pour avoir une influence sur le métabolisme du cerveau en maintenant l'environnement électrolytique et transportant des

nutriments. Les plexus choroïdes sécrètent de nombreuses molécules actives (facteurs de croissance, hormones, neurotransmetteurs...) qui peuvent ainsi circuler dans tout le système ventriculaire. De plus, ils récupèrent les produits issus du métabolisme cellulaire pour être éliminés. La BHCV est donc un acteur important dans la gestion de la communication entre le sang et le cerveau. Nous allons décrire les arguments favorables à la communication au travers de la BHCV et les mécanismes de transport impliqués.

### ***2.1. Au niveau des plexus choroïdes***

Si le LCR peut être considéré comme un élément de protection mécanique du cerveau, il est également un excellent vecteur de communication. Sa composition permet de stabiliser celle du liquide interstitiel du parenchyme. Le LCR est majoritairement composé d'eau, mais contient également de nombreux éléments essentiels au fonctionnement des neurones : nutriments, vitamines, facteurs de croissance, hormones. Il a aussi une fonction épuratrice des composants toxiques présents dans le parenchyme. Nous allons donc voir par quels moyens les plexus choroïdes permettent une communication entre le sang et le LCR.

#### ***2.1.1. Une zone propice aux échanges***

C'est au niveau des plexus choroïdes que le sang circule à la vitesse la plus importante jamais observée dans le système nerveux : environ 4 ml/g/min (Szmydynger-Chodobska et al., 1994). De plus, l'endothélium qui forme les vaisseaux de la BHCV, présente des fenestrations et exprime MECA32 (Ciofi et al., 2011 ; Mullier et al., 2010). Ainsi, les molécules allant jusqu'à 800 kDa peuvent diffuser facilement jusqu'au stroma des plexus. L'expression de cette protéine est dépendante du TGF- $\beta$ , de l'angiopoïétine, et du VEGF conférant aux vaisseaux choroïdiens une plasticité faisant varier la diffusion et permet le maintien de composition du LCR (Nourhaghighi et al., 2003 ; Maharaj et al., 2008). Une membrane basale vasculaire et subépithéliale, composée majoritairement de collagène de type IV sert de premier « filtre » aux grosses molécules cationiques, mais reste très perméable à de nombreuses molécules hydrophiles (Peress et Thompkins, 1981). Puis l'épithélium choroïdien présente, au niveau de ses pôles basal et apical, des microvillosités augmentant ainsi la surface de contact entre le sang, leur membrane et le LCR (Keep and Jones, 1990). Enfin, pour rappel, les cellules épithéliales des plexus choroïdes présentent des jonctions serrées formées de claudines de type 2 ainsi que des jonctions adhérentes rendant possible la diffusion paracellulaire (Rosenthal et al., 2017).

#### ***2.1.2. Transport des molécules du sang vers le LCR par les plexus choroïdes***

Le LCR étant produit majoritairement par les plexus choroïdes, sa composition dépend, en grande partie, des mécanismes impliqués pour le former. La diffusion des molécules dans les cellules épithéliales dépend, à nouveau, majoritairement des paramètres de solubilité dans les graisses. Grâce à la présence de jonctions serrées, les cellules épithéliales sont polarisées. Cette polarité empêche la diffusion paracellulaire de petites molécules solubles, favorisant l'expression sélective de transporteurs sur la face basale des cellules épithéliales (Spector and Johanson, 2006). Comme décrit pour la BHE, l'entrée d'une grande partie de composés (glucose, vitamines, ions, nucléotides, peptides...) est réalisée via un transport actif ou passif. Afin de garantir le passage des ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> et HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> vers le LCR, les pompes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase et le cotransporteur Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> sont exprimés au niveau du pôle apical (Johanson et al., 2002). Dans les plexus choroïdes, le transport est bidirectionnel, permettant la récupération et la sortie de métabolites et autres molécules du LCR (Brinker et al., 2014). La concentration en protéines dans le LCR est très faible par rapport à celle du plasma. La présence d'un gradient protéique entre les deux milieux indique que malgré la présence de jonctions serrées plus permissives, le transport des protéines au travers de la BHCV est lent.

Il existe plusieurs moyens de transport pour les protéines au sein des plexus choroïdes : diffusion, pinocytose et transcytose. La diffusion semble être empruntée par de petites molécules dont la concentration dans le CSF est inversement proportionnelle à leur masse moléculaire. La pinocytose concerne de plus grandes molécules (Rapoport and Pettigrew, 1974). Le transport de l'albumine ou les immunoglobulines dont le ratio « concentration LCR/concentration plasma » dépend de ces types de transport. La capacité de transport de l'albumine reste un indicateur de référence pour déterminer la perméabilité des « barrières » du SNC. (Keir and Thompson, 1986 ; Alesire et al., 1985). La transcytose concerne les hormones polypeptides et les grosses molécules. Les mécanismes de transcytose dans les plexus choroïdes sont les mêmes que pour la BHE. Le transport du fer (par le récepteur transferrine) et de l'insuline (via son récepteur spécifique) suivent ce mode transport dans les plexus choroïdes. Toutefois, il existe des mécanismes de transcytose propres aux plexus choroïdes. Certains composants, tels que le folate, traversent de nombreux tissus grâce à des transporteurs, mais traversent les plexus choroïdes grâce à leur récepteur spécifique (récepteur  $\alpha$  au folate) (pour revue voir Strazielle and Ghersi-Egea, 2016).

#### **2.1.3. Production et sécrétion de protéines par les plexus choroïdes**

En plus de transporter des protéines du plasma vers le LCR, les plexus choroïdes sont capables de produire des protéines avant de les sécréter dans le LCR. En effet, il contient 80% de protéines provenant du plasma, mais également 20% de protéines directement produites par l'épithélium (Felgenhauer, 1974). Cela est possible grâce à la forte concentration en organelles intracellulaires dans les cellules épithéliales des plexus choroïdes qui permettent la synthèse et la maturation des protéines produites et accumulées (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi) et la production importante d'énergie sous forme d'ATP (mitochondries), nécessaire à toute cette machinerie. La sécrétion de protéines semble provenir de protubérances membranaires au pôle apical (Agnew et al., 1980).

Enfin, l'épithélium des plexus choroïdes est sensible aux changements physiologiques du cerveau, au cycle circadien ainsi qu'aux signaux provenant du SNC et de la périphérie comme l'inflammation. Il adapte ainsi ces fonctions de transport et de sécrétion (Quinela et al., 2015 ; Szmydynger-Chodobska et al., 2009).

#### **2.1.4. Le flux du LCR**

Un flux régulier de LCR dans le système ventriculaire est essentiel au développement du SNC ainsi qu'au maintien de son équilibre métabolique. La perturbation du flux du LCR entraîne de multiples dysfonctionnements cérébraux (Johanson et al., 2008). Mais, en plus de transmettre des informations au tissu environnant grâce à des mouvements de liquide, le flux constant de LCR permet également à la composition du LCR de rester stable. Si le flux de LCR diminue, le gradient de concentration entre le sang et le LCR ainsi que la concentration en protéines plasmatiques dans LCR augmente (Reiber, 1994). Plusieurs paramètres interviennent dans ce processus de mise en mouvement du LCR. La pression hydrostatique, liée aux gradients de concentration dans les plexus choroïdes et arachnoïdiens permet d'avoir un flux continu et unidirectionnel du LCR (Johanson et al., 2008). Un flux pulsatile de LCR vient s'ajouter au premier, attribuable à la combinaison des cycles cardiaques ressentis dans les artères cérébrales et le battement rythmique des cils présents sur la face apicale des plexus choroïdes et des épithéliocytes présents dans tout le système ventriculaire (Banitzs et al., 2005 ; Bulat and Klarica, 2011). La fréquence de battements des cils présents sur la partie ventrale des parois du 3V dépend de neurones à MCH dont les terminaisons axonales viennent activer les récepteurs MCHR1 exprimés dans des cellules au contact des parois ventriculaires. L'absence de ces récepteurs entraîne l'augmentation de la taille des ventricules certainement causée par d'un dysfonctionnement du flux de LCR (Conductier et al., 2013). L'étude du transport du LCR au sein du 3V a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs flux

indépendants permettant une mise en circulation du liquide finement régulée par un réseau de petits motifs locaux de battements ciliaires. Ces mouvements de liquide semblent présenter des différences selon que l'animal soit actif ou au repos (Faubel et al., 2016). Il semble donc important de prendre en considération l'ensemble des paramètres à l'origine du flux de LCR pour mieux appréhender la communication entre le sang, le LCR et le tissu cérébral.

Les plexus choroïdes forment donc une autre interface importante qui possède un rôle de protection et communication. La barrière formée par les plexus choroïdes possède des points communs et des différences structurels et fonctionnels avec la BHE. Son activité dépend davantage de son intégrité que de l'expression de certaines protéines. Cette intégrité est connue pour varier tout au long de la vie de l'individu. D'abord très importante pour le développement du SNC du fœtus, la BHCV est très active durant le développement. Elle reste active au cours de la vie d'adulte, mais sa fonction protectrice diminue au cours du vieillissement, suggéré comme une faille impliquée dans le développement des maladies neurodégénératives.

### *2.2. Au niveau des organes circumventriculaires*

Les OCVs jouent également des rôles prépondérants dans la communication entre le sang et le LCR. Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions de détection des informations, ainsi que de l'envoi d'informations. Ainsi, leur perturbation peut être impliquée dans de nombreuses pathologies (Sisó et al., 2010). De plus, les OCVs sont soumis à une forte plasticité adaptative en réponse à un déséquilibre homéostatique (glycémie, natrémie, inflammation...).

Les OCVs « senseurs », surtout l'OVLT et le SFO, sont impliqués dans la gestion de la pression osmotique en détectant les variations de Na<sup>+</sup>. Cette détection implique la stimulation du canal cationique TRPV1 (Transient receptor potential vanilloid 1) entraînant l'activation des cellules épendymogliales (Mannari et al., 2013). La natrémie peut également détectée, grâce à la présence du canal sensible au Na<sup>+</sup> (Nax), présent sur ces mêmes cellules (Hiyama et al., 2002 ; Watanabe et al., 2006). Une fois l'information captée, un flux d'eau est absorbé par les astrocytes de la zone, ce qui limite l'apport hydrique dans le parenchyme (Ayrus et al., 2008). De la même façon, le lipopolysaccharide des bactéries Gram-négatif peut être détecté grâce à la présence du récepteur TLR4 dans les cellules épendymogliales des OCVs « senseurs ». Après leur stimulation, la phosphorylation de STAT3 a été constatée, pouvant intervenir dans la synthèse de l'enzyme cyclooxygenase-2 (Charkravarty and Herkenham, 2005 ; Nakano et al., 2015).

Les OCV « sécréteurs » présentent, au sein de la zone intermédiaire, décrite précédemment, de nombreuses terminaisons qui libèrent leur contenu dans la circulation où vers des structures communicantes. À ce titre, les cellules des OCVs présentent de nombreuses mitochondries, vésicules et un réticulum très développé (Dellmann and Simpson, 1976). Les terminaisons des neurones à oxytocine/vasopressine de la neurohypophyse sécrètent ces deux hormones dans les capillaires de la neurohypophyse (Miyata and Hatton, 2002). Grâce à l'éminence médiane, les cellules magnocellulaires du noyau supraoptique et paraventriculaire vont activer les neurones de la neurohypophyse. Enfin, de nombreux axones vont également relarguer, dans les vaisseaux fenestrés, les neurohormones stimulant la sécrétion des hormones adénohypophysaires (Prevot et al., 2018 ; Clasadonte et al., 2018).

*La BHE est un élément essentiel dans le maintien de l'homéostasie de l'environnement cérébral (pH, concentration en électrolytes, protection contre les pathogènes...) en évitant le contact direct du tissu cérébral avec le sang périphérique, via la présence de jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales. Toutefois, ces jonctions, en compartimentant les cellules endothéliales, permettent de tolérer le transport transcellulaire entre le sang et l'unité neurovasculaire. Ainsi, la diffusion de certains composants plasmatiques est possible, mais reste extrêmement limitée, en termes de distance, et est très sélective.*

*Les interfaces de la BHCV présentent des capillaires fenestrés et transfèrent la fonction de barrière à un ensemble de cellules gliales. Ce sont ces cellules qui présentent les marqueurs de jonctions serrées. Ces structures, plus permissives que la BHE, en contact avec le LCR et le sang, suggèrent une communication facilitée entre le cerveau et l'environnement périphérique à ces niveaux.*

*Cette communication sang-cerveau est primordiale pour le contrôle de multiples fonctions neuroendocrines. La maintenir est donc crucial. Nous avons vu que les noyaux hypothalamiques sont des éléments centraux dans la régulation de ces fonctions. La leptine agissant tout particulièrement l'hypothalamus et l'ARC, garantir l'accès aux informations dans cette zone en particulier, constitue une étape indispensable à la genèse d'une réponse appropriée. S'il existe des vaisseaux de type BHE au sein du parenchyme hypothalamique, l'éminence médiane semble également être une interface tout à fait appropriée aux échanges. La dernière partie de cette introduction permettra la description de cette structure ainsi que son implication dans la régulation du métabolisme énergétique.*

## Chapitre 4 : L'éminence médiane et les tanocytes, acteurs de l'interface sang/hypothalamus dans la régulation du métabolisme énergétique

L'éminence médiane fait partie des OCV « sécréteurs ». Elle est localisée au niveau du plancher cérébral, à la base du 3<sup>e</sup> ventricule contenant le LCR et adjacente aux ARC droit et gauche. Elle se situe donc à un endroit stratégique du cerveau en ce qui concerne la régulation homéostatique de nombreuses fonctions. Contrairement à l'ARC, il n'y a pas de vaisseaux de type BHE. Cela suggère un accès facilité aux signaux périphériques au travers de l'éminence médiane, mais également la nécessité d'une organisation structurale toute particulière afin d'assurer une sélectivité dans les échanges. Au sein de l'éminence médiane, en plus de la présence de nombreux axones neuronaux sécréteurs, une population de cellules épendymogliales réalise la jonction entre les vaisseaux et le LCR : les tanocytes. Nous décrirons dans ce chapitre les différents éléments composant cet OCV ainsi que la place des tanocytes dans le maintien de l'interface sang/cerveau ainsi que leur rôle dans la régulation du métabolisme énergétique.

### I. Description anatomique de l'interface sang/hypothalamus

#### 1. La circulation sanguine de l'interface sang/hypothalamus

L'éminence médiane est une structure richement vascularisée. Le sang qui y circule provient des artères hypothalamiques venant former deux plexus : le plexus capillaire primaire et le plexus capillaire secondaire. Le plexus capillaire primaire possède une partie dite superficielle venant au contact de la partie externe de l'éminence médiane et recevant les peptides et neurohormones produites par les axones neuronaux sécréteurs. Mais il donne également naissance à de longues anses capillaires pouvant entrer plus en profondeur dans l'éminence médiane (plexus capillaire profond), voire le noyau arqué et redescendre vers le plexus superficiel. Le plexus capillaire profond est en contact étroit avec l'épendyme de l'éminence médiane, à un flux ralenti, suggérant des échanges entre le sang et le LCR ([Talanti et Kivalo, 1961](#)). Enfin le plexus primaire se déverse dans le plexus capillaire secondaire pour rejoindre l'hypophyse et y permettre l'accès des facteurs ([Duvernoy et Risold, 2007](#)).

#### 2. Les vaisseaux de l'interface sang/hypothalamus

Caractéristiques des OCVs, les vaisseaux de l'éminence médiane n'expriment pas les protéines de jonctions serrées. Leur paroi est plus fine et ils expriment des marqueurs de fenestrations tels que MECA-32 chez la souris et PV-1 chez le rat ([Ciofi et al., 2009 ; Ciofi et al., 2011 ; Mullier et al., 2010](#)). Cette caractéristique favorise l'accès de petites molécules au sein du parenchyme en comparaison avec les vaisseaux de la BHE, faisant de l'éminence médiane la « fenêtre du cerveau » ([Gross et Weindl, 1987](#)). Le facteur de croissance vasculaire VEGF un facteur impliqué dans la plasticité vasculaire de l'éminence médiane car il est connu pour augmenter l'expression de MECA-32 dans les vaisseaux de l'EM. La baisse de la glycémie lors d'une mise à jeun de 24H entraîne une augmentation du nombre d'anses vasculaires positives à MECA32 dans l'EM et l'ARC ([Strickland et al., 2005 ; Langlet et al., 2013a](#)).

Contrairement aux vaisseaux du plexus primaire superficiel, les vaisseaux de l'ARC ne sont pas aussi perméables. L'injection de Bleu Evans dans la circulation périphérique montre une diffusion du colorant dans le parenchyme de l'éminence médiane, mais pas dans l'ARC. Il semble même retenu dans les vaisseaux de l'EM. Les vaisseaux de l'ARC sont principalement de type BHE ([Mullier et al., 2010](#)). Toutefois, certaines études indiquent que la fonction de barrière de ces vaisseaux

serait plus faible que dans le reste de l'hypothalamus, voire que certains seraient fenestrés (Norsted et al., 2008 ; Ciofi et al., 2011).

### 3. L'épendyme de l'interface sang/hypothalamus

L'observation de la morphologie des cellules qui bordent les ventricules cérébraux a permis de montrer l'existence de plusieurs types de cellules épendymaires. La taille, la forme des cellules ou encore la présence de cils sont autant de facteurs qui permettent leur caractérisation. Au début du 20<sup>e</sup> siècle, Sterzi s'est intéressé à la base des replis de l'EM et a constaté la présence de 2 types de cellules épendymaires : celles qui présentent de longs processus correspondant aux tanocytes et celles ressemblant à des cellules épendymales cubiques se trouvant majoritairement sur la partie dorsale du 3V (Sterzi, 1909).

#### 3.1. Les cellules épendymales cubiques

Les cellules cubiques qui bordent la partie dorsale du 3V ont une structure proche de celles bordant les ventricules latéraux, ainsi que le 4<sup>e</sup> ventricule. Elles présentent des cils motiles qui, en battant de façon coordonnée, permettent le maintien d'une bonne circulation du LCR dans le système ventriculaire. En plus des cils, des protéines de surface cellulaire telles que les cadhéries sont impliquées dans la mise en mouvement du LCR car l'altération de l'expression de ces protéines entraînent une hydrocéphalie ou des perturbations du flux de LCR. Ces cellules possèdent des jonctions serrées, exprimant la claudine 5, ZO-1 et l'occludine (Mullier et al., 2010). Malgré le fait que ces cellules soient connectées aux plexus choroïdes, elles ne forment pas une barrière étanche (Ghersi-Egea et al., 2018). En effet, certaines grosses molécules du LCR sont capables de diffuser et atteignent le parenchyme hypothalamique (Broadwell et Brightman et al., 1976).

#### 3.2. Les tanocytes

En descendant ventralement le long du 3V, la morphologie des cellules qui le bordent changent progressivement. Observées pour la première fois par Ramon y Cajal, les tanocytes ont été décrit comme ressemblant à des cellules de glie radiale embryonnaire (Ramon y Cajal, 1909). En 1954, Horstmann emploie pour la première fois le terme « tanocyte » (« Tanus » en grec qui veut dire allongé) pour parler de ces cellules bipolaires présentant un pôle apical rond faisant face au LCR et un long prolongement basal dirigé vers le parenchyme cérébral (Horstmann, 1954). Contrairement aux cellules épendymaires cubiques, les tanocytes ne présentent pas ou peu de cils. Le flux de LCR contenu dans la partie ventrale du 3V est donc relativement calme, suggérant que l'endroit soit propice à de multiples échanges (Kutcuoglu et al., 2007). Les observations de l'EM en microscopie électronique ont permis de constater que les tanocytes contactaient aussi bien les vaisseaux fenestrés de l'EM que des vaisseaux de type BHE présents dans le parenchyme ou des neurones (Wittkowski, 1967 ; Mazzuca, 1974 ; Güldner et Wolff, 1973). Les tanocytes présentent également des marqueurs de jonctions serrées, notamment au niveau de leur pôle apical. Ainsi, comme décrit pour les plexus choroïdes, la fonction de barrière est portée par des cellules gliales. Dans l'éminence médiane, ce sont les tanocytes qui jouent ce rôle de gardien (Mullier et al., 2010 ; Langlet et al., 2013b). Mais ces cellules ne forment pas une population cellulaire uniforme. En fonction de leur position autour du ventricule, leur fonction, leur morphologie, le type cellulaire en contact avec leur prolongement basal, ils ont pendant longtemps été classés en 4 groupes : les  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\beta$ 1 et les  $\beta$ 2 (Akmayev et al., 1973). Cette classification semble évoluer, grâce aux nouvelles techniques qui ont permis d'affiner les groupes. Nous allons décrire ces différents groupes.

##### 3.2.1. Les tanocytes de la partie dorsomédiale de l'ARC, du VMH et du DMH

Ce groupe comprend plus ou moins les tanocytes  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2. Ces cellules, au corps cellulaire cylindrique et à la surface membranaire lisse, sont disposées le long du ventricule et se projettent vers les noyaux du DMH, du VMH et de la partie dorsale de l'ARC. Leurs corps cellulaires

contiennent beaucoup d'euchromatine, un réticulum sarcoplasmique développé, accompagné d'un imposant complexe Golgi-Réticulum Endoplasmique-Lysosome. Ces éléments sont étroitement associés à de multiples vésicules et mitochondries suggérant un important système autorisant l'entrée et sortie de nombreuses molécules, la signalisation calcique et la biosynthèse de lipides (Rodriguez *et al.*, 2019 ; Liu et Zhu, 2017). La membrane apicale présente des microvillosités ainsi que 2 cils qui semblent non-motiles, qui serviraient préférentiellement à l'augmentation de la zone de contact avec le LCR et les molécules qui le composent (Mirzadeh *et al.*, 2017). Le pôle basal est composé de microtubules tout au long de son prolongement. La partie terminale se sépare et se présente sous forme de poire au contact des vaisseaux présents dans le parenchyme. Des astrocytes sont parfois présents au contact des tanocytes de cette zone mais aucun contact avec un neurone ne semble avoir été constaté (Rodriguez *et al.*, 2019). Ces tanocytes ne présentent pas une organisation de type barrière linéaire. En effet, l'expression de ZO1 et de l'occludine étant assez aléatoire au niveau de l'apex peut expliquer la diffusion de traceurs entre le LCR et ces noyaux hypothalamiques (Mullier *et al.*, 2010).

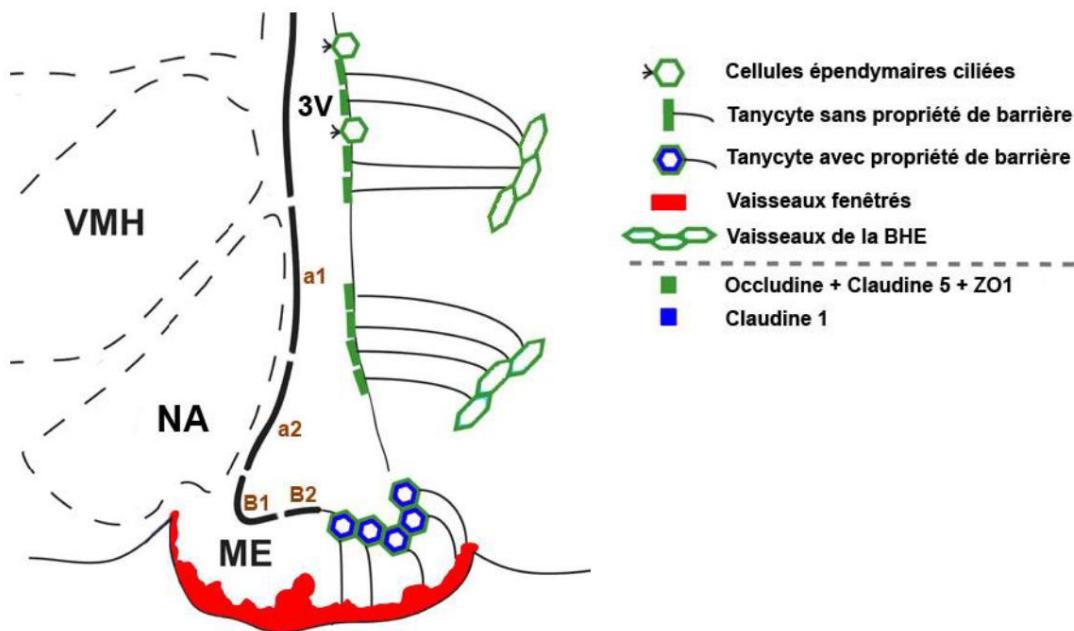
### 3.2.2. Les tanocytes de la partie ventromédiane de l'ARC

Ce groupe représente les tanocytes qui servent d'interface entre le l'EM et l'ARC. Ils projettent dans la partie la plus ventrale de l'ARC ainsi que l'infundibulum de l'EM (la partie la plus latérale). Ils ont été regroupés ensemble grâce à l'expression commune de la cornifine A (SPRR1A) (Campbell *et al.*, 2017). Ces tanocytes possèdent également une origine embryonnaire commune avec les tanocytes précédemment décrits. En effet, ils dérivent d'une lignée cellulaire bordant le plancher du ventricule exprimant le ligand de la signalisation Hedgehog (Shh) (Mirzadeh *et al.*, 2017). À nouveau, le corps cellulaire est cylindrique présentant parfois des microvillosités et un cil primaire. Ils possèdent également une machinerie de transport et de sécrétion ainsi que de multiples vésicules. Enfin, trois types de terminaisons ont été décrites grâce à la microscopie électronique (Rodriguez *et al.*, 1979). Les jonctions serrées de ces tanocytes possèdent une particularité. L'expression de ZO1 et de l'occludine est toujours présente, mais l'organisation de la jonction dépend du type de vaisseau auquel le pôle basal contacte. Quand il s'agit d'un vaisseau de type BHE, les jonctions sont diffuses alors qu'en contactant un vaisseau fenestré, les jonctions prennent une structure en nid d'abeille. Cette plasticité a été constatée lors de modifications du métabolisme énergétique (Mullier *et al.*, 2010 ; Langlet *et al.*, 2013b).

### 3.2.3. Les tanocytes de l'éminence médiane

Les tanocytes de l'éminence médiane correspondent au type  $\beta$ 2 et forment le plancher du 3<sup>e</sup> ventricule. Ils ont un corps cellulaire plat, sans microvillosités un long prolongement vers les vaisseaux fenestrés et la lame basale de l'éminence médiane. Contrairement aux 2 autres groupes de tanocytes, les tanocytes de l'EM ne dérivent pas de cellules exprimant Shh (Rizzoti *et al.*, 2017). La machinerie nécessaire à l'endocytose et l'exocytose est présente au sein des 2 pôles ainsi que des granules de sécrétion. La clathrine et la cavéoline 1 sont également exprimées dans les tanocytes de l'éminence médiane (Peruzzo *et al.*, 2004). Il est donc très probable qu'ils possèdent donc un rôle de sécrétion en plus de leur rôle structural au sein de l'EM. La présence d'un réseau de jonctions serrées autour de chaque tanocyte est portée par l'expression forte et uniforme de ZO-1, de l'occludine, de la claudine 1 et de la claudine 5. Cette structure en « nid d'abeille » crée une vraie barrière, empêchant la diffusion paracellulaire après l'extravasation de molécules via les vaisseaux fenestrés. Au sein de l'éminence médiane, les tanocytes permettent de faire la jonction entre le milieu sanguin et le LCR. La communication via des signaux peptidiques et humoraux périphériques semble donc être favorisée par la transcytose au travers des tanocytes (Mullier *et al.*, 2010 ; Langlet *et al.*, 2013b).

Les tanocytes sont donc des cellules qui possèdent des caractéristiques différentes en fonction de chaque groupe. Cela suggère que chacun d'entre eux peut prétendre à une fonction particulière relative à son emplacement. La morphologie de l'éminence médiane augmente l'accessibilité des signaux métaboliques périphériques du sang vers le LCR et les tanocytes servent de relai entre ces 2 milieux. Le prochain paragraphe va mettre l'accent sur le rôle que peuvent jouer ces cellules épendymogliales dans un contexte précis : la régulation du métabolisme énergétique.



**Figure 11 :** Schéma représentant l'organisation de l'interface sang/cerveau au niveau de l'hypothalamus médio-basal. Cette région cérébrale est particulière car elle intègre plusieurs types d'interface sang/cerveau. En effet, on y trouve tout d'abord des vaisseaux de la barrière hématoencéphalique (BHE) dans le noyau arqué (ARC) et des vaisseaux fenêtrés dans l'éminence médiane (EM). Les tanocytes, cellules épithéliales bordant le plancher du 3ème ventricule, appartiennent également à cette interface sang/cerveau. Les tanocytes  $\beta$  (B1 et B2) bordent l'éminence médiane, contactent les vaisseaux fenêtrés et possèdent des propriétés de barrière afin d'assurer l'homéostasie cérébrale. Les tanocytes  $\alpha$  (a1 et a2) bordent l'ARC et le VMH et contactent des vaisseaux de la BHE : l'homéostasie cérébrale étant assurée par ces vaisseaux, les tanocytes  $\alpha$  n'expriment donc pas de propriétés de barrière (tiré de Mullier et al., 2010).

## II. Implication des tanocytes dans la régulation du métabolisme énergétique

### 1. La plasticité de la BHCV de l'hypothalamus médiobasal

La perturbation de la balance énergétique altère la structure de la barrière entre le sang et l'hypothalamus (Prevot et al., 2013). En fonction du statut nutritionnel, plusieurs modifications ont été constatées au sein de l'éminence médiane. Cette plasticité observée suggère que les tanocytes possèdent la capacité de détecter les variations en nutriments pour induire ces changements. La mise à jeûn pendant 24H promeut une augmentation importante de la fenestration des vaisseaux dans l'éminence médiane et du noyau arqué ventromédian (ARCvm), mais pas dans les vaisseaux de type BHE présents dans le parenchyme hypothalamique (Langlet et al., 2013). Ces changements sont accompagnés d'une augmentation de l'organisation des jonctions serrées au sein des tanocytes du ARCvm grâce à l'augmentation de l'expression de la Claudine 1 dans la totalité des tanocytes du ARCvm. Ainsi, la sortie des facteurs sanguins des vaisseaux fenêtrés vers le parenchyme est limitée. Ces modifications, au niveau des vaisseaux et des tanocytes, seraient dues à une augmentation de l'expression du VEGF-A dans l'éminence médiane et dans les tanocytes. Ce facteur de croissance vasculaire agirait sur les cellules endothéliales de l'éminence médiane sur les récepteurs VEGFR1 et 2. Fonctionnellement, cette modification structurale de l'éminence

médiane faciliterait l'accès des molécules provenant du sang jusqu'à l'ARC. Pour exemple, après 24H de mise à jeun, la concentration en glucose augmente drastiquement dans l'ARC seul. Elle passe de 0,5 mM à 2mM, sachant que la glycémie est 5mM. Cela favorise également l'accès à l'hormone orexigène sécrétée par l'estomac, la ghéline, facilitant ainsi l'activation des neurones orexigènes de l'ARC (NPY). La leptine peut également passer plus facilement. Une augmentation du marquage pSTAT3 dans le ARCvm a été observée mais pas ARCdm. Ce dernier est éliminé si traitement au LAN (antagoniste de la leptine), suggérant bien que l'augmentation de p-STAT3 soit dépendante de l'activité de LepR ([Langlet et al., 2013](#) ; [Schaeffer et al., 2013](#)).

## 2. Le contrôle de la sécrétion neuroendocrine de TRH

La production des hormones thyroïdiennes est régulée par un axe mettant en relation l'hypothalamus, l'hypophyse et la glande thyroïde : l'axe thyréotrope. L'hypothalamus possède des neurones capables de produire l'hormone thyréotrope (TRH). Le froid, le stress ou encore une grossesse sont des facteurs impactant la production de TRH. Cette hormone est sécrétée au niveau de l'éminence médiane et active les cellules thyréosensibles de l'hypophyse. Cela entraîne la production et la sécrétion hypophysaire de thyréostimuline (TSH) dans la circulation sanguine. Le cortisol et la somatostatine sont connus pour inhiber la production de TSH. Enfin, la glande thyroïde répond à l'activation des récepteurs à la TSH en produisant la triiodothyronine (T3, forme active de l'hormone thyroïdienne) et thyroxine (T4, forme inactive de l'hormone thyroïdienne). Il est possible de passer d'une forme à l'autre sous l'action de 3 enzymes : la deiodinase 1 (Dio1) et la deiodinase 2 (Dio2) qui permettent la formation de la T3 à partir de la T4. La deiodinase 3 (Dio3) transforme la T3 en T4. Les 2 hormones thyroïdiennes sont capables d'exercer un rétrocontrôle négatif sur la production de TRH dans l'hypothalamus. De nombreux organes et tissus répondent aux hormones thyroïdiennes favorisant globalement un métabolisme de type catabolique (augmentation de la consommation d'oxygène, de la glycolyse, de la lipolyse...).

Il semblerait que les tanocytes jouent un rôle important dans la régulation de l'axe thyréotrope grâce à un rôle dans la régulation de la sécrétion de TRH. Les pieds des tanocytes de l'éminence médiane sont en contact direct avec les axones des neurones à TRH avant qu'ils ne le sécrètent dans la circulation ([Sanchez et al., 2009](#)). Les tanocytes expriment également l'enzyme permettant la dégradation de la TRH (Trhde). Cela suggère que les tanocytes pourraient affecter la biodisponibilité de la TRH avant sa sécrétion. De manière intéressante, les tanocytes sont les cellules du cerveau qui expriment le plus la Dio2 ([Diano et al., 2003](#) ; [Guadano-Ferraz et al., 1997](#)). De plus, ils expriment également 2 transporteurs clés de la T3 et T4 : MCT8 et le polypeptide transporteur d'anions OATP1C1 ([Roberts et al., 2008](#)). Les tanocytes pourraient donc capturer la T4 depuis la circulation ou le LCR afin de la convertir en T3 et induire le rétrocontrôle de la sécrétion de TRH. En sécrétant ensuite la T3, les tanocytes de l'EM, en contact avec les neurones TRH, pourraient influer sur leur activité ([Fekete et al., 2014](#)).

Mais la sécrétion de T3 par les tanocytes pourrait également avoir un impact direct sur la régulation du métabolisme énergétique en jouant sur l'activité des neurones de l'ARC. La mise à jeun entraîne une augmentation de l'expression de Dio2 dans les tanocytes, leur permettant de produire et sécréter plus de T3. Cette hormone est connue pour avoir une influence sur l'activité des neurones NPY/AgRP en condition de jeûne ([Coppola et al., 2007](#)) et l'injection de T3 dans le LCR entraîne une augmentation de la prise alimentaire ([Kong et al., 2004](#)). Une étude récente a montré que la T3 centrale, via la modulation des neurones SF1 présents dans le VMH, a un impact sur le métabolisme hépatique grâce au nerf vague et la thermogenèse du tissu adipeux brun via le système sympathique ([Martinez-Sanchez et al., 2017](#)).

Enfin une étude récente a montré que l'activation du récepteur à la TRH de type 1 dans les tanocytes entraîne l'augmentation du calcium intracellulaire grâce au canal calcique Gαq/11. Cette augmentation augmente la croissance des pieds tanycytaires au niveau de leur contact avec les neurones TRH ainsi que l'activité de l'enzyme Trhde. En l'absence de ce canal calcique dans les

tanocytes grâce à l'utilisation d'un virus Dio2 dépendant exprimant la Cre recombinase, les taux plasmatiques de TSH sont plus importants démontrant ainsi l'interaction entre les tanocytes et l'axe thyréotrope (Müller-Fielitz *et al.*, 2017).

### **3. La plasticité tanycytaire impliquée dans la saisonnalité**

Chez les animaux saisonniers, la régulation du métabolisme énergétique comme la prise alimentaire, la gestion des stocks énergétiques ou la thermogenèse sont des paramètres qui dépendent de la durée du jour ou photopériode. Les changements de quantité d'énergie lumineuse sont perçus et entraînent la synchronisation de l'activité des noyaux suprachiasmatiques. Ces groupes de neurones sont des régulateurs internes des rythmes circadiens. L'activité maîtrisée de ces neurones entraîne une sécrétion adaptée de mélatonine par la glande pinéale. Parmi les récepteurs à la mélatonine se trouve le récepteur GPR50. Il semble être impliqué dans la gestion de la thermogénèse, car en son absence, l'animal entre en importante hypothermie après un jeûne (Bechtold *et al.*, 2012). Ces mêmes animaux sont également résistants au régime gras (Ivanova *et al.*, 2006). GPR50 est fortement exprimé dans les tanocytes de l'éminence médiane et son expression y varie en fonction de la photopériode, l'activité de l'axe thyréotrope et la leptinémie (Sidibe *et al.*, 2010 ; Barrett *et al.*, 2006 ; Bechtold *et al.*, 2012). Cela suggère, à nouveau, que les tanocytes sont impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique.

La concentration plasmatique de T3 est également très sensible aux variations de lumière. Cela pourrait expliquer les changements de prise alimentaire chez les animaux hibernants en fonction des périodes de l'année. Ces variations peuvent s'expliquer par la variation photopériodique d'expression de l'enzyme Dio2 et Dio3 dans les tanocytes (Ebling, 2015). Chez les oiseaux et les rongeurs saisonniers, durant la photopériode longue (été), l'expression de la Dio2 augmente dans les tanocytes entraînant une forte sécrétion de T3 dans le sang et hypothalamus, augmentant ainsi la prise alimentaire. Au cours de la photopériode courte (hiver), l'expression de la Dio3 est augmentée, réduisant la prise alimentaire.

### **4. Les tanocytes en tant que senseurs métaboliques**

Les tanocytes ont récemment été démontrés comme étant glucosenseurs et plus largement comme étant de vrais senseurs des modifications de composition du LCR. Leur position, proche du 3V en font des alliés de poids. La destruction des murs du 3V modifie la réponse induite dans l'hypothalamus après une hypoglycémie. Cette réponse est restaurée quand ces cellules sont à nouveau fonctionnelles (Sanders *et al.*, 2004). De plus, les tanocytes expriment les protéines impliquées dans la détection du glucose que sont GLUT2, la glucokinase et le canal potassique dépendant de l'ATP (Garcia *et al.*, 2003 ; Thomzig *et al.*, 2005 ; Millan *et al.*, 2010). À nouveau, il existe une dichotomie de l'expression des différents marqueurs impliqués dans la détection du glucose en fonction du type de tanocytes. Une étude récente a également montré que l'expression de GLUT2 se ferait au niveau des pieds des tanocytes de l'EM et que le transport cellulaire rapide du glucose serait dépendant de GLUT6 présent dans le cytoplasme. De plus, l'absence de ces 2 protéines entraîne une réduction de la concentration en glucose dans le LCR (Martinez *et al.*, 2019). Ces tanocytes n'expriment pas GLUT1 contrairement aux tanocytes de l'ARC. L'application de glucose au niveau de ces cellules entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium associée à une augmentation de la quantité d'ATP dans le milieu extracellulaire (Frayling *et al.*, 2011). Il semblerait que cela soit possible grâce à une communication entre les différents tanocytes adjacents grâce à la présence d'hémidesmosomes formés par les connexines 43 qui activeraient les récepteurs purinergiques P2Y1 initiant ainsi la propagation du signal calcium à travers les tanocytes (Orellana *et al.*, 2012). L'ATP ainsi relargué peut fournir de l'adénosine, son métabolite et ainsi servir de modulateur de l'activité neuronale (neurones NPY, AgRP...). Cela se fait au travers des récepteurs purinergiques, modifiant ainsi l'activité des neurones et affectant également le comportement alimentaire (Yang *et al.*, 2015 ; Xu *et al.*, 2016 ; Kittner *et al.*, 2006).

Les tanocytes permettraient ainsi d'informer les neurones de la concentration en métabolites énergétiques (Dale, 2011).

Pour détecter les molécules sucrées, les tanocytes expriment également le récepteur au stimulus sucré Tas1r2 (Benford et al., 2017). C'est un récepteur couplé aux protéines G qui détecte tant le sucre que les édulcorants qui miment le sucré (Masuda et al., 2012). L'application de contenus sucrés au plus près des tanocytes de l'ARC induit une vague calcique dans ces cellules (Benford et al., 2017). Le mécanisme de propagation du signal calcique nécessite à nouveau le relargage de l'ATP par les tanocytes et l'activation des récepteurs purinergiques P2Y1 (Frayling et al., 2011). Ces différents mécanismes peuvent fonctionner en collaboration au sein de la population de tanocytes. En effet, les animaux KO Tas1r2 montrent une glucosensibilité tanycyttaire plus faible que les animaux WT, mais elle n'est pas abolie.

Toutefois il est également possible que les neurones puissent sentir le glucose directement et que l'environnement paracrine (ATP, lactate et autres facteurs) puisse influer sur cette détection. Ces résultats suggéreraient toutefois une réelle interaction neurone-glie permettant la régulation du métabolisme énergétique. D'autres métabolites du glucose comme le lactate peuvent être relargués par les tanocytes et agir sur les récepteurs membranaires présents dans le parenchyme (Tang et al., 2014) ou entrer directement dans les neurones pour être utilisés en tant que carburant (Clasadonte et al., 2017). En effet, les tanocytes expriment les transporteurs au monocarboxylate (MCT) 1 et 4 permettant les efflux de lactate. Le KO MC1 ou de la glucokinase sélectivement dans les tanocytes entraîne une augmentation de la prise alimentaire et une prise de poids (Elizondo-Vega et al., 2015 ; Uranga et al., 2017). De l'autre côté, les neurones AgRP ou NPY expriment les MCT2 ce qui permet l'entrée du lactate dans ces neurones. Il est donc probable que les tanocytes et les neurones communiquent pour réguler la balance énergétique.

Il reste toutefois beaucoup d'éléments à élucider pour pouvoir connaître les mécanismes impliqués (l'utilisation du lactate, ATP en tant que gliotransmetteurs). En plus de la détection du glucose, les tanocytes semblent également être impliqués dans la détection des concentrations en monoamines (Lazutkaite et al., 2017) et en acides gras (Hofmann et al., 2017). Sur ce dernier point, une étude récente montre que le facteur de croissance fibroblastique 21 (FGF21), considéré comme un signal de stress énergétique, dont l'expression est augmentée lors de la mise à jeun dans le foie, le tissu adipeux blanc et brun, est produit et sécrété par les tanocytes. Quand l'animal est privé de nourriture pendant 24H la présence d'acides gras libres comme le palmitate dans le sang augmente. Cela est associé à l'augmentation de l'expression de *Fgf21* dans les tanocytes. Les auteurs ont proposé qu'à la détection du palmitate, les tanocytes activeraient la production de FGF21. Ce facteur passerait dans le LCR, et pourrait impacter la dépense énergétique via l'inhibition de certains neurones hypothalamiques comme les neurones à GnRH, à angiotensine-vasopressine ou à TRH (Geller et al., 2019).

## 5. Les tanocytes, cellules progénitrices neurales

Il est à présent démontré qu'en plus de la zone sous-ventriculaire du ventricule latéral (SVZ) et sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (SGZ), l'hypothalamus est une zone sujette à la neurogenèse à l'âge adulte. L'inhibition dans l'exécution de cette fonction entraîne des perturbations dans le contrôle central de la balance énergétique. Cela a été constaté en condition physiologique ou après altération du métabolisme de base comme lors d'un régime gras (Djogo et al., 2016 ; Lee et al., 2012 ; Li et al., 2012 ; Li et al., 2014 ; Kokoeva et al., 2005 ; Gouazé et al., 2013 ; Lee et al., 2014). Ainsi, bloquer la prolifération, la survie et la neurogenèse des cellules exprimant le marqueur de prolifération SRY-related HMG-box gene 2 (Sox2) dans l'hypothalamus médiobasal favoriserait l'apparition de troubles métaboliques à long terme (Li et al., 2012 ; Li et al., 2014). De même, empêcher les cellules exprimant le protéoglycane NG2, présentes dans l'éminence médiane, de se diviser entraîne une prise de poids significative (Djogo et al., 2016). De plus, les neurones issus de la neurogenèse tanycyttaire, colonisant l'ARC, répondent au signal

métabolique leptine via la phosphorylation de STAT3 (Haan et al., 2013). Chez l'Homme, quatre zones de l'hypothalamus ont été décrites comme étant des niches de cellules souches grâce à la colocalisation de certains marqueurs cellulaires avec les marqueurs de progéniteurs : un ruban de cellules étoilées bordant le 3V, une population de cellules étoilées dans le noyau suprachiasmatique mais également les cellules épendymaires et les tanyocytes. Ces deux dernières populations sont d'ailleurs les seules retrouvées chez le rongeur et le primate non humain (Pellegrino et al., 2018). Il semblerait donc que les tanyocytes forment une population de cellules souches non négligeable. S'il n'existe actuellement pas de techniques permettant d'intervenir spécifiquement sur une population spécifique de tanyocytes, plusieurs études ont pu montrer qu'ils expriment un certain nombre de marqueurs de cellules souches ou progéniteurs dans de nombreuses espèces (**voir tableau ci-dessous**). Ils expriment également des gènes que l'on retrouve dans les cellules progénitrices hypothalamiques, des marqueurs exprimés dans la SVZ et SGZ (**voir tableau ci-dessous**). Tout comme les cellules souches, les tanyocytes possèdent également des capacités de prolifération lentes, typiques, de renouvellement de leur population (notamment les tanyocytes dorsaux), de production de neurones et de cellules de type astrocyte *in vivo* (Haan et al., 2013 ; Robins et al., 2013 ; Chaker et al., 2016). Puisque tous les tanyocytes expriment la protéine Nestine, il a été démontré qu'à l'âge adulte, les tanyocytes donnaient naissance préférentiellement à des neurones puis des cellules gliales colonisant une grande partie des noyaux hypothalamiques (Chaker et al., 2016). Toutefois, s'il existe plusieurs groupes de tanyocytes différents, ils présentent également de manière différente les marqueurs et fonctions des cellules souches. Les tanyocytes  $\beta$  seraient préférentiellement des cellules progénitrices. Ils expriment un marqueur de progéniteurs neuronaux, la doublecortine et sont capables de répondre au facteur de croissance fibroblastique 10 (FGF10) en produisant des neurones, mais pas de cellules gliales dans l'ARC, le VMH (Haan et al., 2013 ; Saaltink et al., 2012). Les tanyocytes  $\alpha$  peuvent renouveler leur pool, donneraient plus de cellules gliales que de neurones qui colonisent l'ARC et le VMH et seraient plutôt des cellules souches (Xu et al., 2005 ; Robbins et al., 2013). L'activité de neurogenèse des tanyocytes hypothalamiques semble varier en fonction de l'environnement. En effet, la photopériode semble l'influer, impliquant potentiellement l'axe thyréotrope. Il est donc possible que ce phénomène puisse permettre à l'animal saisonnier d'adapter son métabolisme énergétique en fonction du cycle de reproduction (Batailler et al., 2016).

	Marqueurs	Références
Cellules souches ou progéniteurs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nestine</li> <li>• Vimentine</li> <li>• Sox2</li> <li>• Protéine de liaison aux lipides du cerveau (BLBP)</li> <li>• Transporteur au glutamate/Aspartate (GLAST)</li> <li>• Musashi-1</li> <li>• Protéine acide fibrillaire gliale (GFAP)</li> </ul>	<u>Chez la souris</u> : Robbins et al., 2013 ; Haan et al., 2013 <u>Chez le rat</u> : Perez-Martin et al., 2010 ; Berger et Hediger, 2010 ; Xu et al., 2005 <u>Chez le hamster sibérien</u> : Barrett et al., 2006 ; Bolborea et al., 2011 ; Nilaweera et al., 2011 ; Lee et al., 1995 <u>Chez la gerbille mongole</u> : Redecker, 1989 <u>Chez le mouton</u> : Batailler et al., 2014 <u>Chez le primate non humain</u> : Meisseter et al., 1988 ; Pellegrino et al., 2018 <u>Chez l'Homme</u> : Pellegrino et al., 2018 ; Baroncini et al., 2007 ; Koopman et al., 2017

<b>Retrouvés dans les cellules progénitrices hypothalamiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Notch 1</li> <li>• Notch 2</li> <li>• Hes 5</li> <li>• Lhx2</li> <li>• Rax</li> </ul>	<p>Chen <i>et al.</i>, 2017 ; Lee <i>et al.</i>, 1995 ; Salvatierra <i>et al.</i>, 2014</p> <p>Rax : Campbell <i>et al.</i>, 2017 ; Mirzadeh <i>et al.</i>, 2017 ; Lee <i>et al.</i>, 2012 ; Salvatierra <i>et al.</i>, 2014 ; Maranda-Angulo <i>et al.</i>, 2014</p>
<b>Exprimés dans la SVZ et SGZ</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UGS148</li> <li>• Prss56</li> </ul>	Ma <i>et al.</i> , 2015 ; Jourdon <i>et al.</i> , 2016

Tableau résumant les différents marqueurs détectés dans les tanocytes permettant de suggérer leur rôle en tant que cellules neurogéniques.

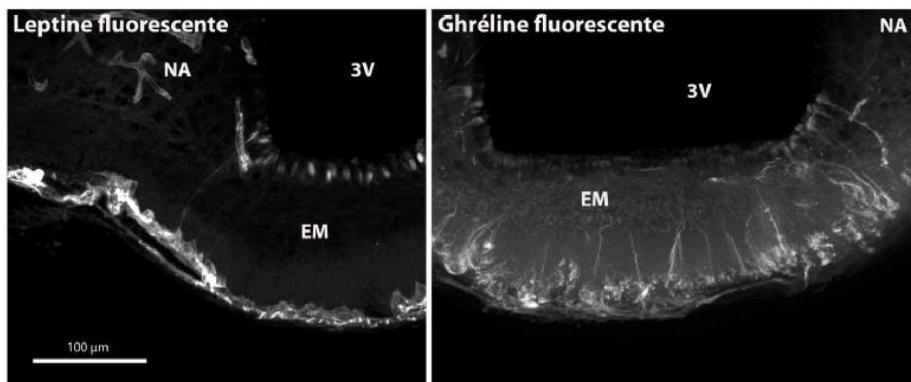
## 6. Les tanocytes en tant que transporteurs des hormones : accent sur la leptine

Si les modifications nutritionnelles sont maintenant connues pour induire des changements structuraux de la barrière de l'éminence médiane, influant l'accès des hormones aux neurones de l'ARCvm, il reste encore beaucoup de zones floues quant à la compréhension de l'accès aux hormones notamment pour la leptine. Le transport de la leptine jusqu'à l'hypothalamus est actuellement toujours sujet à discussion et plusieurs hypothèses sont émises.

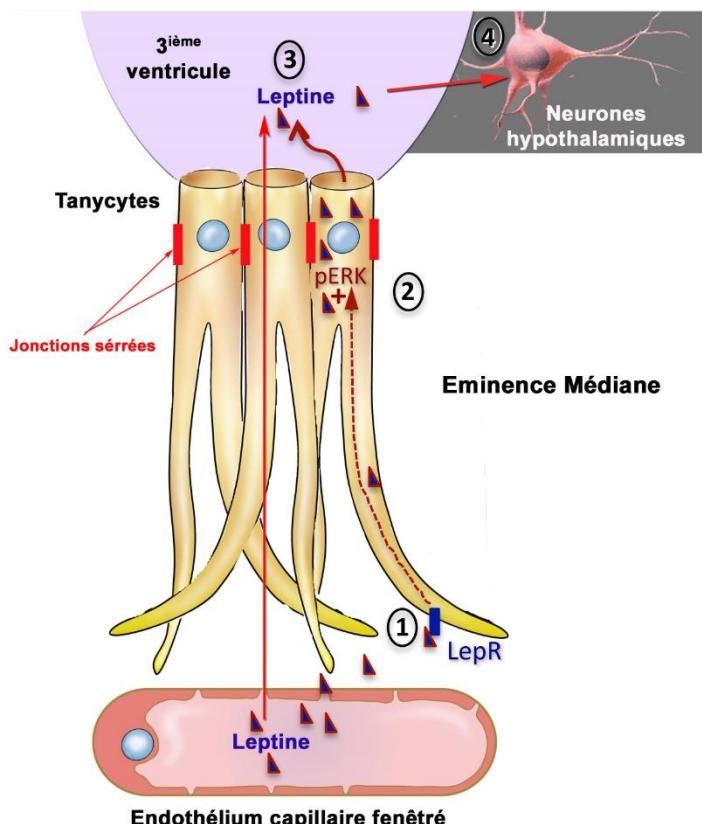
La présence des LepRb dans l'hypothalamus associée à la détection de l'hormone dans le LCR suggèrent que la leptine périphérique est transportée du sang vers ses cibles et que la BHCV peut être impliquée dans ce processus (Caron *et al.*, 2010 ; Hagan *et al.*, 1999). De plus, dans une majorité de concentrations plasmatiques physiologiques de leptine, cette dernière est corrélée avec la concentration en leptine dans le LCR. Toutefois, dans le cas de l'obésité, la concentration en leptine dans le LCR stagne malgré une leptinémie importante (Caro *et al.*, 1996 ; Schwartz *et al.*, 1996 ; Chmielewski *et al.*, 2019). En raison de sa taille (16KDa), la leptine est incapable d'être transportée par diffusion. Il semblerait donc que le transport de la leptine vers le LCR suive un modèle de transport de type saturable, nécessitant un récepteur (Banks, 2004). Le transport transcellulaire de la leptine impliquerait la forme courte du LepR, mais la mégaline semble également être un bon candidat (Kastin *et al.*, 1999 ; Dietrich *et al.*, 2008). L'injection périphérique de leptine radiomarquée a permis de constater que les plexus choroïdes, l'ARC et l'EM sont les zones où la leptine est la plus présente (Banks *et al.*, 1996). La forte expression de LepRa dans les plexus choroïdes a suggéré que c'est à ce niveau que le transport de la leptine était majoritaire (Burguera *et al.*, 2000 ; Merino *et al.*, 2006 ; Banks, 2019). Cependant, une étude récente a montré que la diminution d'expression des LepR dans les cellules épithéliales des plexus choroïdes et dans les cellules endothéliales diminue la capture de la leptine et augmente la prise de poids mais sans impacter l'homéostasie énergétique. Les animaux seraient plus gros en raison d'une sensibilité accrue à la récompense (Di Spieizo *et al.*, 2018). La neutralisation de la leptine dans le LCR via l'utilisation d'un anticorps neutralisant entraîne la diminution du signal P-STAT3 dans le ARCDm, le VMH et le DMH indiquant que la leptine peut atteindre ces zones via le LCR (Balland *et al.*, 2014). La configuration des tanocytes dans l'éminence médiane et leur capacité de transcytose justifie l'intérêt porté à ces cellules dans le transport des hormones vers le LCR et l'hypothalamus (Mullier *et al.*, 2010 ; Perruzzo, 2004 ; Nakai Yannk, 1975). De plus, il a été démontré que la leptine injectée en périphérie active les neurones de l'hypothalamus en suivant une cinétique chronologique partant du ARCvm et remontant progressivement vers les noyaux plus dorsaux (Faouzi *et al.*, 2007). Une étude du laboratoire a montré que rapidement après administration, les tanocytes de l'éminence médiane sont activés (pSTAT3) par la leptine indiquant qu'ils soient capables de sentir l'information. Le marquage est visible au niveau des processus en contact avec les vaisseaux de la surface piale de l'éminence médiane ainsi qu'au pôle apical des tanocytes au contact du LCR (Balland *et al.*, 2014). L'utilisation de la leptine fluorescente a pu montrer que la

leptine présente dans la circulation pouvait atteindre le cerveau au travers des vaisseaux fenestrés puis était capturée par les tanocytes (Balland *et al.*, 2014). Ce processus semble dépendre des LepR, car l'injection d'une leptine mutée, capable de se fixer sur les récepteurs sans induire leurs activités (LAN) ne semble pas captée par les tanocytes et n'entre pas dans l'EM. L'internalisation de la leptine dans les tanocytes se fait via des vésicules de clathrine au pôle basal des tanocytes traversant la cellule vers le pôle apical (Peruzzo *et al.*, 2004 ; Balland *et al.*, 2014). La leptine est ensuite relarguée dans le LCR via un mécanisme exocytotique dépendant de l'activation de la voie de signalisation ERK (Balland *et al.*, 2014). Une fois dans ce compartiment liquide, la leptine est capable d'atteindre ces neurones cibles dans l'hypothalamus ainsi que les structures supérieures via le flux de LCR dans le système ventriculaire (Faouzi *et al.*, 2007 ; Balland *et al.*, 2014). Il est ainsi envisageable que la leptine après avoir atteint le LCR, pourrait atteindre librement le dmARC, le VMH et le DMH grâce à la diffusion paracellulaire.

En plus de la leptine, les tanocytes semblent également transporter d'autres hormones comme la ghréline (Collden *et al.*, 2014). Ces dernières années, un intérêt pour le transport tanocytaire d'autres signaux métaboliques comme le GLP1 s'est développé. Cette molécule pourrait être utilisée en complément chez des patients atteints d'obésité et de diabète de type 2. Le transport du GLP1 demanderait l'activation du récepteur à l'interleukine 6, présent dans les tanocytes (Anesten *et al.*, 2017). L'inactivation de ce dernier dans les tanocytes diminue le transport de certains analogues du GLP1 (Shirazi *et al.*, 2013). Il semblerait également que les tanocytes puissent transporter les hormones stéroïdes comme les œstrogènes, ayant un effet an orexigène, afin d'atteindre ses neurones cibles (Kumar et Knowles, 1967 ; Langub et Watson, 1992).



**Figure 12 :** Photographies montrant l'internalisation de la leptine et la ghréline fluorescentes par les tanocytes de l'éminence médiane suite à leur injection dans le sang. Données du laboratoire. EM : éminence médiane ; NA : Noyau arqué ; 3V : 3e ventricule.



**Figure 13 : Schéma résumant le transport de la leptine par les tanocytes.** 1) La leptine injectée en périphérie est endocytée par les tanocytes de l'éminence médiane et active des récepteurs au niveau des tanocytes de l'éminence médiane. 2) La leptine est endocytée par les tanocytes de l'éminence médiane et active des récepteurs au niveau des tanocytes de l'éminence médiane. 2) La leptine est endocytée par les tanocytes et transite dans des vésicules de clathrine. 3) Le relargage de la leptine dans le LCR est dépendant de l'activation de la voie de signalisation ERK par le récepteur LepR. 4) La leptine peut alors activer les neurones cibles dans l'hypothalamus (Adapté de Balland et al, 2014)

## 7. Les tanocytes et résistance à la leptine

Nous avons vu précédemment que la résistance à la leptine était un des principaux facteurs associés à l'obésité et au diabète. Parmi les causes les plus précoces de ce phénomène se trouve être la diminution du transport de cette hormone vers ses zones cibles. La souris, placée sous régime gras est un modèle reconnu pour permettre l'étude du développement de l'obésité (Souris DIO) ainsi que l'étude de la cinétique de résistance à la leptine. Ce second point est régulièrement exploité dans les études métaboliques comme des points clés dans la compréhension du phénotype observé dans l'étude. Toutefois, dans la littérature, il existe beaucoup de variabilités dans l'échelle temporelle en fonction de la nourriture utilisée, la souche de souris et les conditions d'hébergement. Ce qui est établi, chez la souris, comme chez l'Homme, c'est que la résistance à la leptine est un phénomène qui se décompose en 2 parties :

La résistance à la leptine périphérique : correspondant à l'étape durant laquelle le signal leptine n'est plus véhiculé de manière suffisante jusqu'aux neurones cibles pour permettre la production d'une réponse physiologique. L'effet anorexigène de la leptine est diminué, voire absent après une injection périphérique de leptine (3mg/kg) alors que l'injection ICV de leptine (2µg/animal) conservera son effet sur la prise alimentaire. Il semble qu'après huit semaines de régime gras (60% de graisse), le transport de la leptine au cerveau semble altéré, perturbant la sensibilité du cerveau à la leptine périphérique ([Van-Heek et al., 1997](#) ; [El-Haschimi et al., 2000](#)).

La résistance à la leptine centrale : le signal leptine n'est plus perçu dans les centres neuronaux. Dans ce cas, l'injection de leptine en ICV n'a plus d'effet non plus. Après 15 semaines de régime gras (60% de graisse), les souris deviendraient complètement résistantes à la leptine ([Enriori et al., 2007](#)).

De précédents travaux, menés au sein du laboratoire, ont montré que l'application de huit semaines de régime gras (60% de graisse), chez des souris C57Bl6/J entraîne la diminution de l'accès de la leptine jusqu'à l'hypothalamus médiobasal, mais pas au niveau de l'EM. De plus, chez ces animaux, l'injection IP de leptine (3mg/kg) n'entraîne pas d'augmentation de la

phosphorylation de STAT3 dans les tanyocytes l'EM, pourtant présente chez les souris du même âge en régime normal. En raison de leur présence au contact des vaisseaux fenestrés ainsi que du LCR du 3V, il semblerait que les tanyocytes soient les premières cellules du cerveau à devenir résistantes à la leptine. De manière intéressante, les jeunes souris *db/db* (n'étant pas encore obèses) présentent un défaut de transport de la leptine, dans les tanyocytes, comme les souris en régime gras depuis huit semaines. Cela suggère que le LepRb est impliqué dans les mécanismes de transport de la leptine au travers des tanyocytes. Le traitement aigu de ces animaux à l'EGF entraîne la phosphorylation de ERK dans les tanyocytes et le rétablissement du transport de la leptine jusqu'à l'hypothalamus médio-basal. En injection IP chronique, l'EGF est même capable d'accélérer la perte de poids stimulée par le retour à un régime normal en comparaison au traitement véhicule ([Balland et al., 2014](#)). Il semblerait donc que les tanyocytes puissent être des cibles thérapeutiques permettant l'amélioration du transport de la leptine périphérique vers l'hypothalamus médiobasal, lieu principal de son activité centrale.

*Ces travaux récents mettent en lumière l'importance d'une population hétérogène de cellules gliales dans la bonne régulation de mécanismes complexes et dans le maintien d'une structure extrêmement sensible à son environnement. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la plasticité de l'éminence médiane et le transport tanyctaire des hormones métaboliques périphériques telles que la leptine permettrait d'évaluer les possibilités d'amélioration lors de cas pathologiques comme l'obésité ou le diabète de type 2.*

## Objectifs

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes impliqués dans le transport de la leptine au travers des cellules gliales qui bordent le troisième ventricule : les tanocytes. Ces cellules étant localisées dans une structure cérébrale dont la plasticité dépend notamment du statut énergétique, je me suis également intéressée aux facteurs pouvant perturber sa mise en place (**Etude 1**).

Concernant le transport tanocytaire, mon travail de thèse a compris deux grands axes d'étude :

- Déterminer avec précision si les tanocytes exprimaient les récepteurs à la leptine et évaluer leur éventuelle importance dans le transport de la leptine et la physiologie du métabolisme chez la souris (**Etude 2**). Prenant à l'appui ces résultats, j'ai également travaillé en collaboration avec l'équipe du Dr. Jean Denis Troadec (Marseille) afin de comprendre comment la molécule synthétique, dérivée de l'ocadécapeptide ou ODN (OP) joue son rôle sur le métabolisme énergétique (**Etude 3**)
- Améliorer les connaissances sur les mécanismes intracellulaires impliqués dans le transport intratanyctal de la leptine et son relargage dans le LCR. Ces résultats vont être présentés et commentés **en résultats supplémentaires**.

# RESULTATS



## Etude 1 : Impact de l'obésité maternel sur le développement de la structure de l'éminence médiane

### I. Introduction

De multiples travaux ont démontré la place de l'ARC dans la régulation du métabolisme énergétique. Ce groupe de neurones est capable de détecter plusieurs signaux centraux et périphériques dans le but produire et transmettre une réponse, en adéquation avec la situation, afin de maintenir un équilibre énergétique (homéostasie Langlet *et al.*, 2013 ; Dietrich and Horvath, 1999 ; Elmquist *et al.*, 1999). Toutefois, il est impératif que ces neurones puissent avoir accès à ces signaux. Cette communication est indispensable en condition physiologique et elle est perturbée lors de dysrégulations du statut énergétique (obésité, diabète de type 2...). L'ARC peut alors devenir résistant à ces signaux provenant de la circulation (Enriori *et al.*, 2007).

L'accès aux molécules est limité grâce à la fonction de barrière des vaisseaux de la barrière hématoencéphalique (BHE) et celle des cellules épendymogliales de la barrière hématocérébroventriculaire (BHCV). Les jonctions serrées, présentes au niveau des cellules endothéliales ou épendymogliales, sont les marqueurs clés de l'état de cette fonction. Elles préviennent la diffusion paracellulaire des éléments provenant du sang (Ben Zvi *et al.*, 2014 ; Reese and Karnovsky, 1967 ; Siegenthaler *et al.*, 2013). Pour ce qui est du transport, plusieurs éléments y contribuent : transporteurs (Banks *et al.*, 1996 ; Norsted *et al.*, 2008), fenestrations (Aird, 2007), mécanismes de transcytose (Tuma and Hubbard, 2003). Les jonctions serrées matures entre les cellules endothéliales se forment durant la gestation, chez le rongeur et l'Homme (Ben Zvi *et al.*, 2014 ; Braniste *et al.*, 2014 ; Nico *et al.*, 1999 ; Olson *et al.*, 1968 ; Anstrom *et al.*, 2007 ; Virgintino *et al.*, 2004). De la même façon, les cellules endothéliales présentent des fenestrations au cours de la vie embryonnaire. Ces fenestrations diminuent au cours de la gestation pour disparaître sur la quasi-totalité des vaisseaux cérébraux, à l'exception de certaines régions du cerveau appelées OCVs comme l'EM (Morita *et al.*, 2016). Si plusieurs hypothèses existent concernant le ou les moyens empruntés par les signaux pour atteindre leurs cibles neuronales dans le ARC et l'EM, en raison de sa proximité avec les neurones, représente un site d'étude intéressant pour la compréhension des mécanismes de communication entre la périphérie et l'hypothalamus. De plus, des études ont montré que cette zone présentait une plasticité en réponse aux signaux métaboliques (Langlet *et al.*, 2013) et que les cellules gliales portant la fonction de barrière de l'éminence médiane (les tanycytes), pouvaient transporter la leptine et la ghréline par transcytose (Balland *et al.*, 2014 ; Collden *et al.*, 2015)

Les maladies métaboliques peuvent se développer au cours de la vie mais également à des temps très précoces. En raison du contact physique entre la mère et son enfant durant la gestation, il est crédible de penser que l'environnement maternel peut avoir un impact sur sa progéniture. Des études conduites chez l'Homme comme chez plusieurs modèles animaux ont, d'ailleurs, montré que l'obésité durant la grossesse était un facteur de risque pour le développement de l'obésité chez l'enfant au cours de sa vie (Yogev *et al.*, 2009 ; Guo *et al.*, 1995). De plus, il a été démontré que les perturbations dans le développement des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique pouvaient affecter la vie future de l'individu (Collden *et al.*, 2015 ; Bouret *et al.*, 2008 ; Sterculorum *et al.*, 2015).

Ainsi, Kim et ses collaborateurs ont testé, en 2016, l'hypothèse selon laquelle l'obésité maternelle durant la grossesse pouvait altérer le développement de la fonction de barrière chez le fœtus (Kim *et al.*, 2016). Nous avons commenté cette étude dans un article publié en 2016 dans *News and Views*.

## II. **Résultats**

### **Maternal programming of blood-brain exchanges in the arcuate nucleus of the hypothalamus**

Manon Duquenne, Bénédicte Dehouck, Vincent Prevot

Inserm, Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Jean-Pierre Aubert Research Centre, U1172, F-59000 Lille, France; University of Lille, FHU 1000 days for Health, School of Medicine, F-59000 Lille, France

Growing evidence supports a link between maternal nutrition and obesity in offspring. Epidemiological data have indeed suggested that excess nutrition and growth during pre- and/or post-natal life render the individuals prone to develop obesity and related diseases later in life (1). Such environmental influences during critical periods of development are even thought to be more important than genetic factors in the etiology of metabolic diseases (2). A report in this issue of *Endocrinology* (3) shows that maternal obesity alters the organization of the blood-brain-barrier (BBB) and its permeability in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) in newborns. Hence, this study highlights the importance of neonatal environment in the installment of the dialogue that is set in motion between the periphery and ARH neurons to control both their development and function during postnatal life.

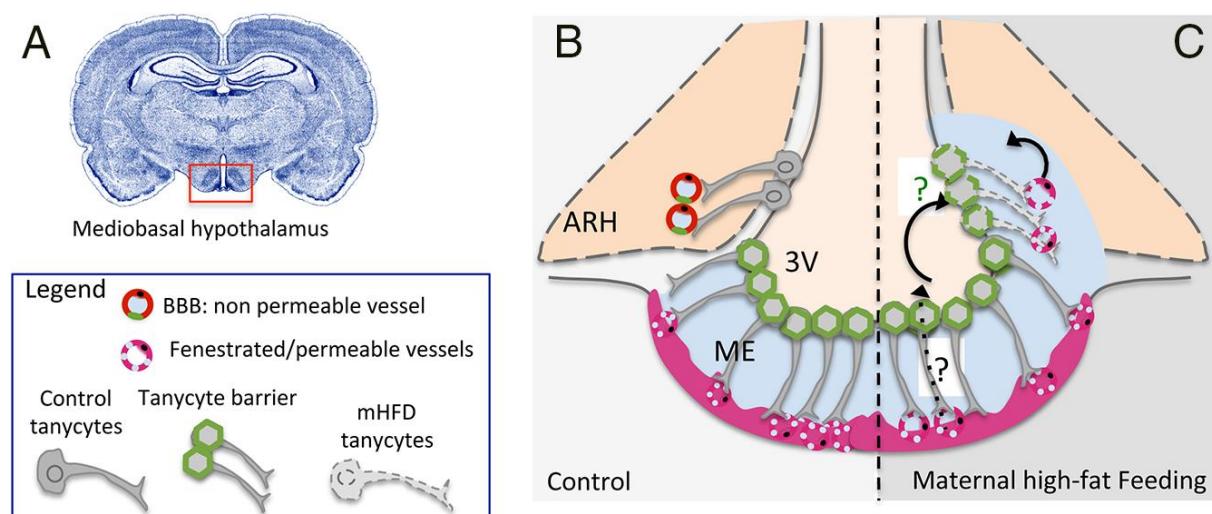
Many aspects of energy balance and metabolism are controlled by a select population of hypothalamic neurons that reside in the ARH (1,4), which lies at the floor of the third cerebral ventricle, immediately above the median eminence (See Figure 1B). The median eminence is one of the seven so-called circum-ventricular organs. This structure characteristically contains a rich capillary plexus, which features a fenestrated endothelium, making it a direct target of blood-borne molecules (5,6). The median eminence also contains highly specialized ependymoglia cells called tanycytes, which line the floor of the third ventricle and form a barrier between the blood and the cerebrospinal fluid (CSF) to protect the brain against blood-borne molecules extravasating from the fenestrated vessels (7,8) and use active transport mechanisms to shuttle circulating metabolic signals into the brain (9,10). Although, most ARH neurons lie behind the BBB, recent studies showed that fenestrated capillaries permit enhanced access of circulating factors to the region of the ARH that adjoins the median eminence and that this process is regulated by nutritional status (6,8). Indeed, while capillary fenestrations in median eminence microvessel loops reaching the ARH (11) are restricted to the median eminence in fed animals, fasting promotes the fenestration of the branches that reach into the mediobasal ARH and that otherwise harbor BBB properties. These changes in median eminence vessel permeability have been shown to be reversible and to involve

tanyctic-dependent processes (6,8).

Despite these recent advances in the understanding of the anatomy of the blood-hypothalamic barrier and insights into the molecular mechanism underlying its functional plasticity, little is known about the development of this blood-brain interface regulating the access of peripheral metabolic signals to the ARH. The study by Kim et al. (3) in the current issue of *Endocrinology* examines the structure and the permeability of the BBB in the ARH at birth in pups born to overweight dams fed on a 45% high-fat diet during gestation in comparison to mice produced by normal-weight mothers fed on chow. The authors found that permeability of ARH vessels to the intraperitoneally-injected Evans Blue dye was increased in newborns of obese dams. In control pups, Evans blue diffusion was restricted to the vascular bed of hypothalamic BBB microvessels and the median eminence, and did not spread to neighboring structures such as the ARH. In contrast, the dye was observed in the ventromedial ARH in pups from obese mothers. The increased extravasation of Evans blue dye in the ARH was associated with an increased density of ARH vessels exhibiting immunoreactivity for MECA-32, which labels fenestral diaphragms of median eminence endothelial cells (5,7). Interestingly, using a tomato-labeled lectin that binds to both BBB and fenestrated hypothalamic vessels, the authors convincingly showed that the total number of blood vessels irrigating the ARH did not change between groups; maternal obesity only increased the proportion of ARH vessels exhibiting MECA-32-immunoreactivity. These changes in ARH vessel permeability were not seen to be associated with any apparent change in the density of ZO1-immunoreactive tight junction complexes in the ARH. This stands in contrast to previous findings showing that any increase in the permeability of the median eminence vessels reaching the ARH is usually associated with an increased organization of tight junction complexes in the ARH tanyctyes contacting these fenestrated vessels via their endfeet (8). This discrepancy may originate from the fact that, in their densitometric analysis, the authors did not discriminate the signal arising from BBB vessels from the one delineating the tanyctic barrier. However, putative strengthening of the tanyctic blood-CSF barrier in newborn offspring of obese dams is suggested by the increase in the expression of the transcript coding the tanyctye-specific tight junction protein Claudin 1 at birth, when compared to pups born to lean dams (7).

Like most new and exciting observations, the current study prompts many additional questions. For example, how do changes in maternal homeostatic status alter the blood-brain interface in the ARH at birth in offspring? Although epigenetic modifications impacting the unfolding of the developmental program during embryogenesis might be at stake, one could speculate that the increase in the accessibility of ARH neuron to peripheral signals at birth could not only be due to putative detrimental consequences of maternal obesity during pregnancy, but also to a naturally occurring phenomenon that would be analogous to the one seen in adult animals during the adaptive response to fasting (8). Obesity and type 2 diabetes during pregnancy have indeed been shown to be associated with transient hypoglycemia at birth both in humans and rodents (12-14)

and dips in blood glucose levels have been suggested to trigger the release by tanycytes of vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) (8), which is the main growth factor known to promote endothelial cell fenestrations (15). We next could ask what is the impact of boosting direct blood-borne metabolic signal access to ARH neurons at birth in the long-term: does this predispose the animals to develop central metabolic hormone resistance during early postnatal development - leptin, insulin and ghrelin being known to play key roles in the development of ARH neuronal circuits (16-18) and/or metabolic disorders later in life? And finally, could deleterious effects of maternal obesity be rescued by acutely preventing fenestration of the median eminence capillary branches reaching the ARH at birth? Answering all these questions may lead to innovative new strategies to stem the tide of the pandemic of childhood obesity and the onset of type 2 diabetes.



**Figure 1.** Schematic diagram illustrating structural differences between the median eminence (ME) and ARH at birth in pups born to dams fed standard chow or a high-fat diet during pregnancy.

(A) A Nissl-stained coronal section of the brain in which the mediobasal hypothalamus is delineated by a red box.

(B-C) The ARH lies lateral to the third ventricle (3V) and immediately dorsolateral to the ME. B, At birth, in mice born to lean dams, the fenestrated blood vessels of the ME permit the local diffusion of macromolecules from the circulation (light blue stain), whereas vessels in the ARH proper exhibit blood-brain properties that block this diffusion (3). Hence, circulating metabolic signals require BBB transport to access ARH neurons, including transport via the tanycytes (9, 10). Under these conditions, tight junctions (green) between tanycytes lining the ventral wall of the ME prevent the diffusion of circulating factors into the 3V and CSF. C, At birth, in mice born to overweight dams given a high-fat diet during pregnancy (mHFD), ME vessels extending into the ARH become fenestrated, enabling the freer diffusion of circulating signals to the ventromedial ARH (3). Whether this phenomenon is accompanied by the extension of the tanycytic tight junction barrier dorsally along the 3V, as shown in adult mice subjected to 24-hour fasting (8), remains to be explored (green question mark). Because real-time PCR analyses from microdissected ARH show increases in the expression of transcripts for several transcytotic transporters (LRP1 and dysferlin), the authors speculate that maternal obesity may result in an increase in active transcellular transport in the ARH of offspring brain (question mark) (3). The authors also show, using immunolabeling for vimentin, that the processes of ARH tanycytes in pups born to obese dams may be shorter than in control pups, a phenomenon reminiscent of that seen in seasonal species during winter (short photoperiod).

### **III. Références**

1. Bouret S, Levin BE, Ozanne SE. Gene-environment interactions controlling energy and glucose homeostasis and the developmental origins of obesity. *Physiol Rev* 2015; 95:47-82
2. Loos RJ. Recent progress in the genetics of common obesity. *Br J Clin Pharmacol* 2009; 68:811-829
3. Kim DW, Glendining KA, Grattan DR, Jasoni CL. Maternal obesity in the mouse compromises the blood-brain barrier in the arcuate nucleus of offspring. *Endocrinology* 2016;en20161014
4. Myers MG, Jr., Olson DP. Central nervous system control of metabolism. *Nature* 2012; 491:357-363
5. Ciofi P, Garret M, Lapirot O, Lafon P, Loyens A, Prevot V, Levine JE. Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 2009; 150:5509-5519
6. Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdie P, Bourrier E, Dehouck B, Baneres JL, Martinez J, Mery PF, Marie J, Trinquet E, Fehrentz JA, Prevot V, Mollard P. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:1512-1517
7. Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 2010; 518:943-962
8. Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Carmeliet P, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in Response to Fasting. *Cell Metab* 2013; 17:607-617
9. Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prevot V. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab* 2014; 19:293-301
10. Collden G, Balland E, Parkash J, Caron E, Langlet F, Prevot V, Bouret SG. Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol Metab* 2015; 4:15-24
11. Ambach G, Palkovits M. The blood supply of the hypothalamus of the rat. In: Morgane PJ, Panksepp J, eds. *Handbook of the hypothalamus*. Vol 1. New York: Marcel Dekker; 1979:267-377.
12. Group HSCR, Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, Trimble ER, Chaovarindr U, Coustan DR, Hadden DR, McCance DR, Hod M, McIntyre HD, Oats JJ, Persson B, Rogers MS, Sacks DA. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 2008; 358:1991-2002
13. Yogev Y, Visser GH. Obesity, gestational diabetes and pregnancy outcome. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009; 14:77-84
14. Guo F, Jen KL. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* 1995; 57:681-686
15. Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 1998; 140:947-959
16. Vogt MC, Paeger L, Hess S, Steculorum SM, Awazawa M, Hampel B, Neupert S, Nicholls HT, Mauer J, Hausen AC, Predel R, Kloppenburg P, Horvath TL, Bruning JC. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell* 2014; 156:495-509
17. Bouret SG, Gorski JN, Patterson CM, Chen S, Levin BE, Simerly RB. Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. *Cell Metab* 2008; 7:179-185
18. Steculorum SM, Collden G, Coupe B, Crozier S, Lockie S, Andrews ZB, Jarosch F, Klussmann S, Bouret SG. Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits. *J Clin Invest* 2015; 125:846-858

19. Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., and Dehouck, B. (2013). Tanyocyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 521, 3389–3405.
20. Dietrich, M.O., and Horvath, T.L. (2013). Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 36, 65–73.
21. Elmquist, J.K., Elias, C.F., and Saper, C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22, 221–232.
22. Enriori, P.J., Evans, A.E., Sinnayah, P., Jobst, E.E., Tonelli-Lemos, L., Billes, S.K., Glavas, M.M., Grayson, B.E., Perello, M., Nillni, E.A., et al. (2007). Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab.* 5, 181–194.
23. Ben-Zvi, A., Lacoste, B., Kur, E., Andreone, B.J., Mayshar, Y., Yan, H., and Gu, C. (2014). Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier. *Nature* 509, 507–511.
24. Reese, T.S., and Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34, 207–217.
25. Siegenthaler, J.A., Sohet, F., and Daneman, R. (2013). “Sealing off the CNS”: cellular and molecular regulation of blood-brain barriergenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 23, 1057–1064.
26. Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., and Maness, L.M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17, 305–311.
27. Norsted, E., Gömüç, B., and Meister, B. (2008). Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J. Chem. Neuroanat.* 36, 107–121.
28. Aird, W.C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.* 100, 158–173.
29. Tuma, P.L., and Hubbard, A.L. (2003). Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol. Rev.* 83, 871–932.
30. Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L.G., Guan, N.L., et al. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* 6, 263ra158.
31. Nico, B., Quondamatteo, F., Herken, R., Marzullo, A., Corsi, P., Bertossi, M., Russo, G., Ribatti, D., and Roncali, L. (1999). Developmental expression of ZO-1 antigen in the mouse blood-brain barrier. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 114, 161–169.
32. Olsson, Y., Klatzo, I., Sourander, P., and Steinwall, O. (1968). Blood-brain barrier to albumin in embryonic new born and adult rats. *Acta Neuropathol.* 10, 117–122.
33. Anstrom, J.A., Thore, C.R., Moody, D.M., and Brown, W.R. (2007). Immunolocalization of tight junction proteins in blood vessels in human germinal matrix and cortex. *Histochem. Cell Biol.* 127, 205–213.
34. Virgintino, D., Errede, M., Robertson, D., Capobianco, C., Girolamo, F., Vimercati, A., Bertossi, M., and Roncali, L. (2004). Immunolocalization of tight junction proteins in the adult and developing human brain. *Histochem. Cell Biol.* 122, 51–59.
35. Morita, S., Furube, E., Mannari, T., Okuda, H., Tatsumi, K., Wanaka, A., and Miyata, S. (2016). Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 363, 497–511.

## Etude 2 : Le rôle des récepteurs à la leptine (LepR) dans le transport tanocytaire de la leptine

### I. Introduction

Selon l'OMS, l'obésité est définie par une accumulation anormale ou excessive de graisse corporelle pouvant nuire à la santé de l'individu. Touchant plus de 13% de la population mondiale, l'obésité est une maladie multifactorielle, considérée comme une des principales causes de décès dans le monde. La source principale de l'obésité et du surpoids est un déséquilibre énergétique entre la quantité de calories ingérée et dépensée. Elle représente un facteur de risque important pour le développement de maladies cardiovasculaires, de diabète ou même de certains cancers. Le diabète de type 2 (DT2) est également une maladie multifactorielle qui n'affecte pas moins de 9% de la population mondiale (Swinburn et al., 2019). Toutefois, les caractéristiques du diabète varient à travers le monde. En Asie, par exemple, le DT2 se développe plus rapidement, chez des individus plus jeunes et présentant un IMC plus bas que celui de la majorité des autres patients venant d'ailleurs (Yoon et al., 2006). De plus, de nombreuses études, portant sur la population asiatique, suggèrent que la diminution de la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques, la production d'insuline, est cruciale pour le développement des diabètes. Ces travaux ont également montré que la perte de sensibilité à l'insuline, c'est-à-dire la capacité de moduler la glycémie en réponse à l'insuline circulante, apparaît être un prérequis pour induire le diabète dans la plupart des pays d'Occident dont l'Europe (Ohn et al., 2016; Yoon et al., 2006).

La leptine, est une hormone peptidique de 16 kDa produite majoritairement par les adipocytes. Parmi ces nombreuses fonctions, c'est un signal afférent, provenant de la périphérie, impliqué dans une boucle de rétrocontrôle négatif central régulant la prise alimentaire et la balance énergétique (Ahima and Flier, 2000; Caron et al., 2018; Cohen et al., 2001b; de Luca et al., 2005; Friedman, 2019; Pan and Myers, 2018). La leptine, au sein du cerveau, permet également la régulation l'homéostasie du glucose (Coppari et al., 2005; Kamohara et al., 1997) ou encore celle des flux de substrats (Buettner et al., 2008; Buettner et al., 2006) grâce à l'activation des récepteurs à la leptine (LepR) centraux. Les mécanismes impliqués dans le transport de la leptine jusqu'à ses sites d'action au sein du système nerveux central restent actuellement inconnus. Toutefois, plusieurs études ont montré que l'EM, une structure présente dans l'hypothalamus médiobasal, à proximité de l'ARC, serait la porte d'entrée pour que la leptine atteigne le cerveau métabolique (Banks, 2019; Garcia-Caceres et al., 2019; Prevot et al., 2018).

L'EM est un OCV, fenêtre entre le cerveau et la périphérie qui permet aux signaux circulants comme les hormones métaboliques, d'entrer dans le cerveau par diffusion passive à travers des vaisseaux fenestrés du système porte hypophysaire (Ciofi et al., 2009; Schaeffer et al., 2013). En plus des neurones de l'ARC qui résident en dehors de la BHE, il existe, au sein du vmARC, des neurones qui projettent leurs dendrites dans l'éminence médiane afin de sentir directement les informations provenant de la circulation sanguine (Yulyaningsih et al., 2017; Schaeffer et al., 2013; Djogo et al., 2016). Pourtant, un groupe de cellules gliales spécialisées de l'éminence médiane appelées tanocytes, borde le 3V et forme une BHCV qui empêche ces signaux métaboliques circulants d'entrer profondément dans le parenchyme hypothalamique (Banks, 2019; Garcia-Caceres et al., 2019; Prevot et al., 2018). Afin d'accéder à leurs cibles d'action plus éloignées, comme le dmARC, ces signaux ont besoin d'un mécanisme de transport actif pour traverser la barrière tanocytaire (Langlet et al., 2013a; Mullier et al., 2010). Lors d'une précédente étude, le laboratoire a montré que la leptine circulante traversait les vaisseaux fenestrés de l'éminence médiane et que les tanocytes servaient de navette entre le sang et le LCR, par un mécanisme dépendant de la voie de signalisation ERK (Balland et al., 2014). Toutefois, l'implication des LepR dans ce processus n'est pas encore établi. De plus, certaines études récentes remettent en question l'expression même des LepR dans les tanocytes (Yoo et al., 2019; Yuan et al., 2018).

Dans cette étude, grâce à l'utilisation de nombreuses approches *in vitro* et *in vivo* et plusieurs modèles animaux, nous démontrons que les tanyocytes expriment des LepR fonctionnels et que la présence de ces récepteurs est nécessaire au transport transcytique de la leptine périphérique vers le LCR. Ce processus apparaît, d'ailleurs, comme jouer un rôle clé dans le contrôle central de la fonction des cellules  $\beta$  pancréatiques ainsi que l'homéostasie glucidique et lipidique.

Cette étude a donné lieu à un article en révision dans le journal « *Nature Metabolism* ».

## **Impairment of leptin-receptor-mediated tanyctic shuttle for blood-borne leptin into the hypothalamus causes decreased $\beta$ -cell function**

Manon Duquenne<sup>1</sup>, Cintia Folgueira <sup>2#</sup>, Cyril Bourrouh<sup>3#</sup>, Marion Millet<sup>4,5#</sup>, Anisia Silva<sup>5#</sup>, Jérôme Clasadonte<sup>1#</sup>, Monica Imbernon<sup>1</sup>, Emilie Caron<sup>1</sup>, S. Rasika<sup>1</sup>, Nathalie Jouy<sup>1</sup>, Asturo Oishi<sup>5</sup>, Massimiliano Mazzone<sup>6</sup>, Eric Trinquet<sup>7</sup>, Jan Tavernier<sup>8</sup>, Stéphane Ory<sup>4</sup>, Ralf Jockers<sup>5</sup>, Markus Schwaninger<sup>9</sup>, Ulrich Boehm<sup>10</sup>, Ruben Nogueiras<sup>2</sup>, Jean-Sébastien Annicotte<sup>3</sup>, Stéphane Gasman<sup>4&</sup>, Julie Dam<sup>5&</sup>, Vincent Prévot<sup>1&\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Jean-Pierre Aubert Research Centre, Inserm, University of Lille, CHU Lille, UMR\_S1172, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> CIMUS, Universidad de Santiago de Compostela-Instituto de Investigación Sanitaria, Santiago de Compostela, 15782, Spain- CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERobn), 15706, Spain

<sup>3</sup> Univ. Lille, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR 8199 - EGID, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup> Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, F-67000 Strasbourg, France.

<sup>5</sup> Inserm U1016, Institut Cochin, Paris, France

<sup>6</sup> Laboratory of Tumor Inflammation and Angiogenesis, Center for Cancer Biology, VIB, Leuven B3000, Belgium; Laboratory of Tumor Inflammation and Angiogenesis, Center for Cancer Biology, Department of Oncology, KU Leuven, Leuven B3000, Belgium.

<sup>7</sup> Cisbio Bioassays, Parc Technologique Marcel Boiteux, BP84175, F-30200 Codolet, France

<sup>8</sup> Flanders Institute for Biotechnology (VIB), Department of Medical Protein Research, Faculty of Medicine and Health Sciences, Ghent University, Belgium

<sup>9</sup> Institute for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Lübeck, Lübeck, Germany

<sup>10</sup> Experimental Pharmacology, Center for Molecular Signaling (PZMS), Saarland University School of Medicine, 66421, Homburg, Germany

# These authors contributed equally to this work

& These authors jointly supervised this work

**Running Title:** Tanyocytes act as a conduit for peripheral metabolic signals into the brain

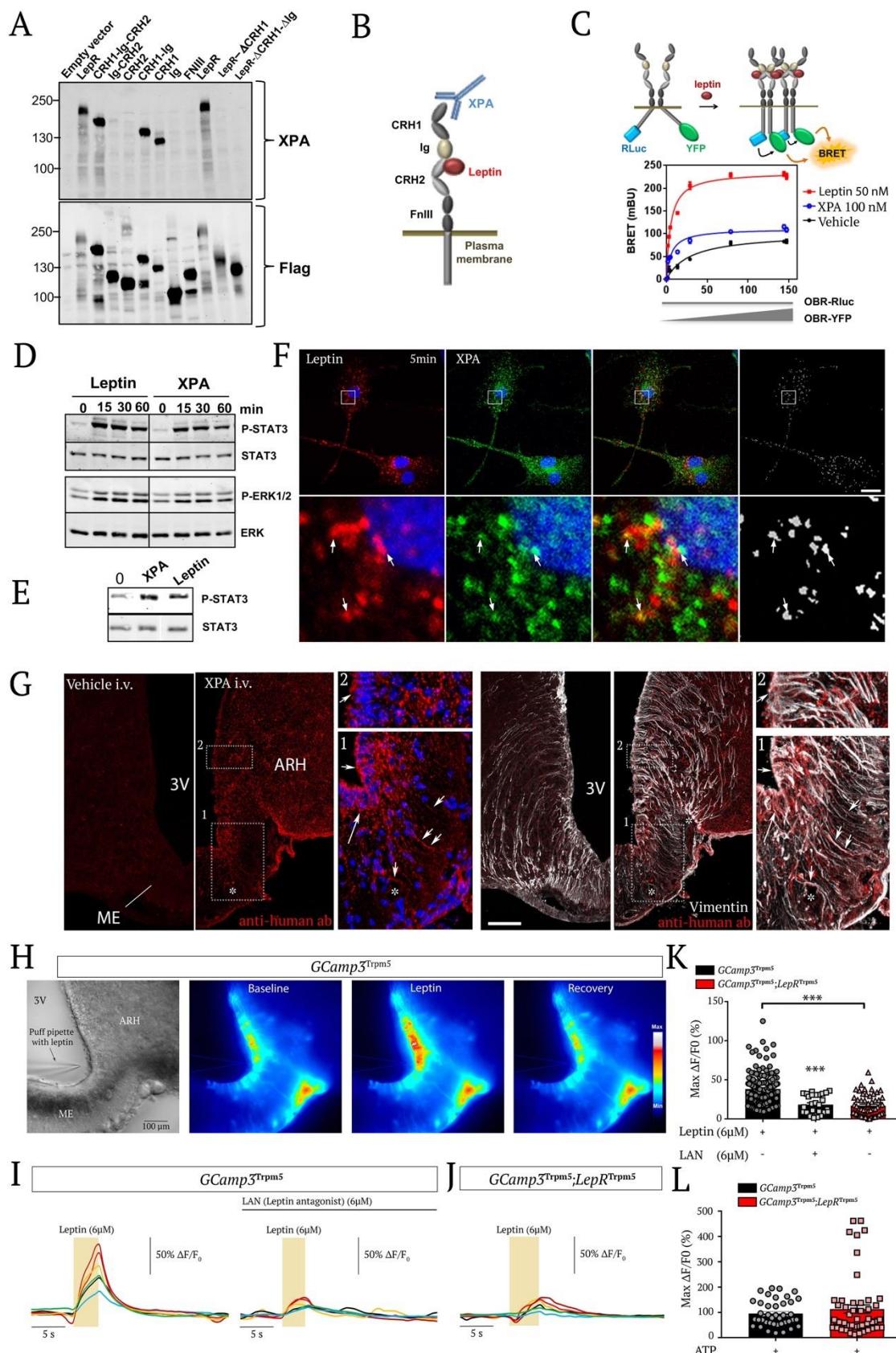
## II. Résultats

### 1. LepR is expressed and active in tanycytes of the median eminence

In order to probe the expression of LepR in tanycytes of the median eminence, we first searched for essential tools such as antibodies capable of reliably detecting LepR protein. We characterized the recently described biologically active allosteric antibody XPA, which was developed to target mouse LepR (Bhaskar et al., 2016). Using isolated parts/fragments of the LepR extracellular domain (ECD), we found that the epitope targeted by the XPA antibody lay on the cytokine receptor homology 1 (CRH1) domain of LepR (**Figure 1A**), outside the orthosteric leptin-binding site of the CRH2 domain (**Figure 1A, 1B**). The use of LepR BRET biosensors indicated that XPA was capable of inducing conformational changes and the oligomerization of LepR, even though these changes were different from the ones promoted by the natural ligand (**Figure 1C**). Similarly to leptin (0.8 µg/ml), treatment with 15 µg/ml XPA triggered both STAT3 and ERK signaling pathways in HEK293 cells transfected with mouse LepR, (**Figure 1D**). XPA also induced the phosphorylation of STAT3 in primary cultures of tanycytes (**Figure 1E**), which we have previously shown to express LepR and to internalize fluorescently labeled leptin *in vitro* (Balland et al., 2014). This indicates that, rather than simply being a passive marker of LepR protein expression, XPA is also a vital marker for activated and internalized LepR. Accordingly, a 5 min co-application of fluorescent leptin (2 µg/ml) and fluorescent XPA (5 µg/ml) to primary tanycyte cultures showed that 100% of the cells that internalized fluorescent leptin also internalized fluorescent XPA and that 50 to 60% of the endocytosed leptin colocalized with XPA *in vitro* (**Figure 1F**), indicating that these cells expressed LepR and internalized it in response to leptin binding. To confirm that tanycytes also express LepR *in vivo*, we intravenously administered XPA (2 nmol/animal) or vehicle to mice 2 min before sacrifice. At this short interval, XPA was seen to colocalize with the vimentin-immunoreactive processes and cell bodies of tanycytes arching down to the fenestrated capillary plexus of the median eminence (**Figure 1G**).

In our quest for further indisputable evidence of LepR expression and activity in median eminence tanycytes, we assessed whether tanycytes in living brain slices could respond to leptin and initiate  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, as they do in hypothalamic neurons (Irani et al., 2008; Jo et al., 2005). To selectively target tanycytes, we generated mice expressing the GCamp3 calcium biosensor under the control of the Trmp5 promoter, which is selectively expressed in tanycytes in the median eminence (**Figure 1H**) (Kusumakshi et al., 2015), by crossing *Trmp5::Cre* mice with those allowing Cre-dependent expression of GCamp3. Puffing 6 µM leptin onto the ventricular wall of brain slices against the flow of perfusion resulted in a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase in the cell bodies of median eminence tanycytes, as seen using live imaging (**Figure 1H, and 1I**). A prior bath-application of 6 µM of LAN, a mutated leptin (L39A/D40A/F41A) which acts as a competitive antagonist, binding LepR but blocking its activity (Niv-Spector et al., 2005), before puffing leptin onto tanycytes, inhibited the leptin-induced  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  increase in tanycytes (**Figure 1I, and 1K**), suggesting that LepR activation is

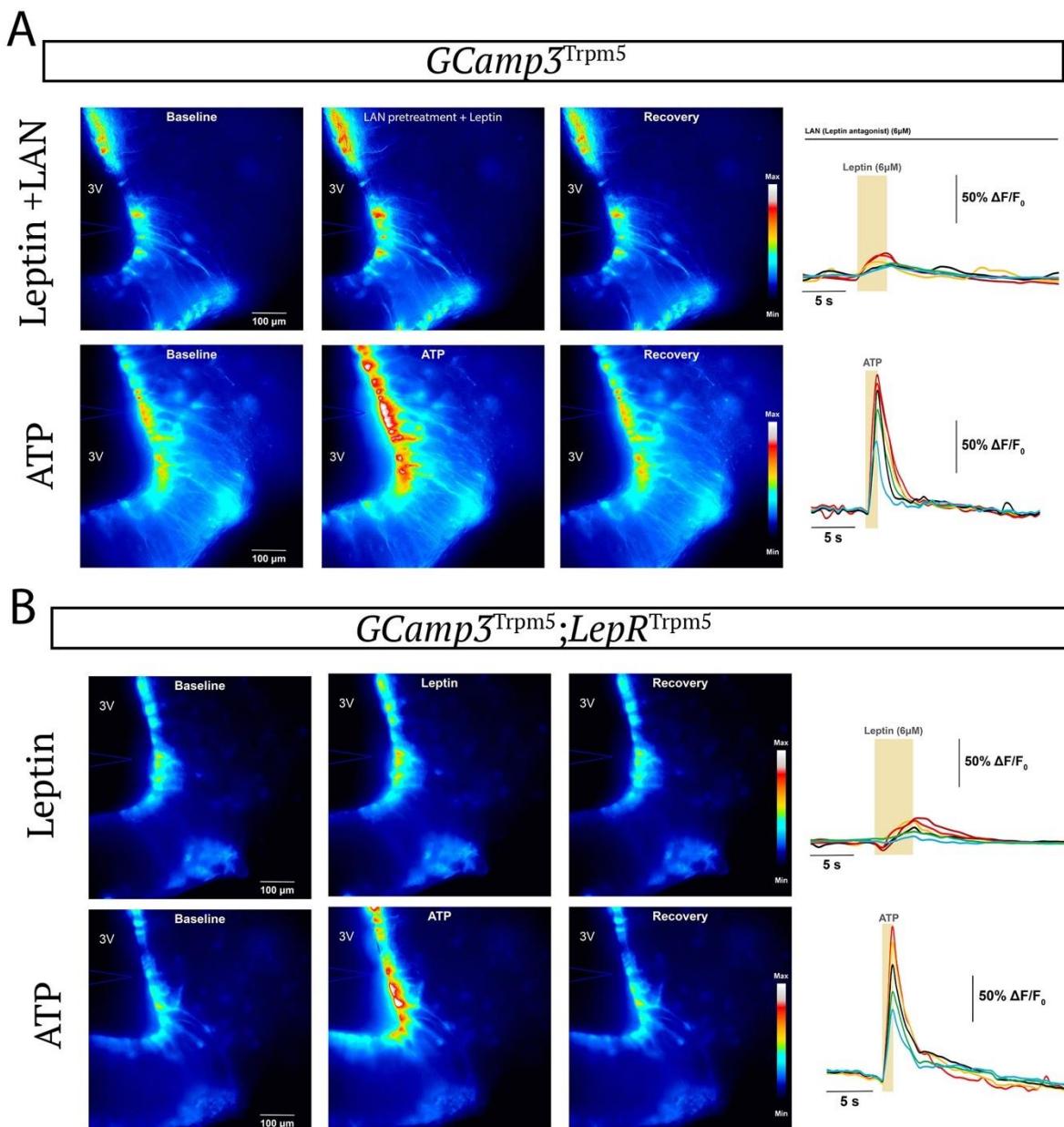
required for this signaling cascade. To further test the actual involvement of LepR in this process, we generated mice in which LepR is selectively knocked out in cells expressing the *Trmp5* promoter. In these *Trmp5::Cre; LepR<sup>loxP/loxP</sup>; GCamp3<sup>loxP/STOP/loxP</sup>* mice (*Gcamp3<sup>Trmp5</sup>; LepR<sup>Trmp5</sup>* mice), puffs of leptin failed to promote any change in  $[Ca^{2+}]_i$  in tanocytes (Figure 1J, and 1K). However, puffs of 10 mM ATP, a well-known and potent activator of calcium waves in tanocytes (Frayling et al., 2011; Muller-Fielitz et al., 2017), readily elevated  $[Ca^{2+}]_i$  in both LAN-treated and mutated brain slices, showing the viability of the cells (Figure 1K, 1L, Supplementary Figure 1). Together, these data unequivocally show that tanocytes express active LepR *in vivo*, which mediates leptin-induced changes in  $[Ca^{2+}]_i$ .



**Figure 1.** Tanyocytes of the median eminence express functional leptin receptors

(A) Western blot detection of different LepR domains from transfected HEK293 cells by the XPA antibody.  
(B) Schematic representation of leptin receptor domains and the XPA binding site.

- (C) Top: schematic representation of the BRET assay to study the ligand-induced conformational change/interaction between LepR-Rluc and LepR-YFP. Bottom: BRET donor saturation curves in HEK293T cells with a constant expression level of LepR-Rluc and increasing levels of LepR-YFP, upon stimulation with vehicle, leptin (50nM) or XPA (100nM) for 30 min at 37 °C.
- (D) STAT3 and ERK1/2 phosphorylation in HEK293 cells stably expressing LepR after stimulation with 50 nM leptin or 100 nM XPA for 5, 15, 30 or 60 minutes.
- (E) STAT3 phosphorylation in tanyocytes upon 50 nM leptin or 100 nM XPA stimulation for 30 minutes.
- (F) Leptin colocalizes with LepR in primary tanyocytes. Representative confocal images of tanyocytes treated for 5 min with 125 nM fluorescent leptin (red) together with XPA antibodies against LepR labeled with fluorescent secondary antibodies (green). The extent of colocalization is represented by the mask on the right. Arrows point to examples of colocalized pixels. Scale bar: 10 µm.
- (G) Representative photomicrograph revealing sites of XPA fixation in tanyocytes of the median eminence (vimentin-positive cells) 2 minutes after intravenous XPA injection (2 nmol/animal) *in vivo*. White arrows show XPA (red) and vimentin (white) colocalization. 3V: third ventricle; ARC: arcuate nucleus of the hypothalamus; ME: median eminence. Scale bar: 200µm.
- (H) Representative image of a living brain slice containing the median eminence from a *GCamp3<sup>Trpm5</sup>* mouse under brightfield and fluorescence microscopy, showing the reversible increase in intracellular calcium levels in tanyctic cell bodies lining the third ventricle (3V) upon the local application of a puff of leptin (6µM) via a glass pipette. ME: median eminence. Scale bar: 100 µm
- (I) Representative curves of *GCamp3* fluorescence (calcium current) over time (Delta T) compared to the baseline in tanyocytes in living hypothalamic slices during a puff of leptin (yellow rectangle, 6µM), alone (left curve) or after pre-treatment with leptin antagonist (LAN, 6µM, top black line; right curve), in a *GCamp3<sup>Trpm5</sup>* mouse.
- (J) Same measurement as in (I) in a *GCamp3<sup>Trpm5</sup>*; *LepR<sup>Trpm5</sup>* mouse lacking LepR in tanyocytes after a puff of leptin (6µM, yellow rectangle).
- (K) Graph representing maximum difference in calcium concentration from baseline during the treatment of living brain slices in *GCamp3<sup>Trpm5</sup>* and *GCamp3<sup>Trpm5</sup>; LepR<sup>Trpm5</sup>* mice, described in (I) and (J). Mann Whitney test; \*\*\*:  $p<0.001$ ; between indicated groups. Values indicate means  $\pm$  SEM.
- (L) Graph representing maximum difference in calcium concentration from baseline during a puff of ATP (10 mM) in living brain slices from *GCamp3<sup>Trpm5</sup>* and *GCamp3<sup>Trpm5</sup>; LepR<sup>Trpm5</sup>* mice. See also Supplementary Figure 1.



**Supplementary Figure 1.** Calcium waves in tanyocytes in response to local puffs of leptin and ATP in living brain slices from GCamp3<sup>Trpm5</sup> and GCamp3<sup>Trpm5</sup>;LepR<sup>Trpm5</sup> mice.

(A) Representative changes in intracellular calcium concentrations in tanyocytes in living brain slices from GCamp3<sup>Trpm5</sup> mice upon puffs of leptin (6 $\mu$ M) after bath-application of LAN (6 $\mu$ M, upper panels) and of ATP (10mM, lower panels).

(B) Representative changes in intracellular calcium concentrations in tanyocytes in living brain slices from GCamp3<sup>Trpm5</sup>;LepR<sup>Trpm5</sup> mice upon puffs of leptin (6 $\mu$ M, upper panels) and ATP (10mM, lower panels).

## **2. EGFR-mediated LepR signaling is required for the transcellular trafficking of leptin in tanocytes**

To characterize the mechanism by which tanocytes transport blood-borne leptin into the CSF and the rest of the hypothalamus, we next studied the transcytotic route followed by fluorescent leptin using primary cultures of tanocytes. As early as 2 min after the internalization of fluorescent bioactive leptin, the fluorescent signal was detected in EEA1-immunoreactive early endosomes (**Figure 2A**), where it accumulated for the first 10 min before exiting this subcellular compartment, as suggested by the subsequent decrease in intensity and extinction of fluorescence over time (**Figure 2B**, **Figure 2C**, **Supplementary Figure 2A**). Similarly, the fluorescent point-mutated leptin, LAN, which binds to but is unable to activate LepR, was also seen to be internalized (**Supplementary Figure 2B**) and to reach early endosomes (**Supplementary Figure 2B**). However, the overall intensity of LAN fluorescence inside the cell remained constant over time (**Supplementary Figure 2B**), and LAN was seen to remain sequestered in EEA1-immunoreactive compartments (**Figure 2D**, **Supplementary Figure 2C-D**), suggesting that, in contrast to bioactive leptin, captured LAN could not be released from tanocytes. These results suggest that LepR signaling is not required for its uptake by early endosomes, but is required for internalized leptin to complete its transcytotic route across tanocytes into the CSF.

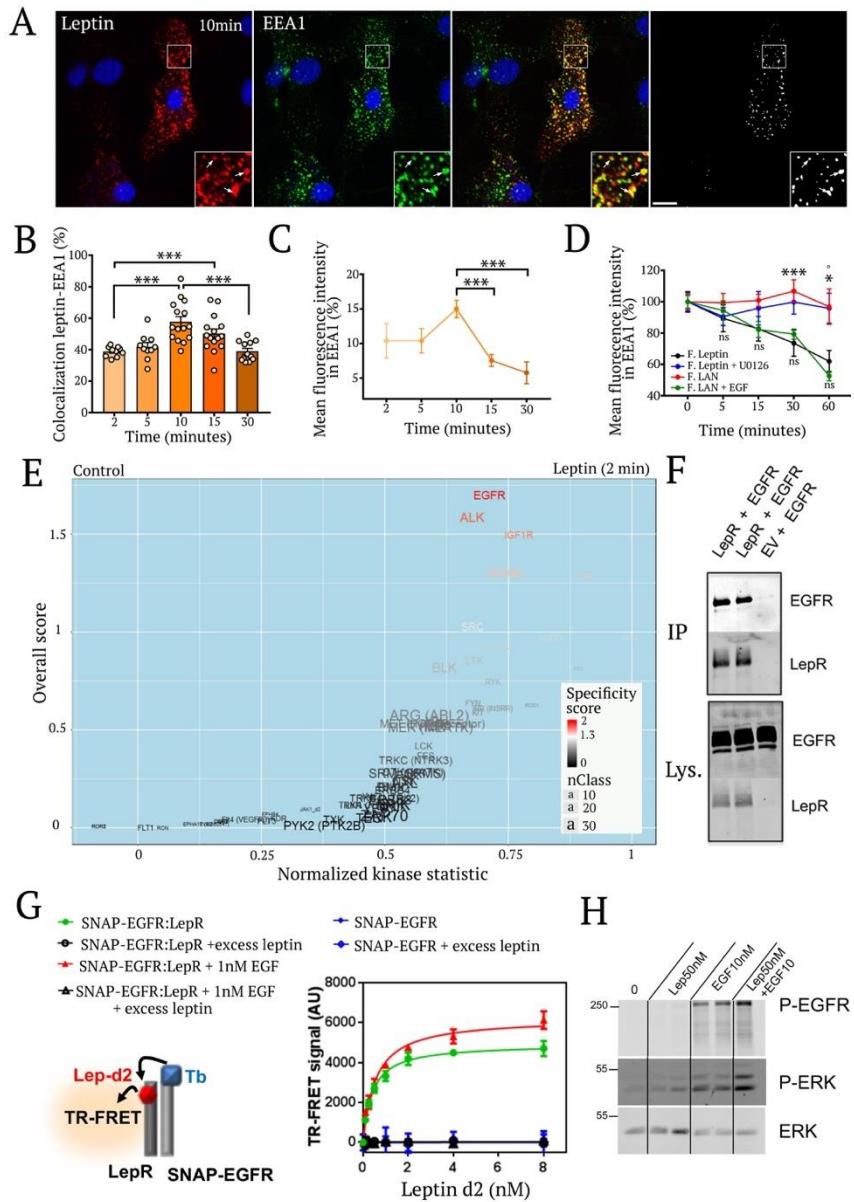
Next, since this transcytosis could be mediated by the leptin signaling cascade, characterized by the rapid activation of a series of tyrosine kinases (TK) and serine/threonine protein kinases (STK), we performed kinase profiling to explore differential global kinase activity in tanocytes in the presence or absence of 2 µg/ml leptin for 2, 5, 10 and 15 min. We used the PamGene array, which consists of 140 immobilized tyrosine- and serine/threonine-containing peptides that are the targets of most known kinases (TK and STK PamChips). Peptides whose phosphorylation varied significantly between control and leptin-treated primary tanocytes indicated the putative involvement of specific kinases activated in response to leptin. This kinase analysis revealed the significant activation of the EGFR pathway 2 min after leptin treatment (**Figure 2E**) and of MAP kinases including ERK2 15 min after leptin treatment (**Supplementary Figure 2E**). We have previously reported that ERK activation is required for the release of leptin internalized by tanocytes *in vitro*, and that the alteration of blood-borne leptin shuttling into the hypothalamus in diet-induced obese mice can be rescued by activating ERK using potent inducers such as EGF (Balland et al., 2014). Here, the novel and unexpected finding that EGFR itself is activated directly by leptin in tanocytes suggests a possible molecular pathway underlying our previous observations.

We then explored the interaction between EGFR and LepR signaling. Co-transfection experiments in HEK293 cells showed, interestingly, that EGFR was immunoprecipitated with LepR, suggesting that the two receptors physically interact with each other even in the absence of a ligand (**Figure 2F**). To study the effect of ligand binding on this interaction, we next used Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) in living cells to investigate the proximity

between leptin and EGF and their cognate receptors within the LepR:EGFR complex (**Supplementary Figure 2F**). Taking advantage of targeted fluorescently labeled SNAP-receptors (energy donor, Terbium (**Tb**)) and ligands (labeled with the energy acceptor, **d2**), TR-FRET enables the demonstration of the proximity of a ligand at a distance of 10 nm or less to a specific and unique receptor within a heteromeric receptor complex (Auriau et al., 2018). Because leptin does not bind to EGFR, the incubation of fluorescent d2-leptin even at high concentrations with fluorescently labeled SNAP-EGFR did not lead to any TR-FRET signal (**Figure 2G, Supplementary Figure 2F**). However, the co-expression of unlabeled LepR in fluorescent Tb-SNAP-EGFR-expressing cells in the presence of d2-leptin gave rise to a significant and specific TR-FRET signal, demonstrating the close proximity between SNAP-EGFR, LepR and d2-leptin (**Figure 2G, Supplementary Figure 2F**). This binding of d2-leptin to the SNAP-EGFR:LepR complex was seen to increase and to reach saturation in a concentration-dependent manner, with an affinity ( $K_D(\text{SNAP-EGFR:LepRb}) = 0.42 [0.26-0.49] \text{ nM}$ ) similar to the affinity of leptin binding to isolated LepR (Vauthier et al., 2013) (**Figure 2G**). EGF binding to EGFR did not modify the affinity of leptin binding to the LepR:EGFR complex (**Figure 2G**), but the significantly higher  $B_{\max}$  of the saturation curve indicates that it likely induced a conformational change in LepR within the molecular complex (**Figure 2G; Supplementary Figure 2G**). Similarly, cells expressing EGFR and fluorescent Tb-SNAP-LepR that were stimulated by d2-EGF (**Supplementary Figure 2H**) were seen to emit, as expected, a specific TR-FRET signal, reflecting the interaction between SNAP-LepR:EGFR:d2 (**Supplementary Figure 2I**). A weak TR-FRET signal detected between SNAP-LEPR and d2-EGF in the absence of heterologous EGFR may have arisen from a weak interaction between SNAP-LepR and endogenous EGFR. As suggested by the model fitting of the saturation curve, d2-EGF interacted with EGFR within the LepR:EGFR complex with the same affinity ( $K_D(\text{SNAP-LepRb:EGFR}) = 2.1 [1.6-2.5] \text{ nM}$ ) as to isolated EGFR alone ( $K_D(\text{SNAP-EGFR}) = 3.2 [2.4-3.7]$ ) (**Supplementary Figure 2J**). In line with the binding of d2-leptin or d2-EGF to their cognate receptors within the complex, the proximity of fluorescent leptin-Tb (energy donor) to d2-EGF (energy acceptor) was only detected when both LepR and EGFR were co-expressed (**Supplementary Figure 2K, 2L**), suggesting the formation of a quaternary complex including Leptin:LepR:EGFR:EGF in these cells.

In isolated tanycytes, combined treatment with leptin and EGF enhanced EGFR and ERK phosphorylation, supporting the intricate collaboration between these two receptors at the level of the tanycytic ERK signaling pathway (**Figure 2H**). Conversely, the inhibition of MEKK1, the upstream activator of ERK, using U0126 led to the accumulation of fluorescent leptin in EAA1-immunoreactive early endosomes, thus phenocopying the behavior of fluorescent LAN, which does not activate LepR, after its internalization in tanycytes (**Figure 2D, Supplementary Figure 2B, 2C, 2D**). We next verified whether this lack of LAN release from the early endosome compartment in tanycytes could be bypassed by directly activating the EGFR-ERK signaling pathway. EGF treatment (10 ng/ml) strikingly restored the trafficking of fluorescent LAN downstream of early endosomes

(Figure 2D) and its probable eventual release by tanyocytes (Supplementary Figure 2C). Overall, these data indicate that proper transcellular leptin transport in tanyocytes requires LepR-EGFR-ERK signaling and that EGFR activation occurs downstream to LepR activation.



**Figure 2. Tanyctic EGFR activity is required for leptin transcytosis**

(A) Endocytosed leptin colocalizing with early endosomes. Representative confocal images showing primary tanyocytes treated for 10 min with 125 nM fluorescent leptin (red) and antibodies to the early endosome marker EEA1 (green). The extent of colocalization is represented by the mask on the right. Arrows in inset point to examples of colocalized pixels. Scale bar: 10  $\mu$ m.

(B) Percentage of leptin colocalizing with EEA1 over time following object-based detection of fluorescent leptin and EEA1 vesicles. Values represent means  $\pm$  SEM. A Mann-Whitney test was applied. \*\*\*: p<0.001

(C) Percentage of endocytosed leptin found in the EEA1-positive compartment over time. Values represent means  $\pm$  SEM. A Mann-Whitney test was applied. \*\*\*: p<0.001

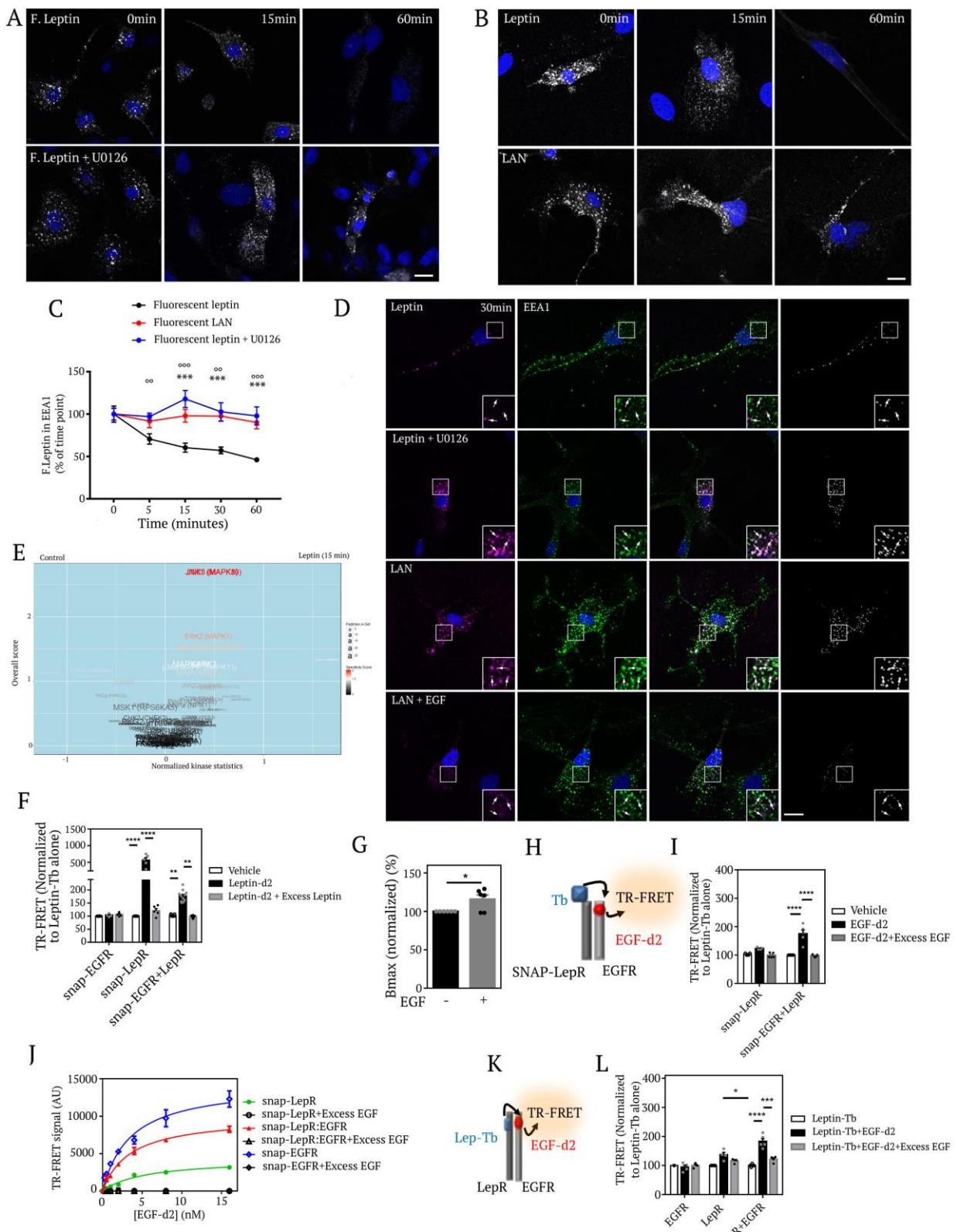
(D) Percentage of endocytosed fluorescent leptin or fluorescent LAN found in EEA1 compartments over time. Values represent means  $\pm$  SEM. A Mann-Whitney test was applied. \*\*\*: p<0.001

(E) Volcano plot showing differences in peptide phosphorylation between primary cultures of tanyocytes treated for 2 min with vehicle (PBS pH 8.0) or leptin (1 µg/ml in PBS pH 8.0) (n=4). Upstream kinases were identified using the Human Protein Reference Database.

(F) Co-immunoprecipitation of EGFR along with LepR in HEK293T cells; no co-immunoprecipitation of EGFR is observed when LepR is not expressed. IP, immunoprecipitation; Lys., cell lysate.

(G) Schematic representation of the TR-FRET technique (left). Right: specific saturation curves of leptin-d2 binding to its cognate receptor LepR within the LepR:SNAP-EGFR complex at the cell surface are obtained after 3h at 37 °C; no TR-FRET signal is detected when SNAP-EGFR is expressed in the absence of LepR. Saturation binding experiments are performed by adding an increasing dose of leptin-d2, combined or not with 1nM EGF, to HEK293 cells expressing SNAP-EGFR alone or in combination with LepR and pre-labeled with the fluorescent SNAP-Tb substrate. The TR-FRET signal is strongly displaced by an excess of unlabeled leptin (200nM).

(H) Phosphorylation of EGFR and ERK upon addition of leptin 50nM, EGF 10nM or both for 30min at 37 °C in primary tanyocytes.



**Supplementary Figure 2. MEKK1 inhibition blocks leptin release from the EEA1 compartment of tanyocytes.**

(A) Kinetics of leptin release by tanyocytes. Representative confocal images of tanyocytes subjected to a leptin pulse (125 nM) for 15 min (before the 0 min time point) and chased for 15 or 60 min in the absence or presence of the MEKK1 inhibitor (U0126, 10 μM). Scale bar: 10 μm

- (B) Kinetics of LAN release by tanyocytes. Representative confocal images for tanyocytes subjected to a fluorescent LAN pulse (125 nM) for 15 min (before the 0 min time point) and chased for 15 or 60 min. Scale bar: 10  $\mu$ m
- (C) Graph representing amounts of fluorescent leptin or LAN in cells treated or not with U0126 during the chase experiment (as a % of values at the 0 min time point). Mann-Whitney test. \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001. Values indicate means  $\pm$  SEM.
- (D) MAPK signaling is required for leptin to exit early endosomes. Representative confocal images for tanyocytes subjected to a fluorescent leptin or LAN pulse for 15 min and chased for 30 min in the absence or presence of U0126 (leptin) or EGF (LAN). Cells were labeled for EEA1 (green). Colocalized pixels are shown on the right panel and arrows in inset point to examples of colocalization. Scale bar: 10  $\mu$ m.
- (E) Volcano plot showing differences in peptide phosphorylation between primary cultures of tanyocytes treated with leptin (1  $\mu$ g/ml in PBS pH 8.0) or vehicle (PBS pH 8.0) for 15 min (n=4 per group). Upstream kinases were identified using the Human Protein Reference Database.
- (F) The TR-FRET signal generated upon the close proximity of d2-leptin (1nM) to fluorescent SNAP-EGFR is observed with the LepR:SNAP-EGFR complex but not with fluorescent SNAP-EGFR expressed alone. Two-way ANOVA with Tukey multiple comparison test was applied. \*\*: p<0.01, \*\*\*\*: p<0.0001. Values indicate means  $\pm$  SEM.
- (G) Increased Bmax values under conditions of co-stimulation with d2-leptin +EGF. An unpaired Student t-test was applied. \*: p<0.05. Values indicate means  $\pm$  SEM.
- (H) Schematic diagram of the TR-FRET-based assay for EGF-d2 binding to the SNAP-LepR:EGFR complex. Two-way ANOVA with Tukey multiple comparison test was applied. \*\*\*\*: p<0.0001. Values indicate means  $\pm$  SEM.
- (I) The TR-FRET signal due to the close proximity of EGF-d2 (1nM) to fluorescent SNAP-LepR, associated with endogenously expressed EGFR, is increased with the ectopic expression of EGFR, favoring the formation of the SNAP-LepR:EGFR complex. Values indicate means  $\pm$  SEM.
- (J) Saturation of binding of EGF-d2 to SNAP-LepRb- or (LepRb + EGFR)-expressing cells yielded a  $K_D$  =3.90 [2.09-5.71] nM and  $K_D$  =2.08 [1.63-2.53] nM, respectively. These  $K_D$  values are comparable to EGF-d2 binding to SNAP-EGFR ( $K_D$  =3.21 [2.40-3.69] nM). Data are presented as means  $\pm$  SD of 3 replicates of 1 representative experiment out of 3 independent experiments. The mean dissociation constant was determined from the average of the Kd values extracted from a fitting analysis of the saturation curve of 3 independent experiments with non-linear regression “one-site specific binding equation.
- (K-L) The TR-FRET signal is detected only when LepR and EGFR are co-expressed in cells allowing the proximity of fluorescent leptin-Tb (1nM) with fluorescent EGF-d2 (1nM), with both ligands binding specifically to their cognate receptors within the LepR:EGFR complex. By competing with EGF-d2, an excess of unlabeled EGF (200nM) drastically abrogated the TR-FRET signal. Two-way ANOVA with Tukey multiple comparison test was applied. \*: p<0.05, \*\*: p<0.001, \*\*\*\*: p<0.0001. Values indicate means  $\pm$  SEM.

### **3. Mice lacking LepR in adult tanocytes show increased weight gain linked to restricted access of blood-borne leptin to the hypothalamus**

To examine the functional role of LepR expression in adult tanocytes, we used the injection of the Tat-Cre recombinant protein into the third ventricle (3V) of *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice. The use of *tdTomato<sup>loxP-STOP-loxP</sup>* reporter mice revealed that 2  $\mu$ l Tat-Cre infusion into the 3V (1.27  $\mu$ g/ $\mu$ l over 15 min) caused genetic recombination in about 60% of the tanocytes of the median eminence (**Supplementary Figure 3B and 3C**), but not in tanocytes of the area postrema, another circumventricular organ in the brainstem involved in the regulation of energy homeostasis (Langlet et al., 2013b) (**Supplementary Figure 3D**). In contrast, Tat-Cre infusion into the fourth ventricle (4V) was seen to target both median eminence and area postrema tanocytes (**Supplementary Figure 3D**). Notably, Tat-Cre infusion into the lateral ventricle was ineffective in inducing Tomato expression in median eminence tanocytes (**Supplementary Figure 3A and 3C**).

Isolation of median eminence tanocytes using FACS after the infusion of Tat-Cre into the 3V of *tdTomato<sup>loxP-STOP-loxP</sup>; LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice (**Figure 3A**) showed that the expression of transcripts encoding both the short forms of LepR as well as LepRb was significantly diminished in Tomato-positive cells, when compared to *tdTomato<sup>Tan</sup>; LepR<sup>+/+</sup>* mice (**Figure 3B and 3C**). Interestingly, the transcript of Socs3, a known leptin-responsive transcriptional target (Howard and Flier, 2006), was also found to be downregulated in Tomato-positive cells from *tdTomato<sup>Tan</sup>; LepR<sup>TanKO</sup>* mice (**Figure 3D**). Importantly, such downregulation of *LepR* and *Socs3* mRNA levels was not found in Tomato-negative cells (**Figure 3B-3D**).

Mice lacking LepR in tanocytes of the median eminence were seen to eat more (**Figure 3E and Supplementary Figure 3E**) and to gain significantly more weight (**Figure 3F**) than control littermates with normal tanycytic LepR expression. Surprisingly, this weight gain was independent of hyperphagia, since *LepR<sup>TanKO</sup>* mice pair-fed with controls gained the same weight as *LepR<sup>TanKO</sup>* mice fed *ad libitum*. To characterize the reason for this change in body weight, we monitored these mice using an indirect calorimetry system. Weight gain in *LepR<sup>TanKO</sup>* mice was associated with an increased respiratory exchange ratio (RER) during the light phase (**Supplementary Figure 3F**), a phenomenon that was conserved under the pair-fed condition (**Figure 3G**), in which *LepR<sup>TanKO</sup>* mice kept gaining more weight than *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* littermates (**Figure 3F**), even though energy expenditure (**Supplementary Figure 3G and 3M**) and locomotor activity (**Supplementary Figure 3H and 3N**) remained unchanged. These phenomena were reproduced when tanocytes were transduced with a viral vector expressing Cre under the control of the tanocyte-specific Dio2 promoter (Muller-Fielitz et al., 2017), as an alternative to Tat-Cre infusion into the 3V (**Supplementary Figure 3I-3L**).

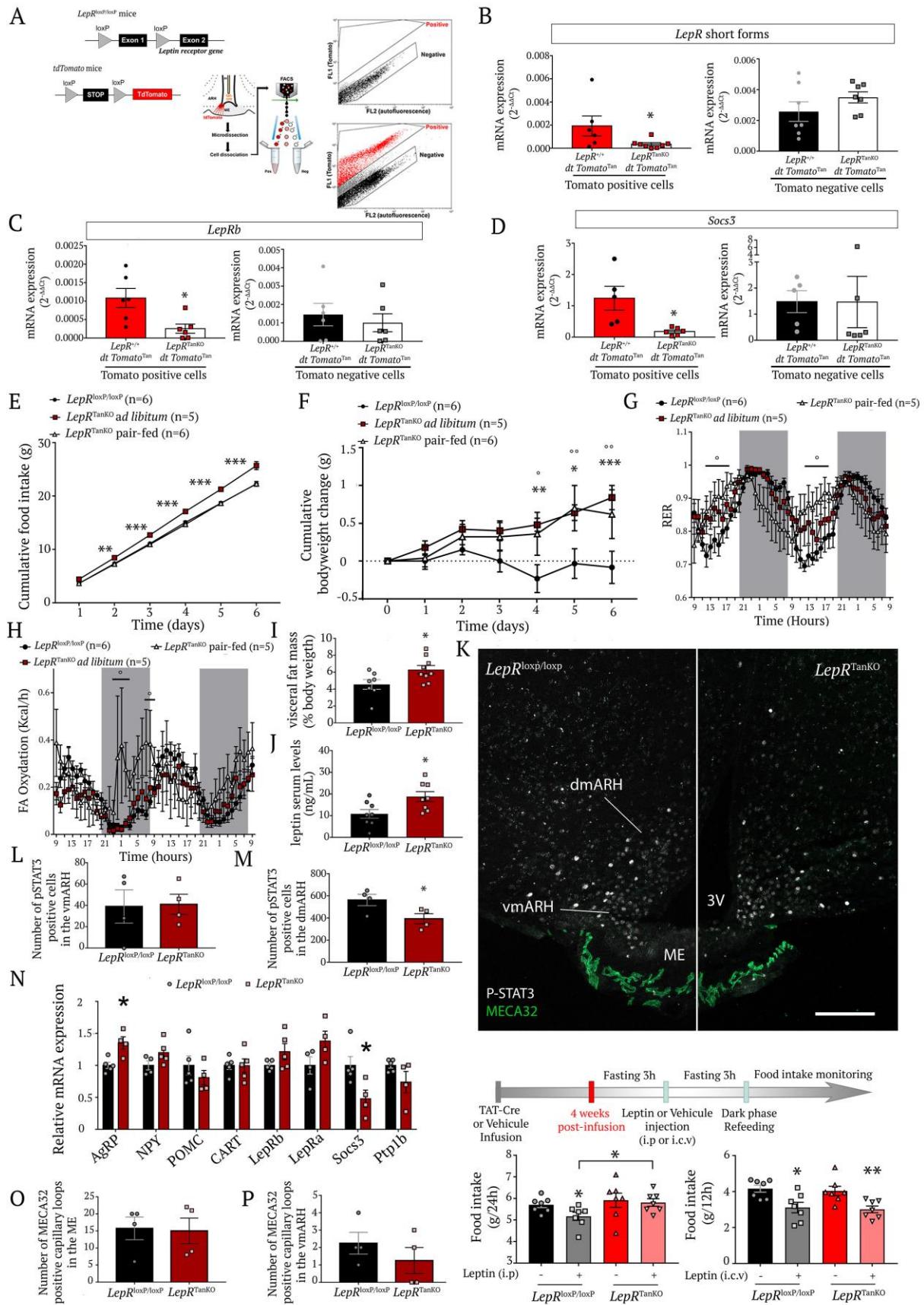
Increased food intake (**Figure 3E**) despite elevated adiposity and circulating levels of leptin in *LepR<sup>TanKO</sup>* mice (**Figure 3I and 3J**) raises the possibility that these animals may be developing hypothalamic resistance to circulating leptin, which could be linked to defective leptin transport

across the blood-brain barrier into the CSF by tanycytes, as seen in various animal models at early stages of diet-induced obesity (Balland et al., 2014; Chmielewski et al., 2019). First, to confirm that this phenomenon occurs under physiological conditions, we assessed endogenous STAT3 activation in the ARC at lights on, after overnight feeding, when circulating leptin levels are at their highest (Sukumaran et al., 2010), and which has previously been shown to be linked to endogenous LepR activation (Balland et al., 2019; Langlet et al., 2013a). While the number of P-STAT3-immunoreactive cells lying outside the blood-brain barrier in the ventromedial ARC (vmARC) was seen to be unaffected in *LepR*<sup>TanKO</sup> mice (**Figure 3K and 3L**), the number of P-STAT-3 immunoreactive cells in the dorsomedial ARC (dmARC) was diminished by about 30% in these mutant mice when compared to *LepR*<sup>loxP/loxP</sup> control littermates (**Figure 3K and 3M**). Next, to determine how this decreased sensitivity to peripheral leptin could impact the neuronal populations of the ARC involved in the control of body homeostasis, we analyzed the expression of several key transcripts by Q-PCR. **Figure 3N** shows that, in *LepR*<sup>TanKO</sup> mice, transcripts coding for the melanocortin receptor antagonist *Agrp* were significantly induced, whereas *Socs3* mRNA levels were downregulated. However, examination of the fenestral diaphragms of median eminence endothelial cells using antibodies to MECA-32 showed that the number of fenestrated capillary loops in the median eminence and the vmARC were comparable in mutant and control mice, indicating that this decrease in leptin signaling in *LepR*<sup>TanKO</sup> mice was not accompanied by any changes in the permeability of ME capillary loops reaching the ARC (**Figure 3K, 3O and 3P**). Finally, we subjected *LepR*<sup>TanKO</sup> mice as well as their control littermates to intraperitoneal (i.p.) or intracerebroventricular (i.c.v.) injection of exogenous leptin and measured food intake 24h and 12h later, respectively (**Figure 3Q**). While exogenous leptin injected i.c.v. directly into the CSF was equally efficient in reducing feeding in both groups of mice, *LepR*<sup>TanKO</sup> mice, in contrast to *LepR*<sup>loxP/loxP</sup> mice, were unable to respond to exogenous leptin injected i.p. by decreasing food intake (**Figure 3Q**), confirming that this decreased response to peripheral leptin in *LepR*<sup>TanKO</sup> mice was due to an alteration in the LepR-dependent tanycytic transport of blood-borne leptin into the CSF.

Given the increase in RER in *LepR*<sup>TanKO</sup> mice (**Figure 3G**), indicative of increased consumption of carbohydrates over lipids to meet energy requirements (Tschöp et al., 2000), we next examined how lipid metabolism was altered in mice in which leptin transport into the hypothalamus was defective. The changes in RER and food-intake-independent body weight gain in *LepR*<sup>TanKO</sup> mice appeared to be due to decreased fatty acid oxidation (**Figure 3H**), which was associated with an increase in both visceral fat mass (**Figure 3I**) and leptinemia (**Figure 3J**) and elevated circulating levels of cholesterol and triglycerides (**Supplemental figure 4A**), but not of non-esterified free fatty acids (NEFAS) (**Supplemental figure 4B**). These data, together with an increase in the size of white adipocytes (**Supplemental figure 4C**), suggest that *LepR*<sup>TanKO</sup> mice show hyperlipidemia and lipid accumulation in white adipocytes.

In agreement with the increased uptake of free fatty acids into white adipose tissue in response to central leptin deficiency (Buettner et al., 2008), *LepR<sup>TanKO</sup>* mice showed a marked increase in protein levels of lipoprotein lipase (LPL), an enzyme that promotes the uptake of circulating triglycerides, and acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase (FAS), enzymes crucial for *de novo* lipogenesis, in ependymal fat, the major visceral fat depot in rodents (**Supplemental figure 4D and 4E**). Of note, the ratio of phospho-Acc to total Acc was decreased in *LepR<sup>TanKO</sup>* mice (**Supplemental figure 4D and 4E**), which suggests, in agreement with previously published data (Buettner et al., 2008), that hypothalamic leptin regulates ACC in white adipose tissue. We next examined the expression of the key lipolytic enzyme hormone-sensitive lipase (HSL), the activity of which is also known to be regulated by central leptin signaling (Buettner et al., 2008), and found that the levels of phosphorylation-activated Hsl were lower in *LepR<sup>TanKO</sup>* mice than in control littermates (**Supplemental figure 4D and 4E**). Overall, these results indicate that the lack of LepR in tanycytes favors the accumulation of lipids by promoting lipogenesis and lipid uptake while inhibiting lipolysis in white adipose tissue. Importantly, these effects were independent of feeding since they occurred in both *LepR<sup>TanKO</sup>* mice fed *ad libitum* and those pair-fed with the control group.

Increased accumulation of lipids was also noted in the liver of *LepR<sup>TanKO</sup>* mice using oil red staining (**Supplemental figure 4F**). Accordingly, liver triglyceride content was seen to be increased in these mice even in the pair-fed condition (**Supplemental figure 4G**), whereas circulating triglyceride levels were comparable to those in *LepR<sup>lloxP/lloxP</sup>* controls (**Supplemental figure 4A**). Given the absence of any marked change in the expression of enzymes involved in lipid metabolism (**Supplemental figure 4H and 4I**), the increase in lipid accumulation in the liver of *LepR<sup>TanKO</sup>* mice is likely not due to local *de novo* synthesis but indirectly to the increased weight and hyperlipidemia of these mice.



**Figure 3. Selective LepR deletion in tanycytes causes hypothalamic resistance to circulating leptin.**

**(A)** Schematic diagram and gating strategy for sorting Tomato positive putative tanycytes following TAT-Cre infusion into the third ventricle (3V) of *LepR<sup>+/+</sup>;tdTomato*<sup>loxP-STOP-loxP</sup> mice and *LepR<sup>loxP/loxP</sup>;tdTomato*<sup>loxP-STOP-loxP</sup> littermates.

**(B-D)** mRNA expression levels of short forms (**B**) and the long form, LepRb (**C**), of the leptin receptor, and of Socs3 (**D**) in tdTomato-positive cells (left panels) and tdTomato-negative cells (right panels). Student t-test or Mann-Whitney U test was applied, depending Shapiro-Wilk normality test results. \*: p<0.05; *LepR<sup>+/+</sup>* tdTomato<sup>Tan</sup> vs. *LepR<sup>TanKO</sup>* tdTomato<sup>Tan</sup>. Values indicate means ± SEM.

**(E)** Cumulative food intake in *LepR<sup>TanKO</sup>* mice 12 weeks after TAT-Cre infusion pair-fed with their control littermates. 2-way ANOVA with Tukey's correction; \*\*: p<0.01, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* pair-fed vs. *LepR<sup>TanKO</sup>* fed *ad libitum*; \*\*\*: p<0.001, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* pair-fed vs *LepR<sup>TanKO</sup>* *ad libitum*. Values indicate means ± SEM.

**(F)** Cumulative body weight change. 2-way ANOVA with Tukey's correction; \*: p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>* fed *ad libitum*; \*\*: p<0.01, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>* fed *ad libitum*; \*\*\*: p<0.001, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>* fed *ad libitum*; °: p< p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>* pair-fed; °°: p< p<0.01, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>* pair-fed. Values indicate means ± SEM.

**(G)** Energy ratio (RER) over time. 2-way ANOVA with uncorrelated Fisher's LSD test; °: p< p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>* pair-fed. Values indicate means ± SEM.

**(H)** Fatty-acid (FA) oxidation over time. 2-way ANOVA with uncorrelated Fisher's LSD test; °: p< p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>* pair-fed. Values indicate means ± SEM.

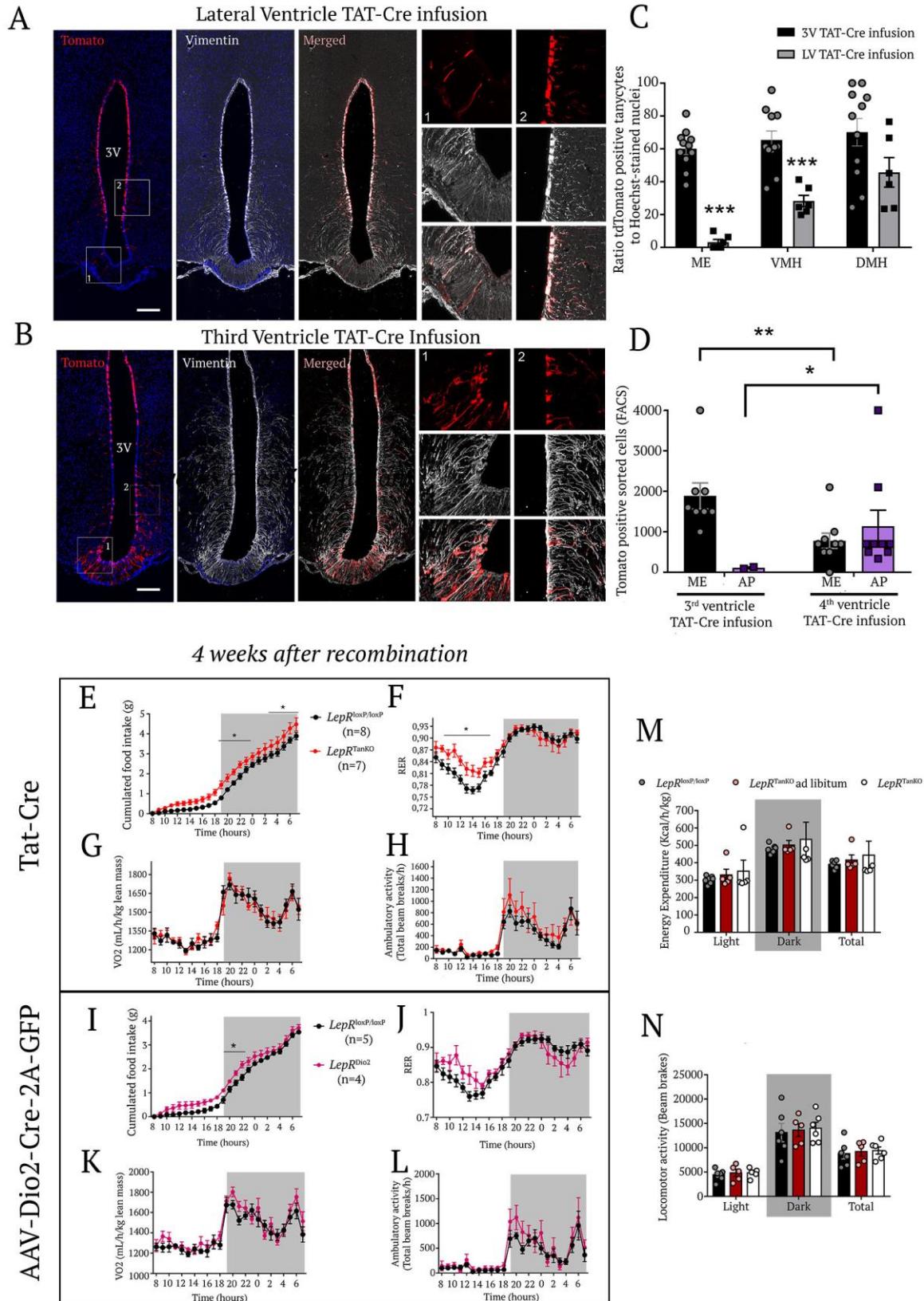
**(I,J)** Visceral fat mass (**I**) and serum leptin levels (**J**) 12 weeks after TAT-Cre infusion. Mann-Whitney U test; \*: p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.

**(K-M)** Representative photomicrograph (**K**) and quantification of basal pSTAT3 immunofluorescence (**L, M**) in the ventromedial (vm) and dorsomedial (dm) arcuate nucleus (ARC) and the median eminence (ME). Scale bar: 200µm. Unpaired Student t-test was applied. \*: p<0.05 *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.

**(N)** Relative mRNA expression levels of several genes known to be involved in the hypothalamic regulation of energy homeostasis and leptin activity in the microdissected medio-basal hypothalamus (MBH) of *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Student t-test or Mann-Whitney U test was applied, depending Shapiro-Wilk normality test results.. \*: p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.

**(O, P)** MECA32 quantification in the arcuate nucleus (ARC) and the median eminence (ME). Values indicate means ± SEM.

**(Q)** Schematic diagram showing the design of the leptin tolerance test using either intraperitoneal (i.p.) or intracerebroventricular (i.c.v.) routes for leptin administration. Bottom left graph represents food intake in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* (black and grey bars) and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice (red and pink bars) 24h after i.p. leptin (3mg/kg, grey and pink bars) or vehicle (PBS pH 8.0, black and red bars) administration. Bottom right graph represents food intake in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice 12h after i.c.v. leptin (2µg in 2µL) or vehicle (2µL PBS pH 8.0) injection. Mann-Whitney U test; \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; leptin vs. vehicle and between indicated groups. Values indicate means ± SEM.



**Supplementary Figure 3:** Tat-Cre injected into the third ventricle is the optimal method to induce gene recombination in median eminence tanyocytes.

**(A-B)** Representative photomicrographs of endogenous tdTomato (red) and Vimentin (green) in the median eminence and walls of third ventricle after TAT-Cre infusion into the lateral ventricle (**A**) or third ventricle (**B**). Insets magnified at right to show the cell shape and precise colocalization between vimentin and tdTomato labeling. Scale bar: 200 $\mu$ m.

**(C)** Graph representing ratio of tdTomato-positive tanycytes to Hoechst-stained nuclei at different levels of the third ventricle after TAT-Cre infusion in the lateral ventricle (LV) and the third ventricle (3V). Student's t-test; \*\*\*: p<0.001, 3V injection vs. LV injection. Values indicate means  $\pm$  SEM.

**(D)** Graph representing the number of tdTomato-positive FACS-sorted cells from the median eminence (black) and area postrema (purple) after TAT-Cre infusion into the 3<sup>rd</sup> (left) or 4<sup>th</sup> ventricle (right). Student's t-test. \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, 3V injection vs. 4V injection. Values indicate means  $\pm$  SEM.

**(E-L)** Four weeks after effective recombination, TAT-Cre (**E-H**) and AAV-Dio2-iCre-2A-GFP virus infusion (**I-L**) induce the same phenotype in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice for basal metabolism. Two-day basal food intake (**E,I**), respiratory energy ratio (RER, **F,J**), oxygen consumption (**G,K**) and locomotor activity (**H,L**) monitored in *LepR<sup>TanKO</sup>* mice 4 weeks after Cre infusion/expression and in control littermates. 2-way ANOVA with uncorrelated Fisher's LSD test; \*: p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means  $\pm$  SEM.

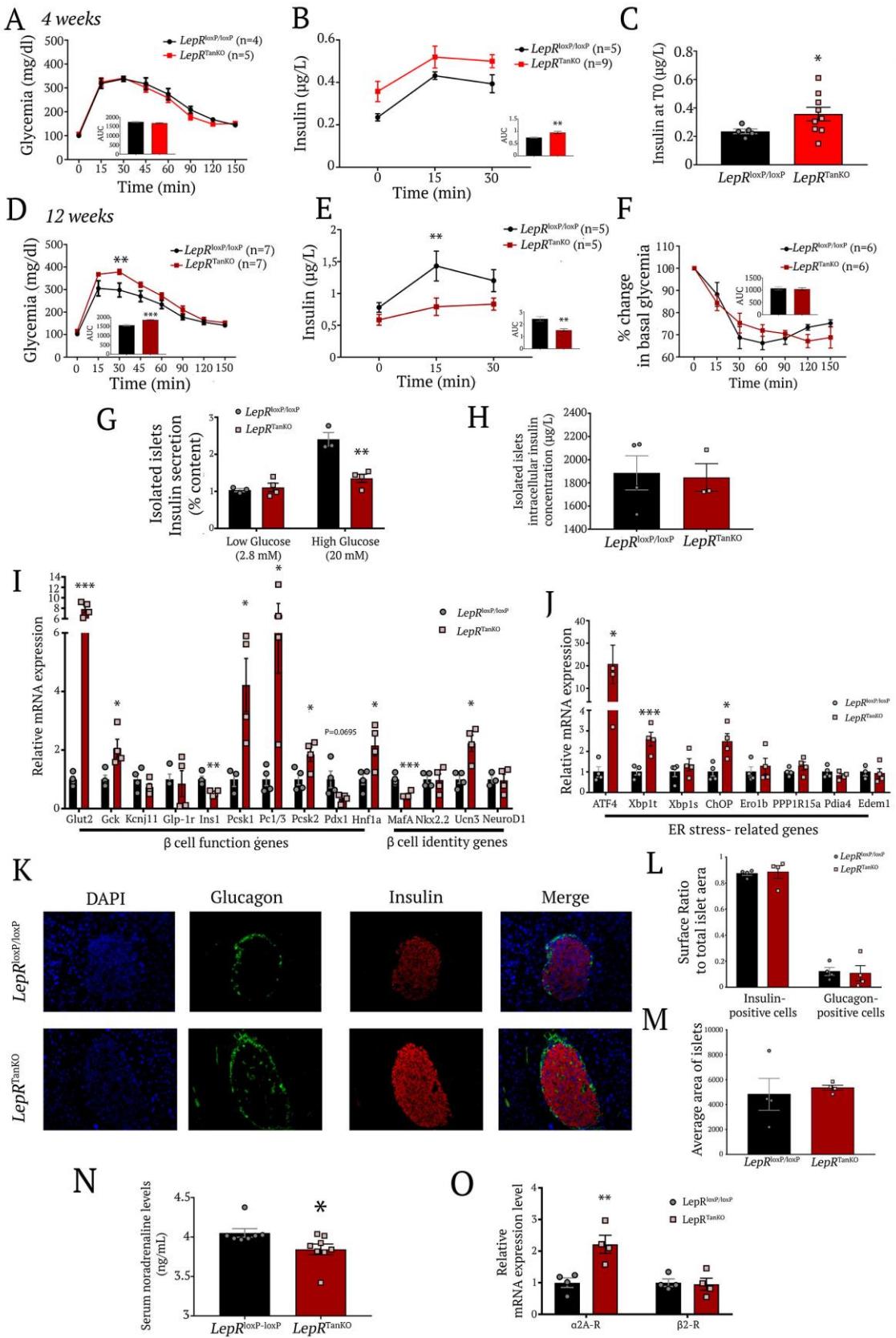
**(M-N)** Bar graphs representing energy expenditure and locomotor activity during the pair-fed experiment in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means  $\pm$  SEM.

#### 4. Mice lacking LepR in tanocytes sequentially develop insulin resistance and defective insulin-secretory capacity

Leptin has long been known to influence glucose homeostasis independent of its effect on body weight regulation (Pelleymounter et al., 1995; Schwartz et al., 1996). These effects appear to be mediated by leptin action on LepR-expressing neurons in the ARC, since the local reintroduction of LepR expression in the ARC of otherwise LepR-knockout animals normalizes insulinemia in these animals (Coppari et al., 2005). In light of the altered gene expression in ARC neurons observed in our mice, we therefore next investigated the effect of LepR deletion in tanocytes in glucose metabolism. Four weeks after LepR deletion, mice did not appear to have any problem in managing exogenous injections of glucose (**Figure 4A**). However, monitoring glucose-stimulated insulin release in *LepR*<sup>TanKO</sup> mice at 4 weeks intriguingly showed that, despite normal glucose tolerance at this early time point (**Figure 4A**), the mice were secreting more insulin than control *LepR*<sup>loxP/loxP</sup> littermates to manage the bolus of exogenous glucose, indicating the development of insulin resistance (**Figure 4B**). Interestingly, we also observed hyperinsulinemia in 4-week *LepR*<sup>TanKO</sup> mice after a 12h fast (**Figure 4C**). This fasting hyperinsulinemia may be linked to the inability of ARC neurons to appropriately perceive circulating leptin levels, as suggested by decreased STAT3 activation after overnight feeding (**Figure 3K**) and the downregulation of Socs3 in the ARC of *LepR*<sup>TanKO</sup> mutants (**Figure 3N**).

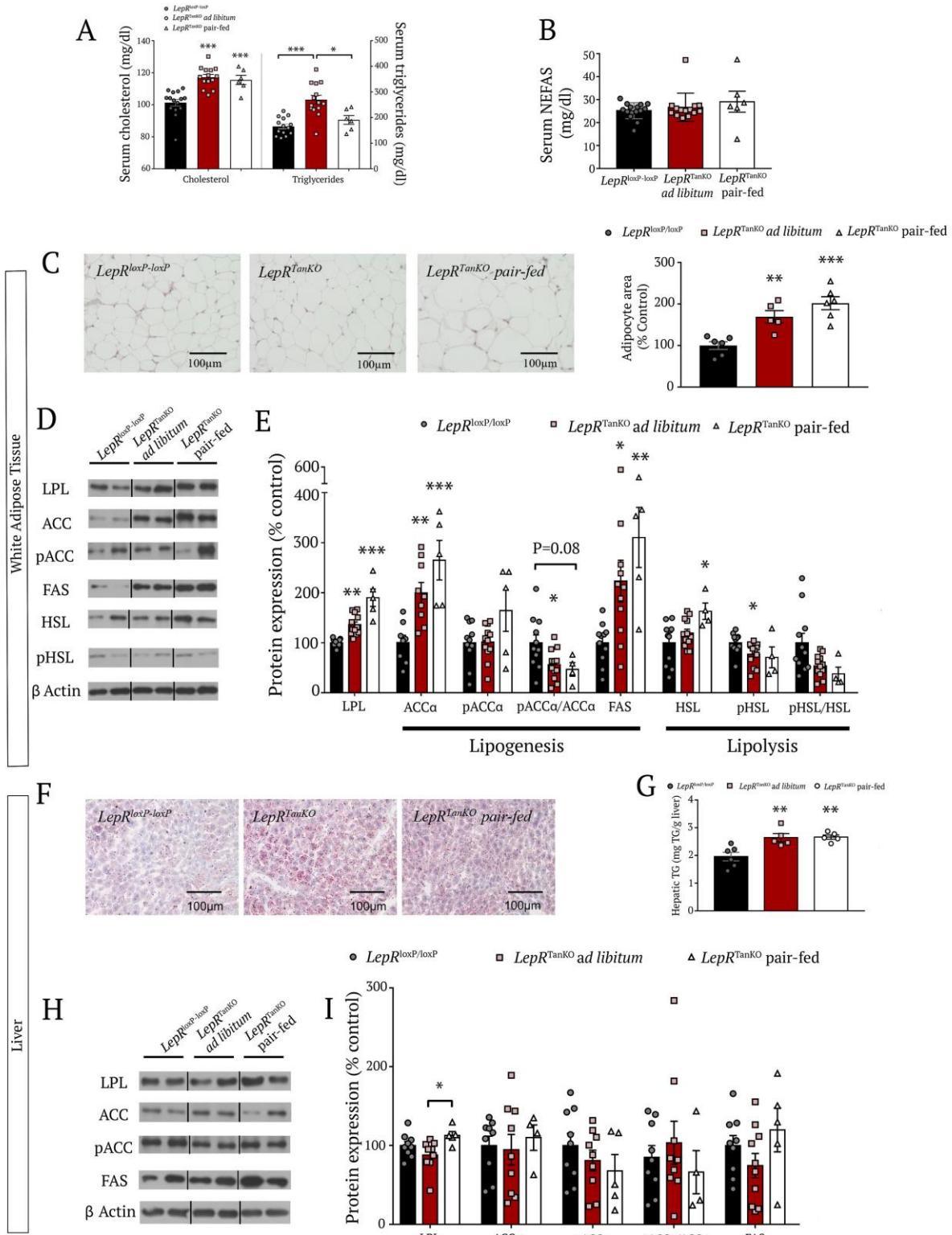
By 12 weeks after LepR deletion, however, *LepR*<sup>TanKO</sup> mice developed impaired tolerance to exogenous glucose (**Figure 4D**). This deficient glucose homeostasis was correlated with a significantly lower increase in glucose-stimulated insulin levels in *LepR*<sup>TanKO</sup> mice, suggesting some degree of pancreatic dysfunction in these mice (**Figure 4E**). Insulin sensitivity was similar in the two genotypes (**Figure 4F**). To investigate possible alterations in pancreatic function in mice lacking LepR in tanocytes, we investigated glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in isolated pancreatic islets from *LepR*<sup>TanKO</sup> and *LepR*<sup>loxP/loxP</sup> littermates. Although *LepR* deletion in tanocytes did not affect the total insulin content of islets (**Figure 4H**), insulin secretion from islets was severely hampered under high glucose conditions in 12-week *LepR*<sup>TanKO</sup> mice when compared to *LepR*<sup>loxP/loxP</sup> controls (**Figure 4G**). Gene expression analysis in islets from 12-week *LepR*<sup>TanKO</sup> mice compared to controls revealed the increased expression of genes involved in glucose sensing (*Glut2*, *Gck*) and insulin maturation (*Pcsk1*) but decreased expression of key β-cell identity genes such as *Pdx1* ( $p=0.066$ ) and *MafA* (**Figure 4I**). *LepR*<sup>TanKO</sup> islets also exhibited an increase in the expression of markers of the endoplasmic reticulum (ER) unfolded protein response (UPR<sub>er</sub>) pathway, including *Atf4*, *Xpb1t* and *Chop* (**Figure 4J**), thought to be associated with impaired β-cell function and T2D development (Back and Kaufman, 2012). The number of α (glucagon-positive) and β (insulin-positive) cells per islet was similar in the pancreas of the two genotypes (**Figure 4K, 4L, 4M**). Altogether, these data suggest that the loss of *LepR* function in tanocytes impairs glucose homeostasis and insulin secretion through the transcriptional control of key pancreatic β-cell and

UPR<sup>er</sup> markers, preceded by the development of mild insulin resistance, and that the whole sequence of events unfolds within 3 months of altering the tanyctic shuttling of leptin into the hypothalamus.



**Figure 4.** Loss of LepR expression in median eminence tanycytes causes severe pancreatic  $\beta$  cell dysfunction possibly due to defective noradrenaline activity

- (A) Curve representing glycemia during a glucose tolerance test in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 4 weeks after TAT-Cre infusion. Graph represents the area under the curve; 2-way ANOVA with Tukey's correction. Values indicate means ± SEM.
- (B) Serum insulin concentrations during the first 30 mins of a glucose tolerance test in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 4 weeks after TAT-Cre infusion; 2-way ANOVA with Tukey's correction; \*: p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Graph represents the area under the curve; Student's t-test; \*\*: p<0.01, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.
- (C) Graph representing serum insulin concentrations at T0 of the glucose tolerance test; Student's t-test; \*: p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.
- (D) Curve representing glycemia during a glucose tolerance test in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion; 2-way ANOVA with Tukey's correction; \*\*: p<0.01, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Graph represents the area under the curve; Student's t-test; \*\*\*: p<0.001, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.
- (E) Serum insulin concentrations during the first 30 mins of a glucose tolerance test in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion; 2-way ANOVA with Tukey's correction; \*\*: p<0.01, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs *LepR<sup>TanKO</sup>*. Graph represents the area under the curve; Student's t-test; \*\*: p<0.01, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.
- (F) Percentage change in basal glycemia during an insulin tolerance test in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means ± SEM.
- (G) Graph representing insulin secretion from total isolated pancreatic islets from *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion, following treatment with low or high glucose concentrations. Student's t-test; \*\*: p<0.01, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.
- (H) Graph representing insulin concentrations in isolated pancreatic islets from *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means ± SEM.
- (I) Relative mRNA expression levels of markers of β cell function and identity in isolated pancreatic islets from *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Student t-test or Mann-Whitney U test was applied, depending Shapiro-Wilk normality test results. \*: p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.
- (J) Relative mRNA expression levels of ER stress markers in isolated pancreatic islets from *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Student t-test or Mann-Whitney U test was applied, depending Shapiro-Wilk normality test results. \*: p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.
- (K) Confocal images representing nuclei (blue), glucagon (green) and insulin (red) in isolated pancreatic islets from *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion.
- (L) Graphs representing the ratio between insulin-positive (left) or glucagon-positive area (right) to the total islet surface area in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means ± SEM.
- (M) Graph representing the average surface area of pancreatic islets from *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means ± SEM.
- (N) Relative mRNA expression levels of adrenergic receptors in isolated pancreatic islets from *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Student's t-test; \*\*: p<0.01, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.
- (O) Graph representing serum noradrenaline concentrations in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Student's t-test. \*: p<0.05, *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* vs. *LepR<sup>TanKO</sup>*. Values indicate means ± SEM.



**Supplementary Figure 4: Selective LepR deletion in tanycytes causes hyperleptidemia and steatosis**

(A) Graphs representing serum cholesterol and triglyceride concentrations in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice fed *ad libitum* on chow and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice pair-fed with *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test or Krustal-Wallis test with Dunn multiple comparison test were applied depending Shapiro-Wilk normality test results. \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.001$ , *LepR<sup>TanKO</sup> ad libitum* or *LepR<sup>TanKO</sup>* pair fed vs. *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice. Values indicate means  $\pm$  SEM.

**(B)** Graph representing serum non-esterified fatty acid (NEFAS) concentrations in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice fed *ad libitum* on chow and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice pair-fed with *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test \*:  $p<0.05$ ; \*\*\*:  $p<0.001$ , *LepR<sup>TanKO</sup>* *ad libitum* or *LepR<sup>TanKO</sup>* pair fed vs. *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice. Values indicate means  $\pm$  SEM.

**(C)** Representative images of histological hematoxylin-eosin staining of the adipose tissue in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice fed *ad libitum* on chow and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice pair-fed with *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice. Graph shows quantification of adipocyte size. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test. \*\*:  $p<0.01$ , \*\*\*:  $p<0.001$ , *LepR<sup>TanKO</sup>* *ad libitum* or *LepR<sup>TanKO</sup>* pair fed vs. *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice. Values indicate means  $\pm$  SEM.

**(D)** Representative western blots of the different proteins mentioned in **(E)**.

**(E)** Graph representing protein expression levels of several proteins implicated in fatty acid synthesis or fatty acid lipolysis in white adipose tissue from *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Lipoprotein lipase (LPL) is implicated in the lipids uptake from the circulation to the adipose tissue. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test or Krustal-Wallis test with Dunn multiple comparison test. \*:  $p<0.05$ ; \*\*\*:  $p<0.001$ , *LepR<sup>TanKO</sup>* *ad libitum* or *LepR<sup>TanKO</sup>* pair fed vs. *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice. Values indicate means  $\pm$  SEM.

**(F)** Representative Oil-Red-stained images from the liver of *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice fed *ad libitum* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice pair-fed with *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice.

**(G)** Quantification of triglycerides in the liver of *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice fed *ad libitum* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice paired-fed with *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test. \*\*:  $p<0.01$ , *LepR<sup>TanKO</sup>* *ad libitum* or *LepR<sup>TanKO</sup>* pair fed vs. *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice. Values indicate means  $\pm$  SEM.

**(H)** Representative western blots of the different proteins mentioned in **(I)**.

**(I)** Graph representing protein expression levels of several proteins implicated in fatty acid synthesis and lipid uptake from the circulation into the liver in *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice fed *ad libitum* and *LepR<sup>TanKO</sup>* mice paired-fed with *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test. \*:  $p<0.05$ ; *LepR<sup>TanKO</sup>* pair fed vs. *LepR<sup>TanKO</sup>* *ad libitum* mice. Values indicate means  $\pm$  SEM.

## 5. Impaired access of leptin to the hypothalamus could mediate central effects on glucose and lipid metabolism through altered melanocortin signaling and sympathetic tone

Finally, the central effects of leptin on glucose homeostasis appear to involve the melanocortin system (Berglund et al., 2012), which we have shown above to be altered in *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, and which impinges onto the sympathetic nervous system (Muzumdar et al., 2003; Sohn et al., 2013). In addition, the sympathetic nervous system is also known to mediate the central effects of leptin on white adipose tissue lipid metabolism (Buettner et al., 2008). We therefore next assessed circulating noradrenaline levels in *LepR<sup>TanKO</sup>* mice, with their defective tanyctic shuttling of leptin into the hypothalamus (**Figure 3K, 3M and 3Q**), and found that the levels of noradrenaline were reduced, suggesting an overt decrease in sympathetic tone when compared to control *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* littermates (**Figure 4N**). Interestingly, the pancreatic islets of *LepR<sup>TanKO</sup>* animals express more  $\alpha$ 2A adrenergic receptors compared to their littermates without affecting the expression of  $\beta$ 2 adrenergic receptors (**Figure 4O**).  $\alpha$ 2A adrenergic receptors are known for their inhibitory action on insulin secretion by the pancreas (Fagerholm et al., 2011; Rosengren et al., 2010). Together, these results suggest a possible mechanistic pathway whereby decreased leptin access to hypothalamic neurons controlling bodily homeostasis alters melanocortin signaling in these neurons and overall sympathetic tone, which mediate its effects on peripheral glucose and lipid metabolism.

## III. Matériel et Méthodes

### Animals

All C57Bl/6J mice were housed under specific pathogen-free conditions in a temperature-controlled room (21-22 °C) with a 12h light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water. *tdTomato<sup>loxP-STOP-loxP</sup>* (Stock No.007914) and *GCamp3<sup>loxP-STOP-loxP</sup>* (Stock No.025406) reporter mice and *LepR<sup>loxP/loxP</sup>* mice (Stock No. 08327) (Cohen et al., 2001a) were purchased from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). *Trnp5::Cre* mice have been engineered by Dr. Ulrich Boehm (University of Saarland, Homburg, Germany) and published elsewhere (Kusumakshi et al., 2015; Slezak et al., 2012). Animal studies were approved by The Institutional Ethics Committees for the Care and Use of Experimental Animals of the University of Lille; all experiments were performed in accordance with the guidelines for animal use specified by the European Union Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU).

### TAT-Cre and pAAV-Dio2-iCre-2A-GFP Delivery

A TAT-Cre fusion protein and the AAV 1/2 *Dio2::Cre* virus were produced as detailed previously (Muller-Fielitz et al., 2017; Peitz et al., 2002). Both products were stereotactically infused into the third ventricle (2uL over 7 min at 1,27 mg/ml; anteroposterior, -1.7 mm; midline, 0 mm; dorsoventral, -5.6 mm), the lateral ventricle (Anteroposterior, -0.3 mm; midline, +/- 1 mm; dorsoventral, -3 mm) or the forth ventricle (Anteroposterior, -6 mm; midline, 0 mm; dorsoventral, -

4 mm) of 24-h fasted isoflurane-anesthetized floxed mice 1 week before experiments for the TAT-Cre one and 3 weeks before experiments for the virus one.

### Evaluation of TAT-Cre recombination efficiency

Four weeks after lateral ventricle or 3<sup>rd</sup> ventricle TAT-Cre infusion in *TdTomato* mice, animals were anesthetized with ketamine (8mg/kg body weight) + xylazine (3mg/kg body weight) before being perfused with Saline (0,9% NaCl) and 4% paraformaldehyde. Brains were collected before being cryoprotected in 20% sucrose solution overnight, embedded in Tissue Tek (Sakura®) and frozen freshly. 16 µm-thick coronal sections were cut and processed for immunofluorescence using chicken anti-Vimentin (1:2000; #9131, Millipore) primary antibodies and Alexa647-conjugated anti-chicken antibody (Invitrogen ; 1/1000; #A21449). Images were acquired using an Axio Imager Z2 Apotome microscope (AxioCam MRm camera, Zeiss). 8 median eminence representative slides per animal were then coded to conceal treatment groups and the tanyocytes (Vimentin positive cells) were divided into three groups depending their projections (median eminence and arcuate nucleus, ventromedial hypothalamus, dorsomedial hypothalamus). Number of DAPI+/Tomato+/Vimentin+ cells was reported on DAPI+/Vimentin+ cells bordering the 3<sup>rd</sup> ventricle. The ratio was compared between different groups.

To compare 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> ventricle TAT-Cre infusion, the number of FACS -sorted Tomato positive cells was compared in ME and 4<sup>th</sup> ventricle microdissected samples, 1 week after TAT-cre infusion.

## Fluorescence-Activated Cell Sorting and Real-Time PCR Analyses

### Isolation of hypothalamic tanyocytes using Fluorescence Activated Cell Sorting

Median eminence from TAT-Cre injected *tdTomato*<sup>loxP/+</sup> and *LepR*<sup>oxP/oxP</sup>; *tdTomato*<sup>loxP/+</sup> mice were microdissected, and enzymatically dissociated using Papain Dissociation System (Worthington, Lakewood, NJ) to obtain single-cell suspensions. FACS was performed using an EPICS ALTA Cell Sorter Cytometer device (Beckman Coulter, Inc.). The sort decision was based on measurements of *tdTomato* fluorescence (excitation 488nm; detection: bandpass 675+/-20nm) by comparing cell suspensions from *tdTomato* positive or GFP positive and wild-type animals, as indicated in Figure 3A. For each animal, 4000 cells *tdTomato* positive and negative cells and negative cells were sorted directly into 10µL extraction buffer: 0,1% Triton® X-100 (Sigma-Aldrich) and 0,4 U/µl RNaseOUT™ (ThermoFisher).

### Quantitative RT-PCR analyses

For gene expression analyses, mRNAs obtained from microdissected hypothalamic explants or FACS-sorted tanyocytes were reverse transcribed using SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies) and a linear preamplification step was performed for the sorted cells only using the TaqMan® PreAmp Master Mix Kit protocol (P/N 4366128, Applied Biosystems). Real-time PCR was

carried out on Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System using exon-boundary-specific TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems): DARPP32 (Ppp1r1b\_Mm00454892\_m1); LEPR (Variant 1, long form) (LepR\_Mm1265583\_m1); LEPR (Variant 3, short form) (LepR\_Mm01262070\_m1), NPY (NPY-Mm03048253\_m1), MECA32 (Plvap-Mm00453379\_m1), POMC (POMC-Mm00435874\_m1), AgRP (AgRP-Mm00475829\_g1), CART (CARTPT-Mm04210469\_m1), Socs3 (Socs3-Mm00545913\_s1), Ptp1b (Ptp1b-Mm00448427\_m1). Control housekeeping genes: r18S (18S-Hs99999901\_s1); ACTB (Actb-Mm00607939\_s1). Gene expression data were analyzed using SDS 2.4.1 and Data Assist 3.0.1 software (Applied Biosystem).

### Physiological measurements

#### Analysis of basal metabolism

Mice were analyzed for total energy expenditure, oxygen consumption and carbon dioxide production, food intake and ambulatory movements (total beam breaks/h) using calorimetric cages (TSE Systems GmbH, Germany) and standard procedures. Mice were individually housed and acclimatized to the cages for 48h before experimental measurements. During the pair-fed test, paired-fed animals had the mean weight of food than the control group ate during the last previous 24 hours.

#### Glucose Tolerance Test and Insulin dosage

Mice were fasted overnight before the experiment (12 hours). Blood sample for insulin dosage was taken before, 15 and 30 min after glucose administration with glass capillary at the tail. Samples were kept on ice during the experiments before being centrifuged (4 °C, 600 rpm, 15 min) to collect serum and frozen at -80 °C until insulin ELISA (Mercodia). Basal blood glucose level was measured before glucose i.p administration (1,5 mg glucose/g of body weight), 15, 30, 45, 60, 120 and 150 min after glucose administration using glucometer (OneTouch® Verio meter)

#### Insulin Tolerance Test

Mice were fasted 6 hours before the experiment. Basal blood glucose level was measured before insulin i.p administration (0,75UI/kg of body weight), 15, 30, 45, 60, 120 and 150 min after glucose administration using glucometer (OneTouch® Verio meter)

#### In vivo leptin sensitivity test

Mice were first separated one per cage and fasted during 3 hours in the afternoon. Then they are divided into two groups which received i.p or i.c.v injections of recombinant murine leptin (3mg/kg; Harbor-UCLA Medical Center, California) or vehicle (PBS pH 8.0) 3 hours before being reefed. Body weight and food intake were measured before, 12h and 24h after treatment period.

## Brain and peripheral tissues analysis

### Brain slice preparation and calcium imaging

Eight to twelve weeks old male GCaMP3<sup>Trmp5</sup> and GCaMP3<sup>Trmp5</sup>; LepR<sup>Trmp5</sup> mice were anaesthetized with isoflurane, and after decapitation, the brain was rapidly removed and put in ice-cold oxygenated (O<sub>2</sub> 95% / CO<sub>2</sub> 5%) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing the following (in mM): 120 NaCl, 3.2 KCl, 1 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 10 glucose (300 mOsm, pH 7.4). After removal of the cerebellum, the brain was glued and coronal hypothalamic slices 200 µm thick containing the median eminence and lateral walls of the third ventricle were cut using a vibratome (VT1200S; Leica) as previously described (Clasadonte et al., 2017). Before recording, slices were incubated at 35°C for a recovery period of 1 h. After recovery, slices were placed in a submerged recording chamber (31°C; Warner Instruments) and continuously perfused (2 ml/min) with oxygenated ACSF. Tanyocytes were observed with a 40x water immersion objective in an upright Leica DM-LFSA microscope by using infrared differential interference contrast (IR-DIC). To detect GFP fluorescence, a blue illumination was provided via a 470 nm LED and an ORCA-Flash4.0 LT digital CMOS camera (Hamamatsu) was used to collect images. MetaMorph image acquisition software (Molecular Devices) was used to control the illumination and camera. Analysis of imaging data was performed off-line using MetaMorph (Molecular Devices) and Fiji software. Regions of interest (ROI) were drawn around individual tanyocyte cell bodies from the infrared and/or the fluorescence images. Changes in fluorescence intensity of GCaMP3 were measured by plotting the intensity of ROI over time, after the intensity of a background ROI had been subtracted. Then, an initial baseline fluorescence signal was computed before drug application at resting state (F0) and subsequent fluorescence values (F-F0=ΔF) were normalized to this ( $\Delta F/F_0$ ). Drugs were applied via puffs from a patch pipette made of borosilicate glass (World Precision Instruments) and pulled on a P1000 puller (Sutter Instrument Co). The tip of the pipette was positioned 25 µm away from tanyocyte cell bodies. Puffs were delivered in the opposite direction of the flow of the perfusion chamber at a pressure of 4 psi using a PV820 pneumatic PicoPump (World Precision Instruments). The concentration of Leptin and ATP (Sigma) in the patch pipette was 6 µM and 10 mM (both prepared in ACSF), respectively. To exclude mechanical responses of tanyocytes to the puff, patch pipettes were also filled with ACSF alone.

### *pSTAT3 and MECA-32 immunohistochemistry and analysis*

Adult mice were sacrificed by decapitation in the morning at lights on. Brains were collected before being embedded in Tissue Tek (Sakura®) and frozen freshly. 20 µm-thick coronal sections were cut, postfixed with a solution of 2% paraformaldehyde during one hour and processed for immunofluorescence as previously described (Bouret et al., 2012) using rabbit anti-pSTAT3 (Tyr705) (1:1000; #9131, Cell Signaling Technology) and rat anti-MECA32 (1:500; 550563, BD Pharmingen) primary antibodies. Double-immunofluorescence images were acquired using an Axio Imager.Z2 Apotome microscope (AxioCam MRm camera, Zeiss). Slides were then coded to conceal treatment groups, and pSTAT3 immunoreactive (IR) cells counted in eight sections per animal. MECA-32 immunoreactive vessels are visualized in the primary superficial plexus of the external zone of the median eminence but some MECA-32-immunoreactive vessels form intrainfundibular capillary loops. The total number of fenestrated loops was evaluated throughout the rostrocaudal extent of the median eminence and ARC in each animal (8 representative median eminence sections per animal). The mean number of immunopositive cells or vessels per zone was compared between groups.

### *Pancreatic Islet Studies*

Pancreata were digested by type V collagenase (C9263; 1,5 mg/ml) for 11 min at 37°C as described previously (Annicotte et al., 2009, Rabhi et al., 2016). Briefly, after digestion and separation in a density gradient medium, islets were purified by handpicking under macroscope and cultured overnight in a 1640 RPMI (Gibco, 61870-010) media containing 1mM of FBS (Gibco, 10270-106) and Penicillin/streptomycin. For insulin secretion tests, approximately thirty islets were exposed to either 2,8 mM or 20 mM glucose in Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer containing 0,5% fatty-acid-free BSA. Insulin released in the medium was measured 1 hour later using the Ultrasensitive Insulin ELISA kit (Mercodia). Data are expressed as a ratio of total insulin content.

### *RNA Extraction, Measurements and Profiling of pancreatic islets*

Total RNA was extracted from islets using RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's recommendations. mRNA expression was measured after reverse transcription by real-time qPCR with FastStart SYBR Green master mix (Roche) according to the manufacturer's recommendations and gene-specific oligonucleotides. Real-time qPCR results were normalized to endogenous cyclophilin reference mRNA levels. Results are expressed as the relative mRNA level of a specific gene expression using the formula  $2^{-\Delta Ct}$ .

### Immunofluorescence (IF) on pancreatic sections

IF was performed as described previously (Annicotte et al., 2009, Blanchett et al., 2011). Briefly, after antigen retrieval using citrate buffer (Sigma) 5 µm formalin fixed pancreatic sections were incubated with primary antibodies: Anti-Insulin (Dako; A0564, 1:1000), anti-Glucagon (Sigma-Aldrich; G2654, 1:1000). Immunofluorescence stainings were revealed using Alexa 568-conjugated anti Guinea-Pig antibody and Alexa 488-conjugated anti-Mouse (1:500, Jackson ImmunoResearch). Nuclei were stained with Hoescht. For morphometric analysis, images were processed by ImageJ software by an observer blinded to experimental groups.

### Western Blot analysis on liver and WAT

Tissues were homogenized using a TissueLyser II (Qiagen, Tokyo, Japan) in cold RIPA buffer (containing 200 mMTris/HCl (pH 7.4), 130 mM NaCl, 10%(v/v) glycerol, 0.1%(v/v) SDS, 1%(v/v) Triton X-100, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) with anti-proteases and anti-phosphatases (Sigma-Aldrich; St.Louis, MO). The tissue lysates were centrifuged for 30 minutes at 18000 g in a microfuge at 4°C. Liver and White Adipose Tissue total protein lysates were subjected to sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE), then electrotransferred on a PVDF membrane and probed successively with the following antibodies: Hormone sensitive lipase/HSL: (Abcam, Cambridge, UK, ab45422) ; Phospho-HSL (Ser660) (Cell Signalling, USA, #4126) ; Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) (Cell Signalling, USA, #3661) ; Acetyl CoA Carboxylase 1 : (Merck Millipore, Darmstadt, Germany, 04-322) ; Lipoprotein lipase (LPL Antibody (H-53)): (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA, sc-32885) ; Fatty Acid Synthase antibody (FAS): (Abcam, Cambridge, UK, ab128870) ; GAPDH: (Merck Millipore, Darmstadt, Germany, CB1001) ; β-actin: (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, T5168) after incubating the membranes with 5% BSA blocking buffer. For protein detection we used horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies (Dako Denmark, Glostrup, Denmark). Specific antigen-antibody bindings were visualized using chemiluminescence method according to the manufacturer's instructions (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, USA). Values were expressed in relation to β-actin or GAPDH protein levels.

### Blood lipids determinations

Serum cholesterol levels (1001093, Spinreact), triglycerides levels (1001310, Spinreact), free fatty acids levels (436-91995, 434-91795, WAKO) were measured by spectrophotometry in a ThermoScientific Multiskan GO spectrophotometer.

### Histomorphology of WAT

WAT samples were fixed in 10% formalin for 24h and then were dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 3µm were made on a microtome and stained by the standard hematoxylin/eosin alcoholic (BioOptica, Italy) and sections were observed and photographed using a Provis AX70 microscope (Olympus, Corp, Tokyo, Japan). Digital images were quantified with ImageJ Software (National Institute of Health; USA).

### Triglycerides content in liver

Approx. 500mg of livers were homogenized for 3min in ice-cold chloroform-methanol (2:1, vol/vol). Triglycerides were extracted during 3hours shaking at room temperature. For phase separation, mili-Q water was added. Samples were centrifuged and the organic bottom layer was recollected. The organic solvent was dried using a Speed Vac and re-dissolved in chloroform. Triglycerides content of the samples were measured after evaporation of the organic solvent (1001310, Spinreact) by spectrophotometry in a ThermoScientific Multiskan GO spectrophotometer.

### Oil Red O Staining

Frozen sections of 8 $\mu$ m of liver were cut with a cryostat and stained in filtered oil Red O for 10 min. The sections were washed in distilled water, counterstained with Mayer's hematoxylin for 3 min, and mounted in aqueous mountant. Sections were observed and photographed using a Provis AX70 microscope (Olympus, Corp, Tokyo, Japan).

## Primary cultures and cell lines experiments

### Primary culture of tanycytes

Tanycytes were isolated from the median eminence of 10-day-old (P10) rats as described previously (Prevot et al., 2003).

### Pamgene experiments

Primary cultures of tanycytes were incubated at 37°C with leptin (2 $\mu$ g/mL) or DMSO for 2 or 15 minutes before washes and snap-freeze. For kinome analysis, STK microarrays were purchased from PamGene International BV (STK pamchips). Sample incubation, detection, and analysis were performed in a PamStation 12 according to the manufacturer's instructions and previously described (Rabhi et al., 2018).

### Fluorescent leptin internalization assay and immunofluorescence on primary culture

Tanycytes were seeded on poly-L-lysine-coated glass coverslips (10 $\mu$ g/ml) and incubated in TDM (DMEM/F-12 (#11039, ThermoFisher), 1% L-glutamine (#25030-024, ThermoFisher), 2% penicillin-streptomycin (#P4458, Sigma), insulin (1/1000, #I5500, Sigma), putrescin (1/500, #P5780, Sigma)) for 24 hours before the experiment. Tanycytes were incubated for the indicated amount of time at 37 °C with either bioactive fluorescent leptin (F-leptin, 125 nM, Cisbio Bioassays) or with fluorescent leptin antagonist (LAN, 125 nM, Cisbio Bioassays) both diluted in TDM. Cells were then fixed for 10min at 4 °C with 4% paraformaldehyde (PFA, v/v in PBS) and washed 3 times with PBS 1X. For cointernalization assay, tanycytes were incubated with F-leptin and XPA antibodies (5 $\mu$ g/ml in TDM, Xoma Laboratories) for 5 min, washed and fixed. Cells were then washed and permeabilized with 0.1 % Triton-X100 (v/v in PBS) for 5 min at room temperature. Antibodies were all diluted in PBS with 3% BSA and incubated for 45 min at room temperature. Cells were either incubated with primary anti-EEA1 antibodies (Santa Cruz; 1/200; #I1212) followed by the Alexa488-conjugated anti-goat antibodies (Invitrogen ; 1/1000; #A-11055) or Alexa488-conjugated anti-human antibodies (Invitrogen ; 1/1000; #A-11013) to stain XPA antibodies.

### Fluorescent leptin release assay on primary culture

Tanycytes were incubated for 15 min at 37°C with either F-leptin (125 nM, Cisbio Bioassays) or LAN (125 nM ; Cisbio Bioassays). Cells were washed with TDM, incubated with TDM for the indicated amount of time and fixed for 10 min at 4°C with 4% PFA. To assess the role of MAPK pathway, tanycytes were pre-incubated for 30 min with the MAPK inhibitor U0126 (10 µM in TDM; #9903; Cell signaling technology). F-leptin uptake and release was performed in the presence of U0126. To check for LAN release with EGF, EGF-TRITC (10 ng/ml; #3481; Molecular probes) was added during the chase.

### ELISA

To quantify leptin release, tanycytes were cultivated in 10 cm Petri dish and incubated with recombinant leptin (62.5 nM, Protein Rehovot Laboratory) diluted in TDM for 15 min at 37°C. Cells were then washed and incubated with TDM to chase leptin for the indicated amount of time. Leptin in the medium as well as leptin remaining in cells were quantified by Elisa assay according to the manufacturer's instruction (#MOB00 ; R&D systems). Leptin secretion was expressed as a percent of total leptin.

### Image acquisition and analysis

Cells were observed under a confocal microscope TCS SP5 (Leica microsystems) and images were acquired according to Nyquist parameters using a 63x (NA 1.4) oil immersion objective. Single plane images were analyzed using the open source Icy software (<http://icy.bioimageanalysis.org/>). The cell periphery was manually delineated using phase contrast images and object-based segmentation using wavelet transform algorithm (spot detector plugin) was performed to detect vesicles in each channel. Objects were considered colocalized if the distance between their centroid was less than or equal to 3 pixels. EEA1 segmentation was used to estimate amounts of Leptin in EEA1 compartments and percent of total leptin in EEA1 determined by normalizing the integrated intensity of leptin in EEA1 to total leptin in cells.

### Cells lines

HEK293T (human embryonic kidney) cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco, life technologies) with 4500 mg/l glucose and 10% fetal calf serum (Invitrogen) in a 10% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere at 37 °C. HEK293T cells were transiently transfected (48h) with jetPEI (Polyplus-transfection), with a mock pCDNA3 vector or LepR or EGFR expressing pCDNA3 plasmids.

### Western Blot on primary cultures and cell lines

Cell lysates (in Laemmeli buffer supplemented with 30mM DTT, 2mM orthovanadate and 10mM NaF) were separated by SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with anti-phospho-tyrosine (Tyr-705) STAT3 and anti-STAT3 antibodies (Cell Signaling), anti-phospho-tyrosine (Tyr-204) ERK1/2 (SantaCruz) and anti-ERK2 (Proteintech) antibodies, anti-FLAG

tag (Sigma), or XPA (Xoma Laboratories). Western Blots were scanned on the Odyssey infra-red Imaging System (Licor).

#### *Co-Immunoprecipitation*

HEK293T cells were transfected with a Flag-EGFR-expressing vector either with LepR-YFP or an empty vector. 48h later, cells were harvested in lysis buffer containing Tris-EDTA-magnesium-1% Triton X-100 and solubilized for 2 hr (4 °C, under rotation), centrifuged (14,000× g, 45 min), and supernatants were subjected to immunoprecipitation with 2 µg of antibody anti-GFP (Roche); 4 hr, 4 °C, under rotation. Protein G beads (Sigma-Aldrich) were then added, and after a 2 hr incubation, the samples were washed in the 0.1% Triton X-100 buffer by repeated centrifugation (1,000× g, 5 min). The remaining pellet was resuspended in Laemmli buffer (62.5-mM Tris/HCl pH 6.8, 5% SDS, 10% glycerol, and 0.005% bromophenol blue), denatured by heating (95 °C, 5 min), and subjected to SDS-PAGE analysis.

#### *Proximity ligation assay*

Tanocytes or brain slices were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, permeabilized and saturated with Triton X100 (0.3%) & 5% Horse Serum/PBS solution for 1 h. Primary antibodies (anti-mLepR goat and anti-EGFR rabbit) were incubated at 4 °C overnight. PLA was performed by the use of a Duolink® In Situ Red Starter Kit Goat/Rabbit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. For negative controls, the whole process was performed with only one primary antibody.

#### *Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based LepR biosensor*

HEK293T cells were transiently transfected in 12-well plates with 40 ng of LepR-Luciferase plasmid with increasing amounts of LepR-YFP plasmids. Cells were grown overnight and transferred into 96-well-Optiplates (PerkinElmer Life Sciences), pre-coated with 10 µg/mL poly-l-lysine (Sigma), where they were grown for additional 24 h. The next day cells were stimulated with leptin, XPA or vehicle for 30min at 37 °C. After washing with PBS, Coelenterazine (Interchim France), a Luciferase substrate was added and cells were subjected to measurement of emission at Luciferase and YFP wavelength on a plate reader Tecan F500 (Tecan; Männedorf, Switzerland).

#### *TR-FRET binding assay*

TR-FRET assays are based on the energy transfer between a fluorescently labeled donor molecule (the long-lived fluorophore Terbium cryptate (Tb)) and a fluorescently labeled acceptor (d2). In order to covalently label cell surface EGFR or LepR, with the Tb, the receptor is fused to the SNAP enzyme that can be covalently labeled with the Tb fluorophore at a stoichiometry of 1Tb per 1SNAP-receptor, using a suicide enzyme substrate-Tb. 48 hours post-transfection, HEK293T cells, expressing SNAP-EGFR +LepR or SNAP-LepR +EGFR, and previously plated in P96-well plates pre-coated with 10 µg/mL poly-l-lysine (Sigma), are incubated with 100 nM of Tb-SNAP substrate in Tag-lite labeling medium (Cisbio Bioassays; 1h, 4°C). After several washes, cells are treated with several doses of leptin-d2 or EGF-d2 (CisbioAssays) respectively. For each concentration, non-specific binding was

determined by adding an excess of unlabeled leptin or unlabeled EGF (200-500nM). Regarding the binding data analysis, the  $B_{max}$  signal and the equilibrium dissociation constant ( $K_D$ ) values were obtained by fitting the specific binding data points (triplicate) with one-binding site model using the GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

### **Statistics**

Results are given as mean  $\pm$  standard error mean (SEM). Samples or animals were excluded whether their values were outside the  $\pm$  2-fold standard deviation, or whether an objective experimental failure was observed; studies were not blinded to investigators or formally randomized. To test if the populations follow a Gaussian distribution, a normality test was performed (Kolgomorov-Smirnov test for  $n$  between 5-7; Shapiro-Wilk test for  $n \geq 7$ ). For normal distributions, parametric test was used; for two population comparisons, an unpaired t tests (two-tailed for treatment and phenotyping experiment, one-tailed otherwise) were used as indicated in figure legends (Charan and Biswas, 2013; Fay and Gerow, 2013; Student, 1908); for multiple comparison test, a one-way or two-way ANOVA followed by Sidak *post hoc* multiple comparison test, was performed. For non-Gaussian distributions was used; Mann-Whitney test were used for two comparison test, and Kruskal-Wallis followed by Dunn *post hoc* test for multiple comparison. Data analysis was performed using GraphPad Prism Software Version 7 (GraphPad, San Diego, CA). The threshold for significance was  $p < 0.05$ .



## Etude 3 : Implication des endozépines centrales dans l'amélioration de phénotype d'obésité induit par un régime gras

### I. Introduction

L'homéostasie énergétique, qui correspond à l'équilibre entre l'apport alimentaire et la dépense énergétique, est étroitement régulée par le système nerveux central. Les informations nutritionnelles, hormonales et neuronales de la périphérie sont intégrées de façon centrale par l'hypothalamus et le tronc cérébral, puis relayées aux circuits de récompense. Jusqu'à présent, la plupart des recherches sur la régulation de l'homéostasie énergétique se sont concentrées sur l'implication de la signalisation neuronale alors que le rôle des cellules gliales reste peu exploré. Notre vision des cellules gliales a considérablement évolué au cours des dernières décennies. Ces cellules sont maintenant reconnues comme des partenaires des neurones qui contribuent à la physiologie normale du cerveau, y compris celle de l'hypothalamus (Clasadonte and Prevot., 2018 ; Garcia-Caceres et al., 2019 pour revue).

De nouveaux éléments suggèrent que la glie joue un rôle important dans la régulation du comportement alimentaire et le contrôle du bilan énergétique (Garcia-Caceres et al., 2019; Dallaporta et al., 2010 pour revue). En particulier, des changements dans la structure gliale sont observés dans l'hypothalamus pendant le développement de l'obésité, tant chez les rongeurs (Douglass et al., 2017 ; Garcia-Caceres et al., 2010 ; Langlet et al., 2013 ; Thaler et al., 2012 ; Zhang et al., 2017) que chez les primates non humains (Grayson et al., 2010). Ces altérations, caractéristiques de l'astrogliose, entraînent une hypertrophie cellulaire, une prolifération accrue et une expression accrue des protéines des filaments intermédiaires astrocytaires (c.-à-d. la protéine acide fibrillaire gliale [GFAP], la nestine et la vimentine). Ces changements astrocytaires dans l'hypothalamus des animaux obèses modifient à leur tour l'activité synaptique des neurones à mélancortine, en augmentant la couverture gliale et en réduisant ainsi la réception des informations humorales de la périphérie (Garcia-Caceres et al., 2016 ; Horvath et al., 2010). Plusieurs études ont également montré que les astrocytes eux-mêmes étaient sensibles aux facteurs humoraux liés à la régulation de l'homéostasie. L'injection intracérébroventriculaire chronique de leptine modifie l'expression astrocytaire de protéines structurales comme la GFAP et la vimentine (Garcia-Caceres et al., 2010) ainsi que le glutamate et les transporteurs du glucose (Fuerte-Martin et al., 2012). Récemment, en utilisant une suppression inductible au tamoxifène du récepteur de la leptine (LepR) dans les astrocytes, Kim et ses collègues (Kim et al., 2014) ont rapporté que la modulation de la couverture gliale des neurones de la mélancortine dépend, du moins en partie, de la sensibilité des astrocytes eux-mêmes. De plus, nos connaissances sur le transport et les effets de la leptine dans le cerveau ont récemment évolué (Friedman, 2015). Dans l'EM, les tanyocytes, un autre type de cellules gliales, expriment des LepR, capturent la leptine de la circulation sanguine et la libèrent dans le fluide cérébrospinal (LCR ; (Balland et al., 2014)).

Au cours des années 70, dans le but de comprendre les mécanismes impliqués dans l'action des benzodiazépines, endorphines et opiacés, il a eu de nombreuses recherches concernant les ligands naturels des récepteurs aux benzodiazépines, regroupés sous le nom d' « endozépines ». Parmi les études pionnières, l'une d'entre elles a montré l'existence d'un inhibiteur de fixation du diazépam (DBI) dans le cerveau de rat. L'octadécaneuropeptide (ODN) et son octapeptide C-terminal (OP), sont dérivés de ce polypeptide de 86 acides aminés (Farzampour et al., 2014 ; Tonon et al., 2019 pour revue). Dans le cerveau, les niveaux les plus élevés d'immunoréactivité ODN ont été détectés dans les cellules gliales (astrocytes, ependymocytes et tanyocytes) de l'hypothalamus (Tonon et al., 1990) et du tronc cérébral (Guillebaud et al., 2017).

L'ODN a suscité un grand intérêt au cours de la dernière décennie, en raison de son puissant effet anorexigène décrit chez les rongeurs et les poissons rouges (De Mateos-Verchere *et al.*, 2001 ; Matsuda *et al.*, 2007) et de sa capacité à améliorer la tolérance au glucose (Lanfrey *et al.*, 2013). Il est intéressant de noter que la capacité de l'ODN et de l'OP à réduire l'apport alimentaire chez les rats et les souris semble être indépendante de la liaison aux récepteurs des benzodiazépines et repose plutôt sur un récepteur métabolotropique couplé à la phospholipase C (do Rego *et al.*, 2007). Malgré le fait que l'injection centrale d'ODN modifie la transcription des neuropeptides liés à l'homéostasie énergétique, comme celle de la MSH, dérivé de la POMC, on ne sait que peu sur leur mode d'action et leurs cibles cellulaires.

Dans ce contexte, nous avons conçu la présente étude pour identifier les mécanismes sous-jacents à l'action anorexigène des endozépines et pour étudier leur effet curatif potentiel dans le cadre de l'obésité induite par une alimentation riche en graisses.

Cette étude a été réalisé en collaboration (Co-premier auteur). L'article est actuellement soumis au journal « *Molecular Metabolism* ».

## **Glial endozepines reverse high fat diet-induced obesity by restoring hypothalamic sensitivity to peripheral leptin**

Florent Guillebaud<sup>1,f</sup>, Manon Duquenne<sup>2,3,f</sup>, Mehdi Djelloul<sup>1</sup>, Clément Pierre<sup>1,4</sup>, Kevin Poirot<sup>1</sup>, Guenière Roussel<sup>1</sup>, Seddik Riad<sup>5</sup>, Damien Lanfray<sup>6</sup>, Fabrice Morin<sup>6</sup>, André Jean<sup>1</sup>, Marie-Christine Tonon<sup>6</sup>, Stéphanie Gaigé<sup>1</sup>, Bruno Lebrun<sup>1</sup>, Michel Dallaporta<sup>1</sup>, Jérôme Leprince<sup>6,#</sup>, Vincent Prevot<sup>2,3,#</sup> and Jean-Denis Troadec<sup>1,#</sup>

### **Affiliations:**

1: Université Aix-Marseille, CNRS UMR 7291, Laboratoire de Neurosciences Cognitives, Marseille, France.

2: Inserm, Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Jean-Pierre Aubert Research Centre, U1172, Lille, France.

3: University of Lille, School of Medicine, Lille, France.

4: Biomeostasis CRO, La Penne sur Huveaune, France.

5: Université Aix-Marseille, CNRS UMR UMR 7289, Institut des Neurosciences de la Timone, Marseille, France.

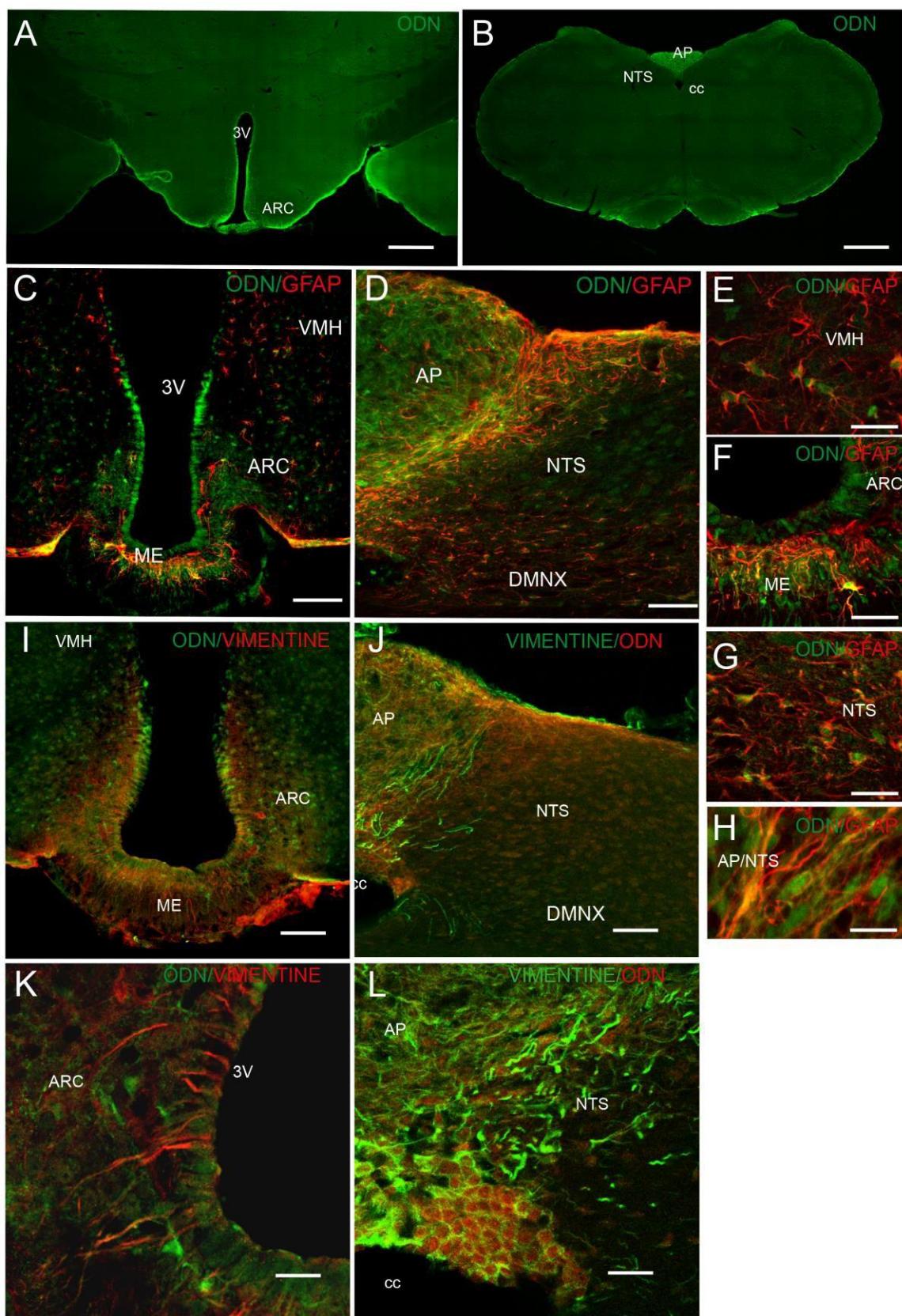
6: Inserm, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, U1239, PRIMACEN, Normandie Univ., UNIROUEN, Rouen, France

**Abbreviated title:** Anti-obesity effect of endozepines

## **II. Résultats**

### **1. ODN is Expressed by Glial Cells in Brain Structures Related to Food Intake**

Labeling of mouse brain sections with an ODN antibody revealed the presence of strong immunoreactivity within both the hypothalamus and the dorsal vagal complex (DVC) (**Figures 1**). At the hypothalamic level, ODN immunoreactivity was observed in the ARC and ventromedial hypothalamus (VMH; **Figures 1A and 1C**). In the ARC and VMH, ODN labeling was associated with GFAP-positive protoplasmic astrocytes (**Figures 1C, 1E-F**) and vimentin-positive tanyocytes lining the third ventricle (3V; **Figures 1I and 1K**). In coronal sections of the caudal brainstem, ODN immunoreactivity displayed a striking pattern, with a distinct subregional distribution in the DVC (**Figure 1B and 1D**). Indeed, the area postrema (AP), the commissural part of the nucleus tractus solitarii (NTS), and the interface between the AP and the subpostremal NTS appeared highly labeled throughout their rostrocaudal extent, whereas only weak ODN labeling was observed in other regions of the NTS and the dorsal motor nucleus of the vagus nerve (DMNX; **Figures 1B and 1D**). Within the NTS, ODN-immunoreactive cells exhibited typical features of differentiated protoplasmic GFAP- expressing astrocytes (**Figures 1G**). Along the AP-NTS interface, ODN labeling was also localized within GFAP- and vimentin-positive processes (**Figures 1H, 1J-L**), previously described as limited to tanycyte like cells [25], [26].



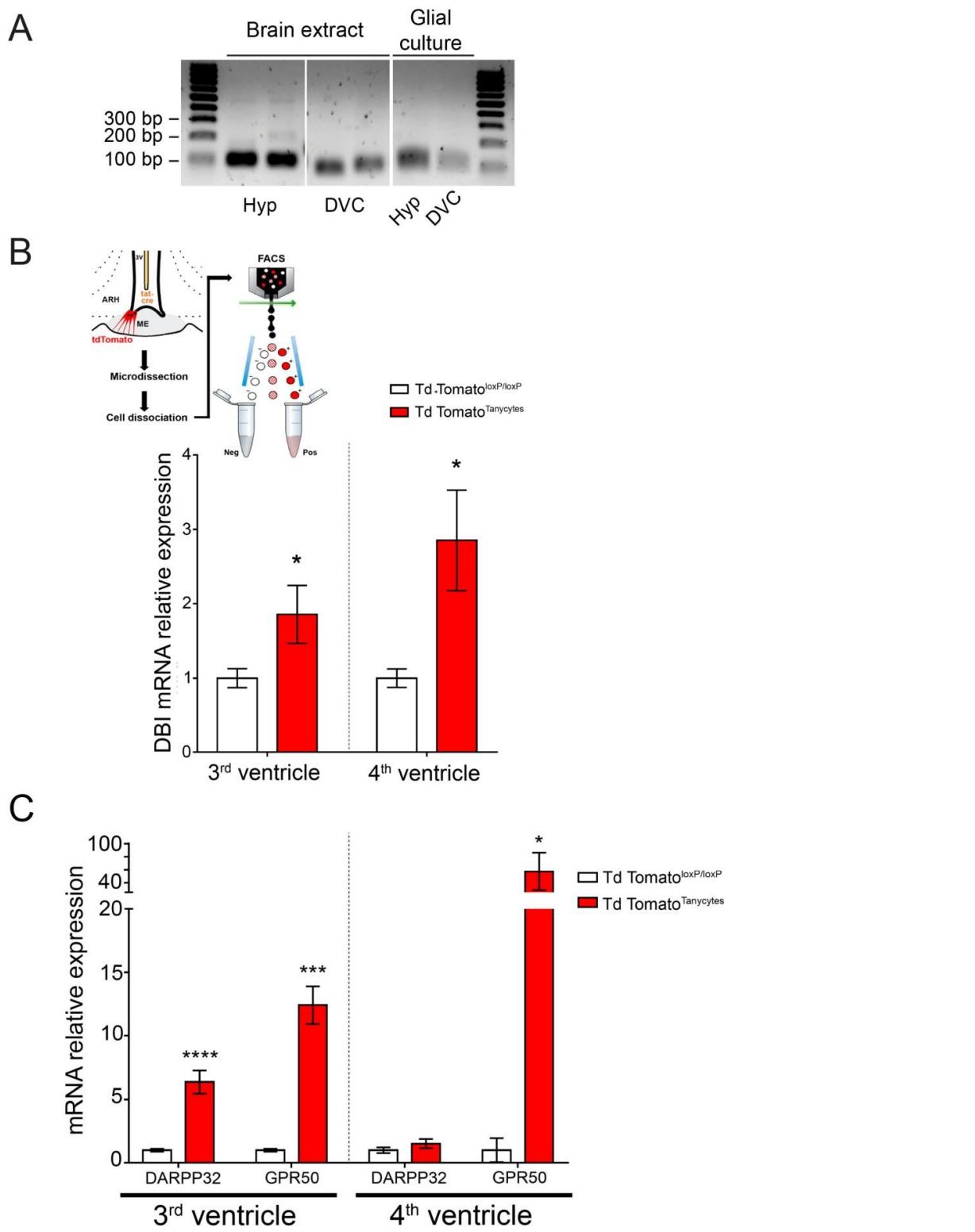
**Figure 1:** ODN expression within astrocytes and tanyocytes of the hypothalamus and brainstem

(A-B) Low magnification photomicrographs of ODN labeling performed on mice forebrain (A) and brainstem (B) coronal sections. Scale bars: 800  $\mu$ m.

(C-D) Representative photomicrographs of ODN (green) and GFAP (red) double-labeling performed on mouse hypothalamic (**C**) and brainstem (**D**) coronal sections. Scale bars: 100 µm. (E-H) High magnification photomicrographs of ODN (green) and GFAP (red) double labeling performed on mice hypothalamic (**E-F**) and brainstem (**G-H**) coronal sections illustrating the presence of double-labeled cells. Scale bars: 100 µm. (I-L) Representative photomicrographs of ODN (green) and vimentin (red) double labeling performed on mice hypothalamic (**I, K**) and brainstem (**J, L**) coronal sections. AP, area postrema; ARC, arcuate nucleus; cc, central canal; ME, median eminence; NTS, nucleus tractus solitarius; VMH, ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle. Scale bars: 300 µm in I and J, 50 µm in K and L.

## **2. DBI Transcripts are enriched in tanyocytes bordering the 3V and the 4V**

Real-time (RT)-PCR amplification of DBI mRNA confirmed the expression of DBI transcripts in hypothalamic and DVC tissues as well as in primary glial cell cultures prepared from these two central structures (**Figure 2A**). To further explore the putative enrichment of DBI expression in tanyocytes of the tuberal region of the hypothalamus and the DVC, we verified the expression profile of the DBI transcripts in tanyocytes bordering the 3V and the 4V isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS). Cre-mediated Tomato expression in *tdTomato*<sup>loxP-STOP</sup> mice was performed using TAT-Cre injection in the 3<sup>rd</sup> or 4<sup>th</sup> ventricle. RT-PCR analysis of FACS-isolated cells revealed that Tomato-expressing cells abundantly expressed the tanyctic markers DARPP-32 [27] and/or GPR50 ([28]; **Figure 2B**) and were markedly enriched in DBI transcripts relative to Tomato-negative cells (**Figure 2C**).



**Figure 2. DBI mRNA expression in tanycytes**

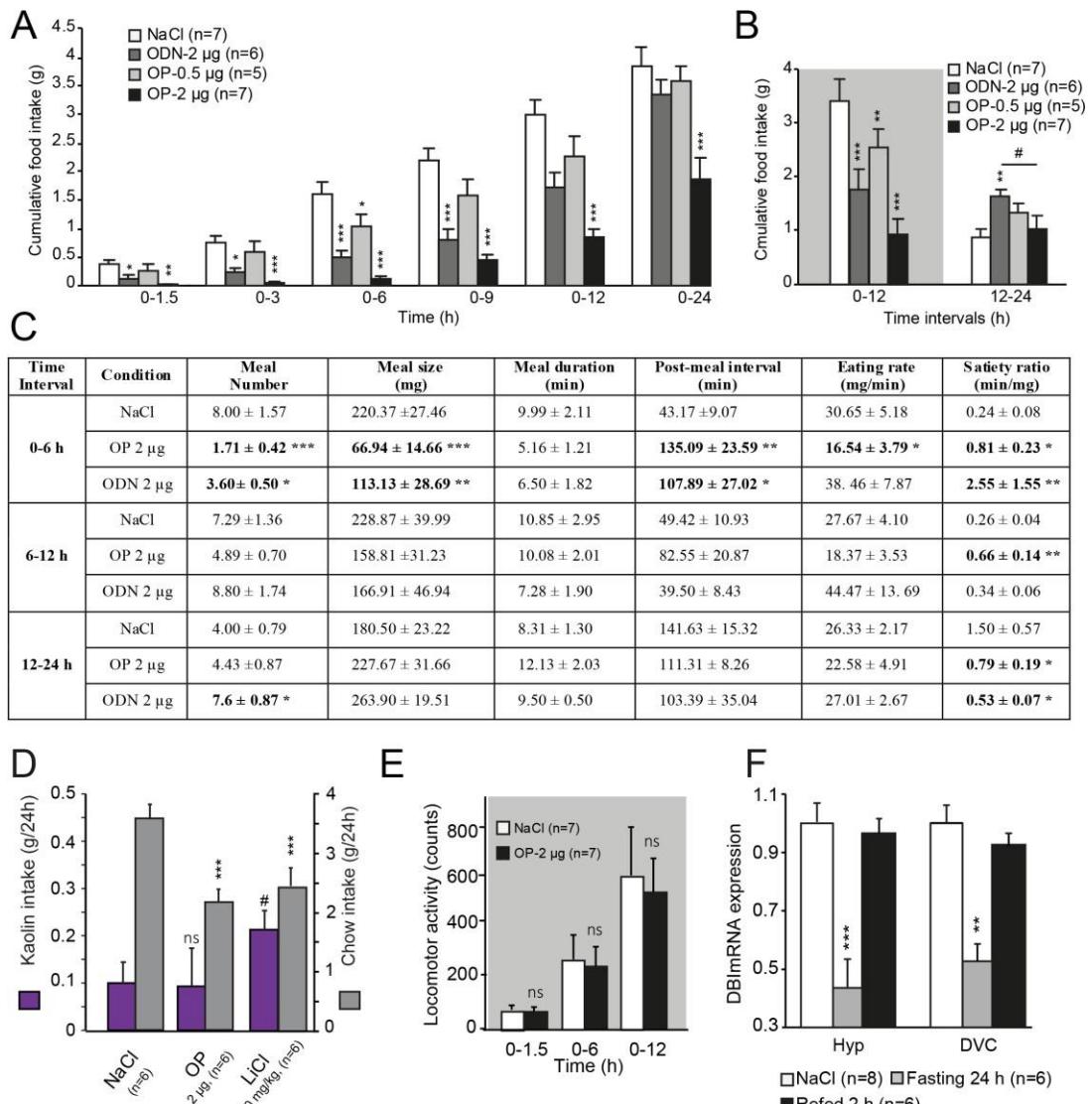
(A) RT-PCR amplification of DBI mRNA from either hypothalamus (Hyp) or dorsal vagal complex (DVC) extracts or cultured glial cells from each structure.

(B) Tanycyte isolation by FACS and RT-PCR analysis of DBI mRNA in Tomato-positive (red bars) and -negative cells (white bars) in mice injected with TAT-Cre in the 3V ( $n = 8$ ) or 4V ( $n = 6$ ). \* $p < 0.05$ , significantly different from Tomato-negative cells.

(C) PCR analysis of DARPP-32 and GPR50 mRNA expression in tomato-positive (red bars) and -negative (white bars) cells isolated by FACS from mice injected with tat-cre in the third ventricle ( $n = 8$ ) or in the fourth ventricle ( $n = 6$ ). \* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ , significantly different from tomato-negative cells.

### **3. Endozepines Modify Food Intake and Meal Patterns**

Icv ODN injection (2 µg/mouse) decreased spontaneous food intake (**Figures 3A and 3B**) as early as the 0-1.5 h post-treatment interval. Additionally, a single icv administration of OP (0.5 and 2 µg/mouse) dose-dependently decreased daily food intake (**Figures 3A and 3B**). The ODN and OP effects on meal patterns were observed during the 0-6 h post-treatment interval (Figure 3C). During this period, both peptides significantly reduced meal size and meal number and increased post-meal interval duration without modifying meal duration (**Figure 3C**). Consequently, satiety ratios (the post-meal interval divided by the size of the meal) were significantly increased for ODN and OP during the same trial period (**Figure 3C**). Since the ODN fragment OP was as efficient as ODN in inducing anorexia, only OP was included in the following experiments. The consumption of a non-nutritive substance i.e. kaolin, a behavior known as pica, serves as a model for the study of nausea/emesis in rodents. While mice treated with lithium chloride (150 mg / kg) consumed 0.21 +/- 0.04 mg / 24 h of kaolin, 2 µg OP did not cause a significant increase in kaolin intake (0.09 +/- 0.08 mg / 24 h) compared to control condition (0.10 +/- 0.05 mg / 24 h, **Figure 3D**). Importantly, OP (2 µg/mouse, icv) did not affect total locomotor activity during the dark phase (Figure 3E). The mRNA expression profile of the endozepines precursor DBI in fed and fasted animals was then determined. Fasting for 24 h was shown to strongly reduce DBI mRNA expression within both the hypothalamus and the DVC. Refeeding for 2 h restored initial levels of DBI mRNA expression (**Figure 3F**).



**Figure 3. Glial Endozepines Affect Food Intake Patterns**

(A-B) Cumulative food intake measured over a 24 h period in mice administered NaCl, ODN (2 µg), or OP (0.5 and 2 µg). In B, the dark period is represented by a shaded box. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significantly different from NaCl-treated mice.

(C) Analysis of meal pattern calculated on three time intervals (0-6 h, 6-12 h and 12-24 h) after NaCl, ODN or OP (2 µg) injection. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  significantly different from NaCl-treated mice.

(D) Kaolin intake and regular chow intake measured 24 h after NaCl, OP (icv 2 µg) or lithium chloride (LiCl, ip 150 mg/kg BW) administration. Kaolin intake: \*\* $p < 0.01$ , significant difference from NaCl-treated mice. Normal chow intake: \*\*\* $p < 0.001$ , significantly different from NaCl-treated mice. ns: non-significant difference.

(E) Total locomotor activity measured during the dark period in mice administered icv NaCl (white bars) or OP (2 µg; black bars). ns: no significant difference between NaCl and OP- treated mice.

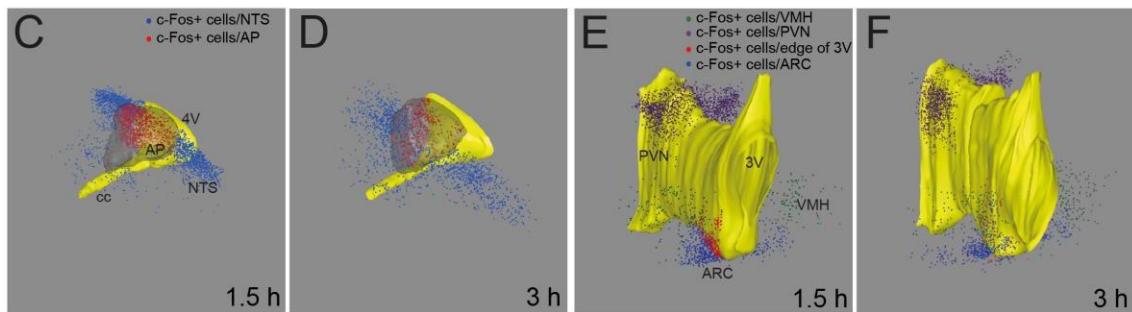
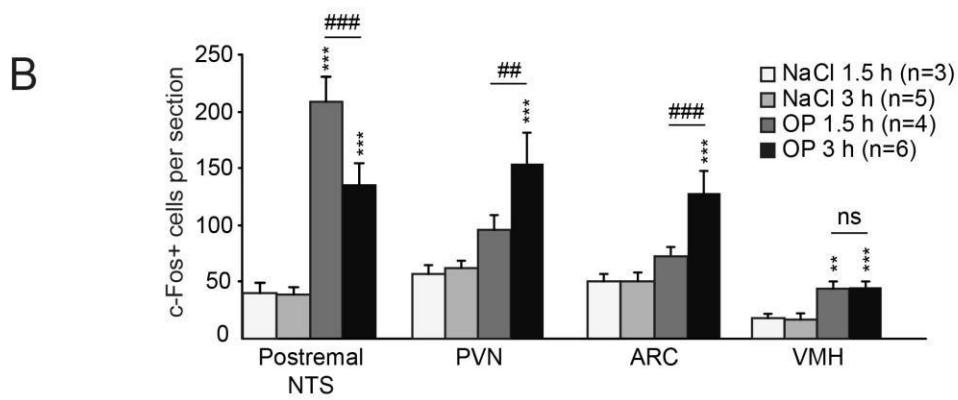
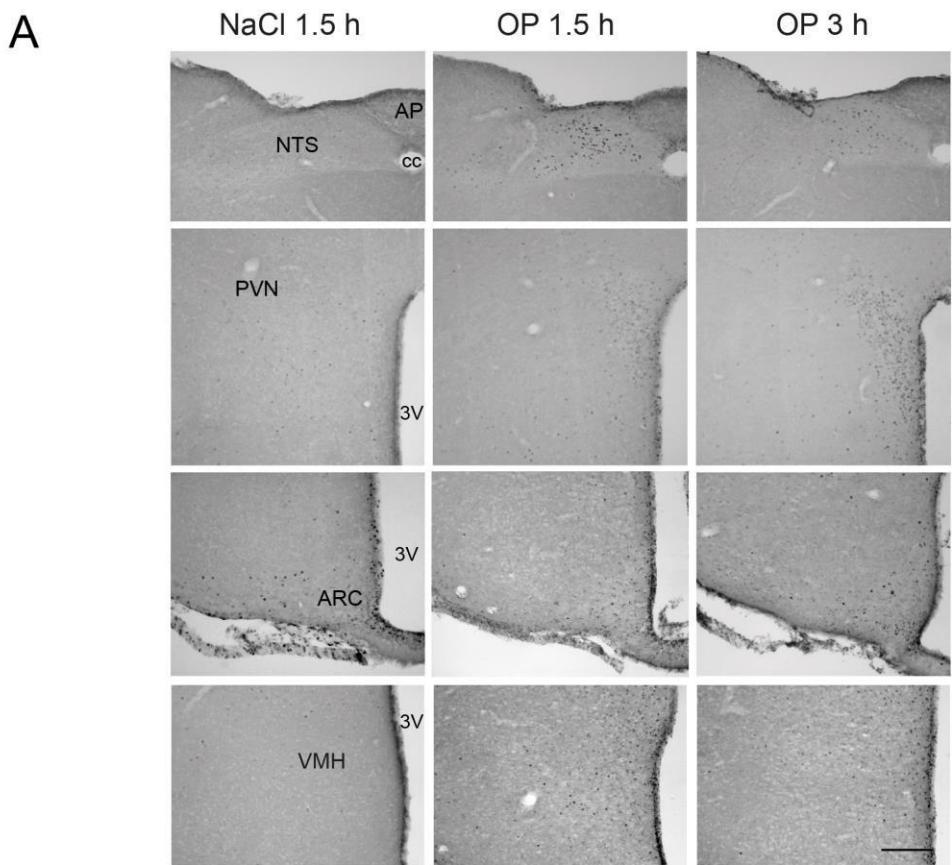
(F) Quantification of DBI transcript expression within the hypothalamus and DVC of control (white bars), 24 h fasted (grey bars) and 2 h refed (black bars) mice. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

#### **4. OP Targets Prototypical Anorexigenic Neuronal Pathways**

We used immunohistochemical detection of the immediate early gene c-Fos as an indicator of central structures activated in response to OP treatment. A markedly low basal level of c-Fos-positive nuclei was observed in the brainstem and forebrain of NaCl-treated mice (**Figures 4A and 4B**). Animals treated with OP (2 µg/mouse, icv) displayed c-Fos labeling in a limited number of structures. A strong rise in c-Fos-positive cells was observed only in hypothalamic and brainstem nuclei (**Figures 4A, 4B**). At the brainstem level, the NTS, AP, and DMNX were found to be strongly labeled as early as 1.5 h post-treatment and labeling remained high 3 h post-treatment. In particular, c-Fos-positive cells displayed a striking concentration in the AP and subpostremal NTS at 1.5 h post-treatment and were more widely distributed 3 h after treatment (**Figures 4A, 4B and 4C-D**). In the hypothalamus, the number of c-Fos-positive nuclei increased in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), ARC, ME, and VMH, which were activated as early as 1.5 h following the central injection of OP (**Figures 4A, 4B**). The different hypothalamic nuclei appeared labeled throughout their rostrocaudal extent, with a high proportion of c-Fos-labeled cells lining the 3V at the level of the ARC and VMH (**Figures 4E and 4F**).

The use of POMC-GFP transgenic mice revealed that OP administration (2 µg) moderately increased the number of POMC neurons positive for c-Fos in both the NTS and ARC (**Figures 5A and 5B**). Approximately 27% and 6% of POMC neurons were found to be immunoreactive for c-Fos within the NTS and the ARC, respectively, at 1.5 h post-treatment (Figure 5B). Whole-cell patch-clamp recordings performed on hypothalamic slices revealed that bath application of OP (100 nM) led to membrane depolarization and action potentials in ~33% of tested POMC neurons (3/9 cells; depolarization:  $7.1 \pm 1.9$  mV; **Figures 5C and 5D**). The OP concentration used here (i.e 100 nM) was determined from previous data showing reduction of food intake obtained with OP injection into the arcuate nucleus [22].

Given, the weak proportion of OP-sensitive POMC neurons observed by c-Fos labeling suggests that alternative anorexigenic neurocircuits could be recruited by OP *in vivo*. In accordance with this hypothesis, the number of nesfatin-1/NUCB2 neurons labeled for c-Fos in the NTS and PVN was greatly increased by OP treatment (**Figures 5E and 5F**). The percentage of nesfatin-1/NUCB2 neurons double-labeled for c-Fos was ~25-30%. Moreover, these nesfatin-1/NUCB2-positive cells accounted for ~50% of the entire c-Fos-positive cell population (**Figure 5G**). Double immunolabeling for c-Fos and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) or c-Fos and tyrosine hydroxylase (TH) performed at the brainstem level revealed that a significant proportion of these two neuronal populations approximately 15-30% of GLP-1 neurons (**Figure 5H**) and 40% of TH neurons (**Figure 5I**) were also immunoreactive for c-Fos after OP treatment.



**Figure 4.** Identification of OP-sensitive structures and cells

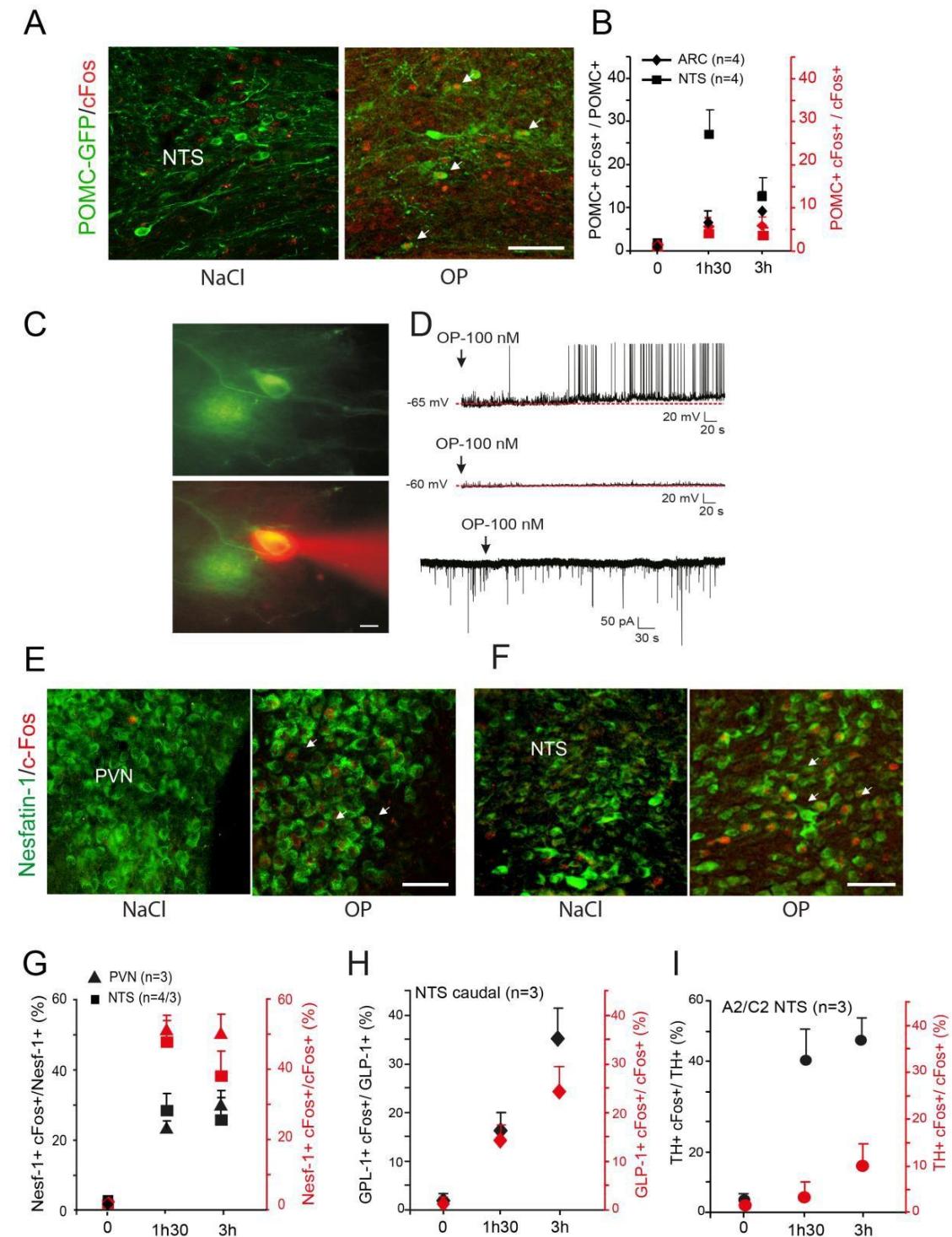
(A) Representative coronal sections illustrating the c-Fos labeling observed within brainstem and hypothalamic regions of mice treated with icv NaCl (left panel), animals sacrificed 1.5 h (middle panel) or 3 h (right panel) after treatment with icv OP (2 µg). AP, area postrema; ARC, arcuate nucleus; cc, central canal; NTS, nucleus tractus solitarii; PVN, paraventricular nucleus; VMH: ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle. Scale bar: 100 µm.

(B) Quantification of the number of c-Fos-immunoreactive nuclei observed within the brainstem and

hypothalamic structures 1.5 and 3 h after treatment with either NaCl or OP (2 µg). \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significantly different from NaCl-treated mice. ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , significant difference between 1.5 and 3 h post-treatment. ns: non-significantly different between 1.5 and 3 h post-treatment.

(C-F) 3D reconstructions of c-Fos-positive cells in the DVC (C, D) and hypothalamus (E, F)

1.5 h (C, E) and 3 h (D, F) after OP (2 µg) treatment. The boundaries of the 3V and 4V appear in yellow whereas the AP boundaries are drawn in grey. AP, area postrema; ARC, arcuate nucleus; cc, central canal; NTS, nucleus tractus solitarius; PVN, paraventricular nucleus; VMH, ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle.



**Figure 5.** OP activates anorexigenic pathways.

(A) Representative photomicrographs of POMC (green) and c-Fos (red) double-labeling performed on brainstem coronal sections of mice treated with NaCl (left panel) or OP (2 µg, right panel). Arrow double-labeled cells. Scale bar = 150 µm.

(B) Percentage of POMC neurons expressing c-Fos 1.5 and 3 h after icv OP (2 µg) treatment relative to the entire POMC group (black plots) and to the c-Fos-positive population (red plots). Quantifications were performed at the ARC (diamonds) and NTS (squares) levels.

(C-D) Hypothalamic slice under 470 nm illumination showing POMC-GFP neurons within the ARC observed prior to electrophysiological recordings (C, upper panel) and after the complete dialysis of Alexa Fluor 594 from the intracellular patch pipette (C, lower panel). Scale bar = 10 µm. (D) Current-clamp recording of POMC neurons showing that OP application (100 nM, the arrow indicates the beginning of OP perfusion) led to membrane depolarization and action potentials discharge (upper trace). Current-clamp recording of an arcuate POMC neuron with no response after bath application of OP (middle trace). Voltage-clamp recording of spontaneous inhibitory post-synaptic currents (IPSCs, holding potential: -60 mV) illustrating the effect of OP (100 nM) on the frequency and amplitude of IPSCs (lower trace). Neither the frequency nor the amplitude of the IPSCs was significantly altered between controls (frequency,  $1.38 \pm 1.19$  Hz; amplitude,  $84.64 \pm 9.23$  pA; n = 3) and during OP applications (frequency,  $1.01 \pm 0.69$  Hz; amplitude,  $79.56 \pm 18.81$  pA; n = 3; p > 0.05, paired sample Wilcoxon Signed Rank test).

(E-F) Representative photomicrographs of nesfatin-1/NUCB2 (green) and c-Fos (red) double-labeling performed on hypothalamic (E) and brainstem (F) coronal sections of mice treated with NaCl or OP (2 µg, icv). Arrows indicate double-positive cells. NTS, nucleus tractus solitarius; PVN, paraventricular nucleus. Scale bar = 100 µm.

(G) Percentage of nesfatin-1/NUCB2 (Nesf-1) neurons expressing c-Fos 1.5 and 3 h after OP (2 µg, icv) treatment (black plots) and proportion of Nesf- and c-Fos-positive neurons relative to the entire c-Fos-positive population (red plots). NTS, nucleus tractus solitarius; PVN, paraventricular nucleus

(H-I) Percentages of neuronal phenotype, i.e. GLP-1 neurons (H) and TH (I) found activated 1.5 and 3 h after OP (2 µg, icv) treatment (black plots) and proportion of these neuronal phenotypes in regard to the entire c-Fos-positive population (red plots).

## 5. Chronic OP Treatment Reverses HFD-induced Obesity

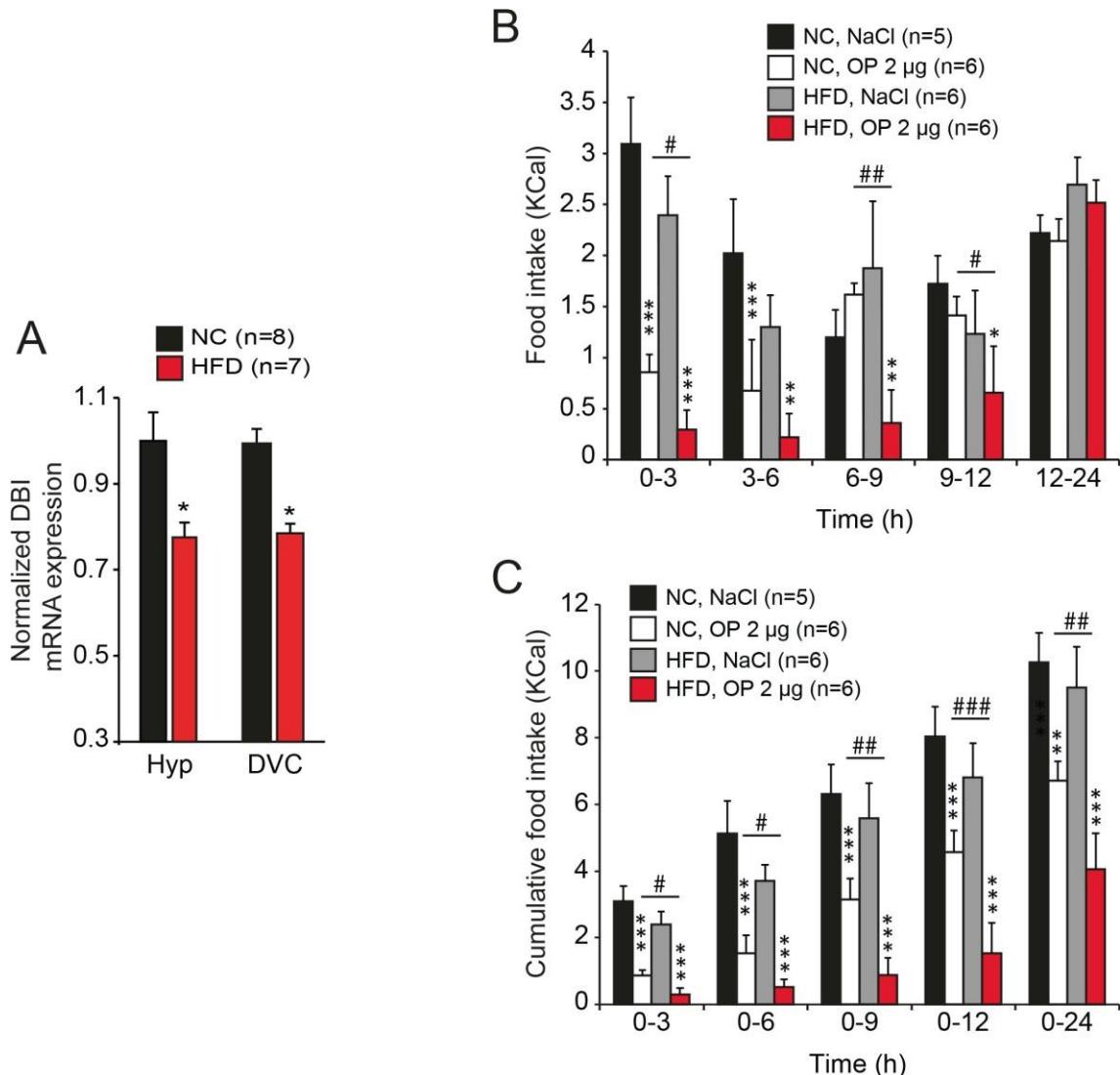
We next sought to determine whether the anorexigenic effect of OP treatment could reverse diet-induced obesity, known to be characterized by resistance to peripheral leptin. We first observed that 10 weeks of a HFD significantly reduced DBI mRNA expression in the hypothalamus and DVC (**Figure 6A**). Next, we investigated the impact of acute icv OP treatment on food intake during a 24-h period in mice fed a HFD or normal chow (NC). OP (2 µg/mouse) reduced food intake within 3 h of treatment (**Figures 6B and 6C**), an effect that was seen to vanish after 6 h in mice on NC, whereas reduced food intake was observed for more than 12 h in HFD-induced obese mice (**Figure 6B**).

Chronic icv OP treatment (13 days; 2 µg/mouse/day) promoted body weight loss (**Figures 7A and 7B**) and reduced food intake (**Figures 7C and 7D**) in both NC- and HFD-fed mice. Over the 13-day treatment, the loss in body weight was not significantly higher in animals on a HFD than in NC-fed mice (**Figure 7B**). At the mRNA level, chronic OP treatment restored the expression of POMC, NUCB2, and GLP-1 which had been dysregulated by the HFD within the hypothalamus and/or the DVC (**Figures 7E and 7F**). Interestingly, chronic OP treatment also restored the expression of DBI mRNA which had been suppressed by HFD (**Figures 7E and 7F**).

Obesity is often associated with glucose intolerance and endozepines have been shown to

improve glucose tolerance [22]. Ten-week HFD mice showed impaired glucose tolerance relative to NC mice (**Figures 8A and 8B**) and chronic 13-day OP treatment significantly improved this condition (**Figures 8C**). Moreover, chronic OP treatment restored fasting glycaemia in HFD mice (**Figure 8D**).

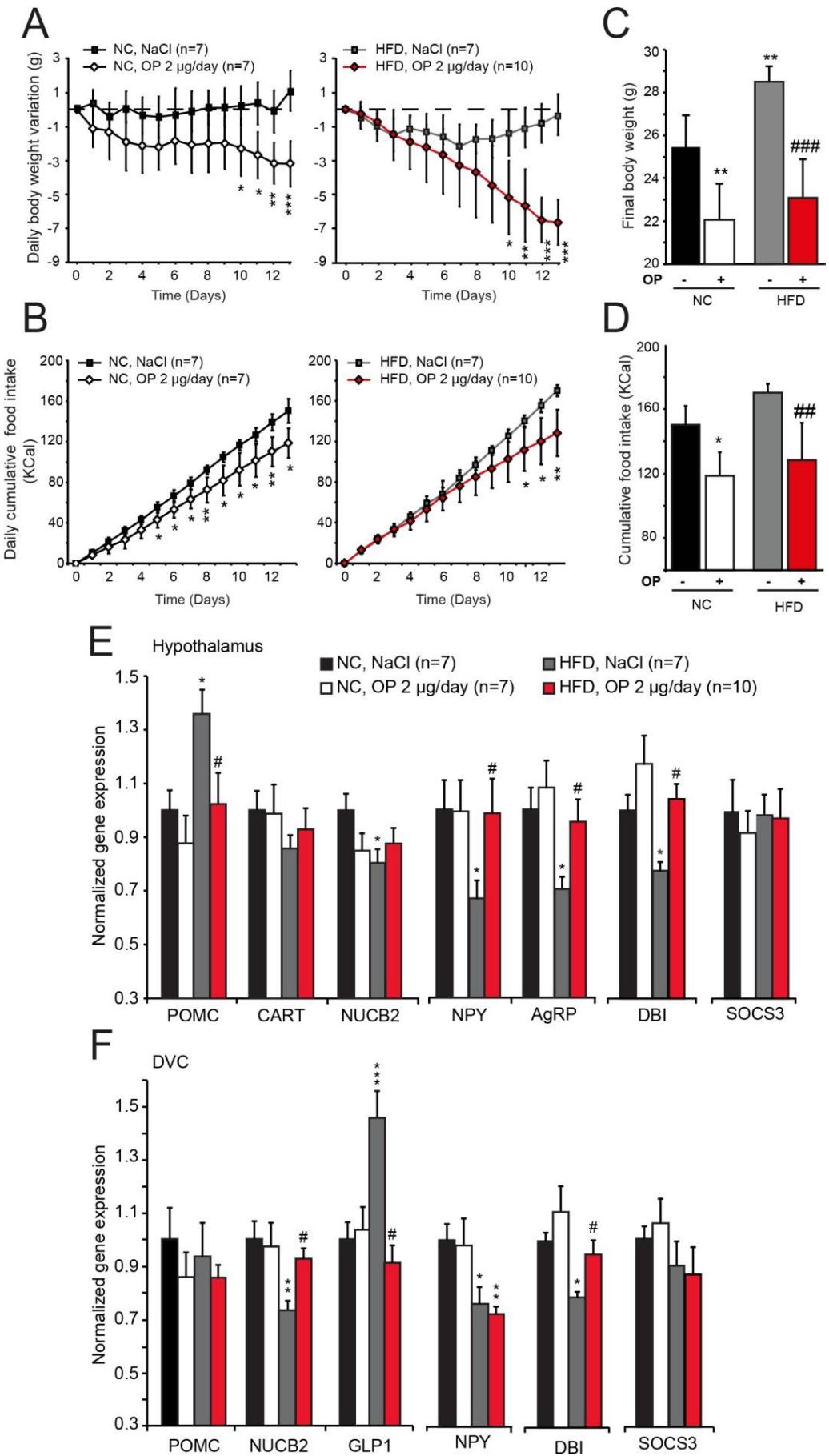
Finally, differences in fat pad deposition levels between NC and HFD groups were observed in both gonadal adipose tissue (GAT) and retroperitoneal adipose tissue (RPAT). OP administration reduced fat pad weights, especially in RPAT (**Figure 9A**). While HFD consumption resulted in noticeable enlargement of adipocytes, chronic OP treatment considerably reduced their size in RPAT (**Figures 9B and 9C**). In agreement with these results, OP treatment reduced liver weight gain (**Figure 9D**) and steatosis in HFD mice, as revealed by Oil Red O staining and histochemical analysis (**Figures 9E and 9F**).



**Figure 6. Effects of central acute OP injection on HFD-fed Mice.**

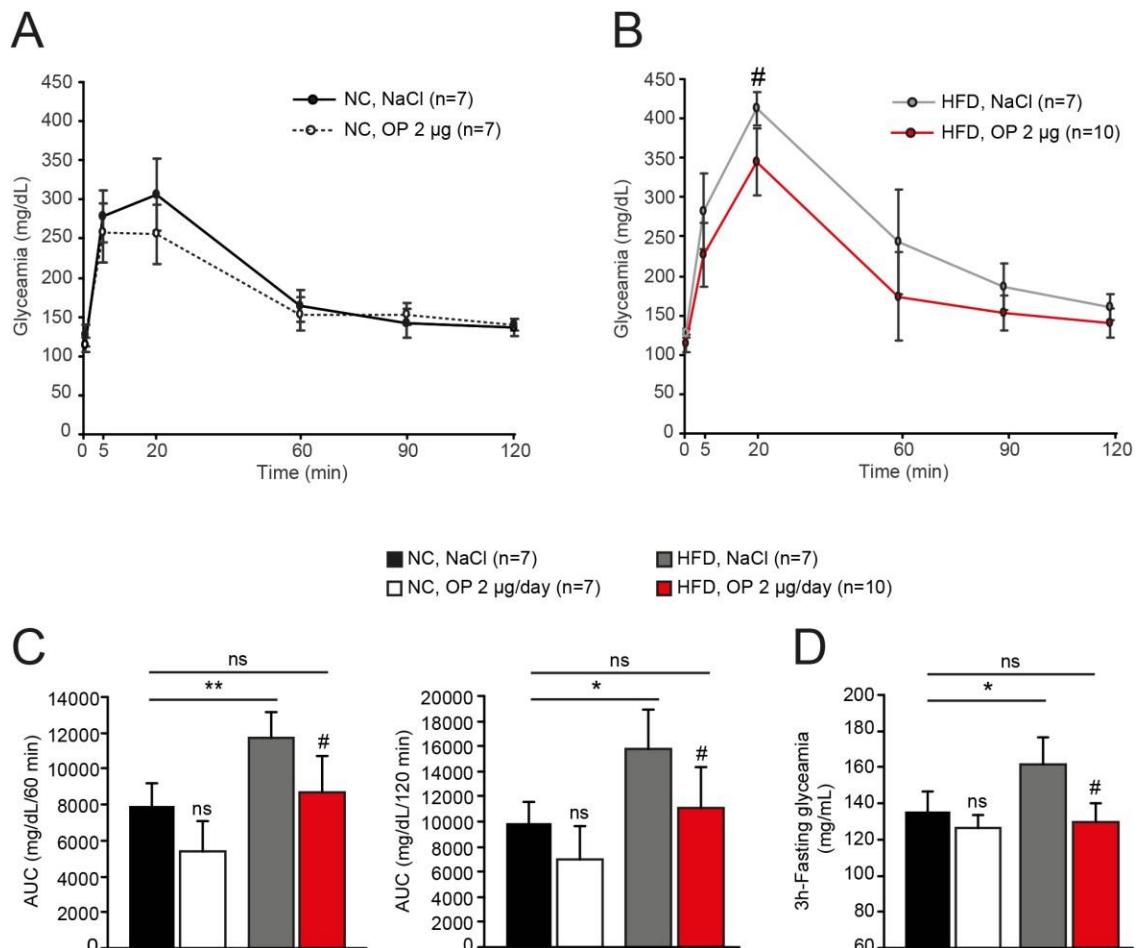
(A) Quantification of DBI mRNA expression within the hypothalamus (Hyp) and DVC of NC- (black bars) and HFD-fed mice (red bars). \* $p < 0.05$ , significantly different from control NC-fed mice.  
**(B-C)** Food intake (B) and cumulative food intake (C) measured over a 24 h period in NC- or HFD-fed mice

administered either with icv NaCl or OP (0.5 and 2 µg). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  significantly different from respective NaCl-treated mice. # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  significant difference between NC- and HFD-mice treated with OP (2 µg).



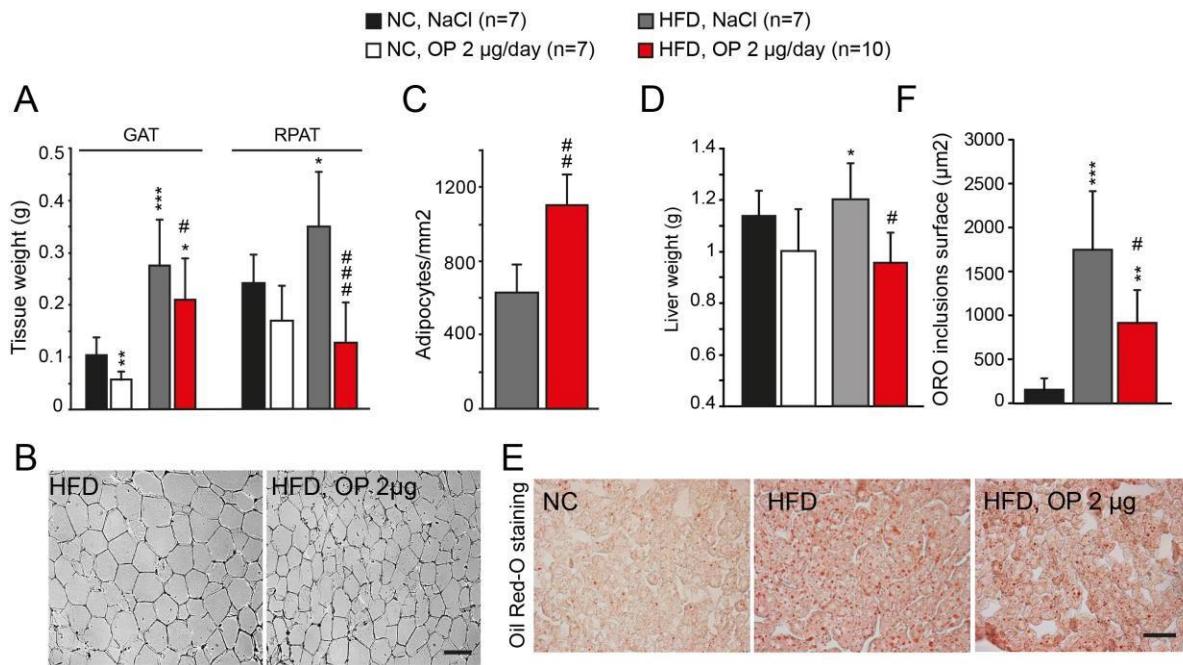
**Figure 7. Chronic OP administration reverses obesity**

(A) Difference from initial body weight measured from day 1 to 13 after icv injection of either saline or OP (2 µg/day) in NC- (left panel) or HFD-fed mice (right panel).  
(B) Final body weight measured on day 13 after icv injection of NaCl or OP (2 µg/day) in NC- or HFD-fed mice. In B: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significantly different from respective NaCl-treated mice. In C and D: \*\* $p < 0.01$ , significantly different from NC/NaCl- treated mice; #\*\*\* $p < 0.001$ , significantly different from HFD/NaCl-treated mice. ns: no significant difference between NaCl and OP-treated HFD-fed mice.  
(C-D) Daily cumulative food intake (C) and total food intake (D) measured from day 1 to 13 following icv injection of either NaCl or OP (2 µg/day) in NC- (left panel) and HFD-fed mice (right panel).  
(E-F) PCR quantification of food intake related peptides mRNA within the hypothalamus (E) and DVC (F) of NC- and HFD-fed mice treated either with NaCl or OP (2 µg, icv). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  significantly different from NC/NaCl-treated mice. # $P < 0.05$  significantly different from HFD/NaCl-treated mice.



**Figure 8. Chronic OP administration reverses HFD-induced hyperglycemia**

(A-B) Time-course changes in blood glucose level after per os glucose administration (1.5 g/kg) measured at day 13 after icv injection of either NaCl or OP (2 µg/day) in NC- (A) or HFD-fed mice (B).  
(C) Quantification of area under the curves (AUC) measured at 60 min (left panel) and 120 min (right panel) after per os glucose administration.  
(D) Glycemia measured 3 h after fasting. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , significantly different from NC/NaCl mice; # $p < 0.05$ , significantly different from HFD/NaCl mice. ns: not significantly different from NC/NaCl-treated mice.



**Figure 9.** Effect of chronic central OP injection on obesity parameters.

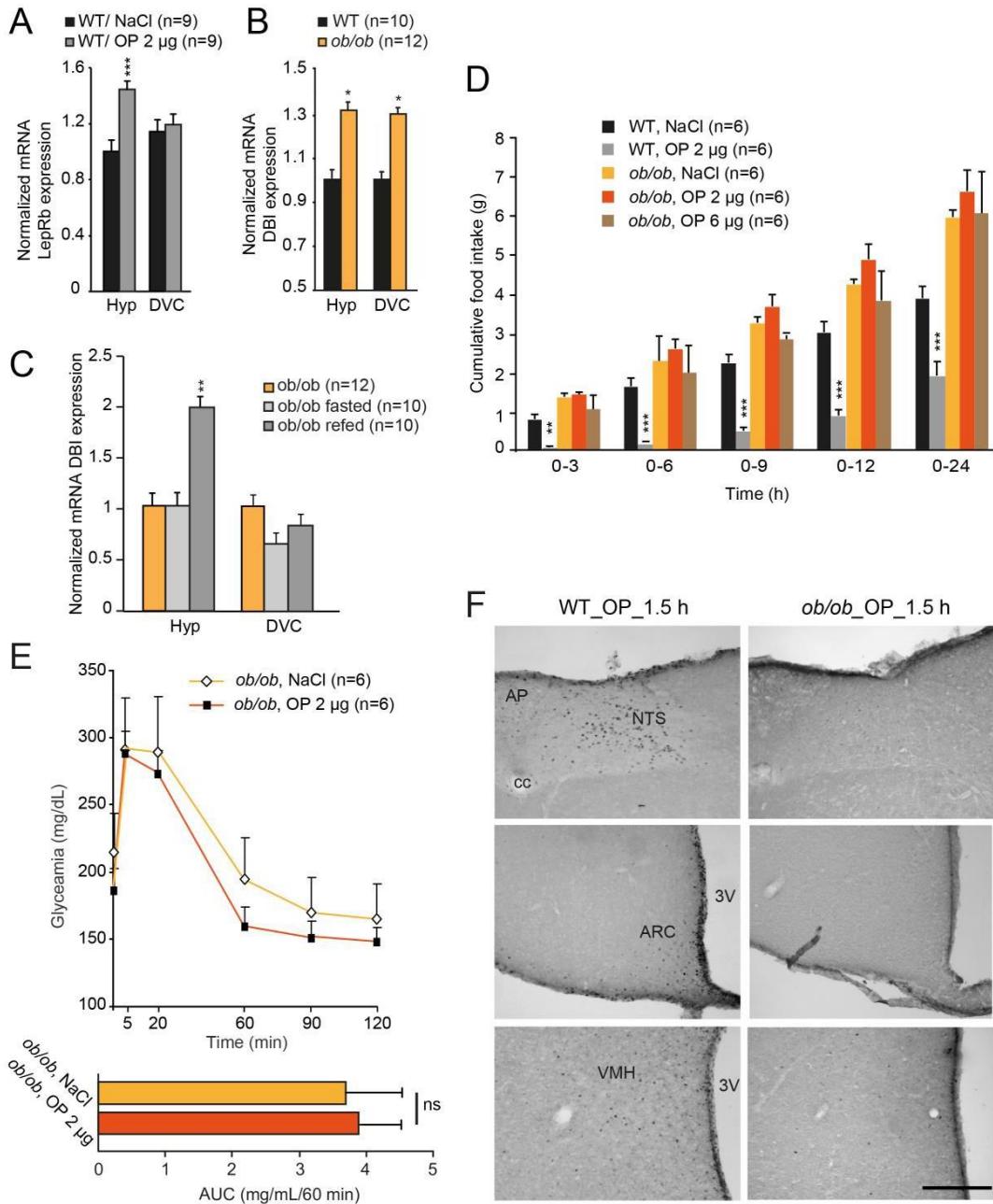
(A-C) Weight of gonadic adipose tissue (GAT) and retroperitoneal adipose tissue (RPAT) measured in all test groups at day 13 after icv of either saline (NaCl) or OP (2 µg/ day) in NC- or HFD-fed mice (A). (B) Representative photomicrographs of RPAT histology in HFD/NaCl- and HFD/OP-treated mice. (C) Quantification of adipocyte number per surface unit in RPAT of HFD/NaCl- and HFD/OP-treated mice. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 significantly different from NC/NaCl-treated mice. #P < 0.05, ##P < 0.01 and ###P < 0.001, significantly different from HFD/NaCl-treated mice. Scale bar: 100 µm.

(D-F) Liver weight measured in all test groups at the end of the treatment period (D). (E) Representative photomicrographs of ORO staining observed in NC/NaCl-, HFD/NaCl- and HFD/OP-treated mice. (F) Quantification of ORO positive inclusion number per surface unit in liver of NC/NaCl-, HFD/NaCl- and HFD/OP-treated mice. \* P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 significantly different from NC/NaCl-treated mice. #P < 0.05, significantly different from HFD/NaCl-treated mice. Scale bar: 100 µm.

## 6. OP Fails to Reduce Food Intake and to Improve Glucose Homeostasis in Obese, Leptin-deficient Mice

To shed light on the mechanisms whereby OP reduces food intake and reverses HFD-induced obesity, we tested the potential interaction between OP and endogenous leptin. Acute OP treatment (2 µg/mouse, icv, 3 h) increased mRNA levels for the long form of the leptin receptor (LepRb) within the hypothalamus, but not within the DVC, of wild-type (WT) mice (Figure 10A), whereas DBI mRNA was upregulated in both the hypothalamus and DVC of leptin-deficient *ob/ob* mice relative to their WT littermates (Figure 10B). Moreover, and in contrast to WT mice (Figure 3F), fasting failed to promote any change in DBI mRNA levels in *ob/ob* mice (Figure 10C); however, refeeding induced

the expression of hypothalamic DBI transcripts (**Figure 10C**). These results, together with previous data showing that glucose replenishment prevents fasting-induced downregulation of hypothalamic DBI transcripts in rodents (Lanfray et al., 2013), suggest that the lack of fasting effect in *ob/ob* mice may be due to their high fasting glycemia (*ob/ob*  $200 \pm 15$  mg/dl vs. WT  $113 \pm 9$  mg/dl,  $p < 0.001$ ), whereas changes in glucose and/or insulin levels induced by feeding remain, nevertheless, capable of modulating hypothalamic DBI expression in these mice. We then evaluated the impact of icv OP on *ob/ob* mice and their WT littermate controls. Intriguingly, we did not observe a reduction of food intake in response to OP (either at 2  $\mu$ g/mouse or 6  $\mu$ g/mouse, icv) in this genetic mouse model of leptin deficiency (**Figure 10D**). Brain endozepines were previously shown to modulate blood glucose levels and take part in whole-body glucose homeostasis [22]. OP also failed to reduce fasting glycemia or a glycemic response to oral glucose overload in *ob/ob* mice (**Figure 10E**). Moreover, since OP was unable to induce c-Fos expression in the NTS, ARC, or VMH of *ob/ob* mice (**Figure 10F**). Taken as a whole, these data raise the intriguing possibility that OP may require circulating leptin to mediate its metabolic effects.



**Figure 10. OP fails to induce hypophagia in *ob/ob* Mice**

(A) Leptin receptor (LepR<sub>b</sub>) mRNA expression within the hypothalamus (Hyp) and DVC 3 h after NaCl or OP (2 µg, icv) administration. \*\*\**p* < 0.001, significantly different from NaCl-treated mice.

(B) DBI mRNA expression within the hypothalamus and DVC of WT or *ob/ob* mice. \**p* < 0.05, significantly different from WT mice.

(C) Quantification of DBI transcript expression within the hypothalamus and DVC of control (orange bars), 24 h fasted (light grey bars), and 2 h refed (grey bars) *ob/ob* mice. \*\**p* < 0.01.

(D) Cumulative food intake over a 24-h period in WT and *ob/ob* mice icv administered either NaCl, OP (2 µg), or OP (6 µg). \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, significantly different from NaCl-treated mice.

(E) Time course changes in blood glucose level after *per os* administration of glucose (1.5 g/kg) measured in *ob/ob* mice after icv injection of NaCl or OP (2 µg). Quantification of areas under the curves (AUC) 60 min after injections. ns: no significant difference between NaCl and OP-treated *ob/ob* mice.

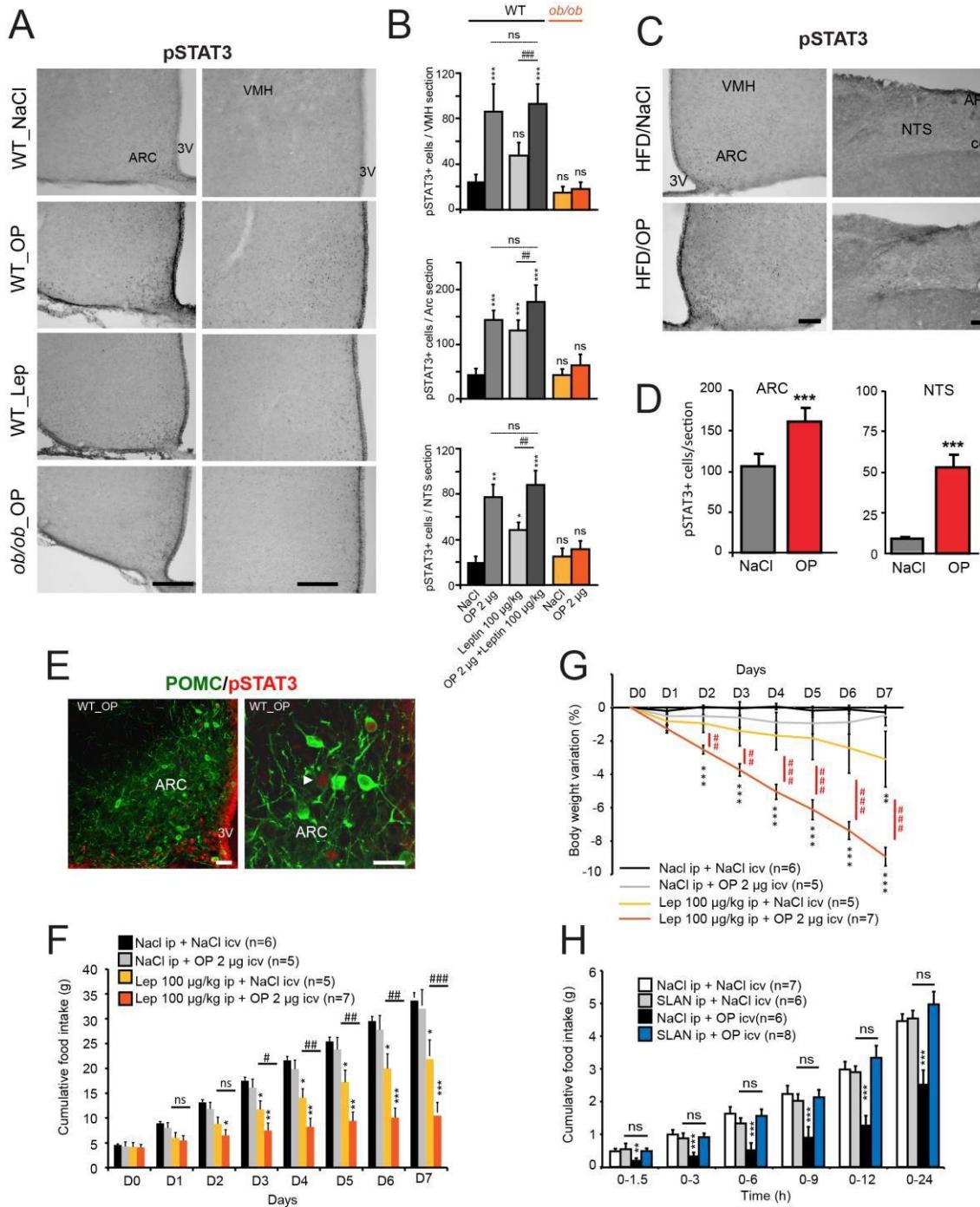
(F) Representative photomicrographs of c-Fos labeling performed at the NTS, ARC, and VMH nuclei level of WT (left panel) or *ob/ob* (right panel) mice treated with OP (2 µg), 1.5 h after injection. AP, area postrema; ARC, arcuate nucleus; cc, central canal; NTS, nucleus tractus solitarii; VMH: ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle. Scale bars: 100 µm.

## **7. OP Induces STAT3 Phosphorylation in Leptin-sensitive Hypothalamic Neurons in HFD- induced, but Not Leptin-deficient, Obese Mice**

To better elucidate the molecular mechanisms involved in the lack of OP effect on *ob/ob* mice, we evaluated the activation of STAT3, a well-known physiological mediator of the effects of leptin. Interestingly, we found that OP (2 µg/mouse) elicited robust STAT3 phosphorylation (pSTAT3) within the ARC, VMH, and NTS in WT fed with NC (**Figures 11A and 11B**) or HFD (**Figures 11C and 11D**) mice but not in *ob/ob* mice (**Figures 11A and 11B**). Next, we used a submaximal dose of leptin (i.e., 100 µg/kg; [29]), to examine the possible additive action of OP and leptin in WT mice. While the co-administration of OP (2µg/mouse, icv) and leptin (100 µg/kg, intraperitoneal [ip]) induced significantly more pSTAT3 when compared to leptin alone (**Figure 11B**), this combination did not result in more pSTAT3 than did OP alone (Figure 11B). These results underline the lack of synergistic effect of leptin and OP at these concentrations and further indicate that OP and leptin act via a shared signaling pathway. Importantly, OP was found to induce pSTAT3 in 20 % of ARC POMC neurons (**Figure 11E**).

## **8. OP Enhances Central Sensitivity to Peripheral Leptin**

The absence of anorexigenic effect of OP in *ob/ob* mice (**Figure 10D**), associated with its inability to induce c-Fos expression (**Figures 10F**) and STAT3 activation (**Figure 11A and 11B**) in these animals, suggest that OP requires circulating leptin to mediate its anorectic action in the hypothalamus. To test this intriguing hypothesis, we administered daily a submaximal dose of exogenous leptin (100 µg/kg, ip) to *ob/ob* mice alone or in combination with OP (2 µg/mouse, icv) for 7 days. We found that the leptin+OP combination was more effective at reducing food intake (**Figure 11F**) and promoting weight loss (**Figure 11G**) than was leptin alone. After the seventh injection, *ob/ob* mice treated with leptin+OP exhibited a weight loss of  $9.4 \pm 1.2\%$  compared to  $2.6 \pm 3.0\%$  in *ob/ob* mice treated with leptin alone ( $p < 0.001$ ; **Figure 11G**). To further test the hypothesis that OP requires an interaction with circulating leptin to mediate its effect on energy homeostasis, we assessed the effect of peripheral administration of the mouse super-active leptin antagonist SLAN (highly stable point-mutated leptin; [30]) on OP action in WT mice on a NC diet. SLAN (20 µg/mouse, ip) administered 30 min prior to OP (2 µg/mouse, icv) fully reversed the anorexigenic effects of the endozepine (**Figure 11H**).



**Figure 11.** OP potentiates the effects of a low leptin dose.

(A) Representative photomicrographs of pSTAT3 labelling in the ARC and VMH of WT treated with NaCl, leptin (100 µg/kg BW, ip) or OP (2 µg, icv) and *ob/ob* mice treated with OP (2 µg, icv). ARC, arcuate nucleus; VMH, ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle. Scale bars = 100 µm.

(B) Quantification of pSTAT3-positive cells within the VMH (upper panel), ARC (middle panel), and NTS (lower panel) after NaCl, OP (2 µg, icv), leptin (100 µg/kg, ip), and OP (2

µg, icv)+leptin (100 µg/kg, ip) administration in WT mice and after NaCl or OP (2 µg, icv) administration in *ob/ob* mice. It can be seen that the leptin concentration used here failed to significantly increase pSTAT3 within the VMH. \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001, significantly different from NaCl-treated mice; ##*p* < 0.01, ###*p* < 0.001, significantly different from leptin-treated mice. ns: non-significant.

(C) Representative photomicrographs of pSTAT3 labelling in the VMH, ARC, and NTS of HFD-fed mice treated with NaCl or OP (2 µg, icv). Middle panels: High magnification of pSTAT3 labelling observed in the wall of the 3V. AP, area postrema; ARC, arcuate nucleus; cc, central canal; NTS, nucleus tractus solitarii; VMH,

ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle. Scale bars = 250  $\mu$ m; 100  $\mu$ m in middle panels.

(D) Quantification of pSTAT3-positive cells within the ARC and NTS after NaCl or OP (2  $\mu$ g, icv) administration in HFD-fed mice. \*\*\* $p$  < 0.001, significantly different from NaCl-treated mice.

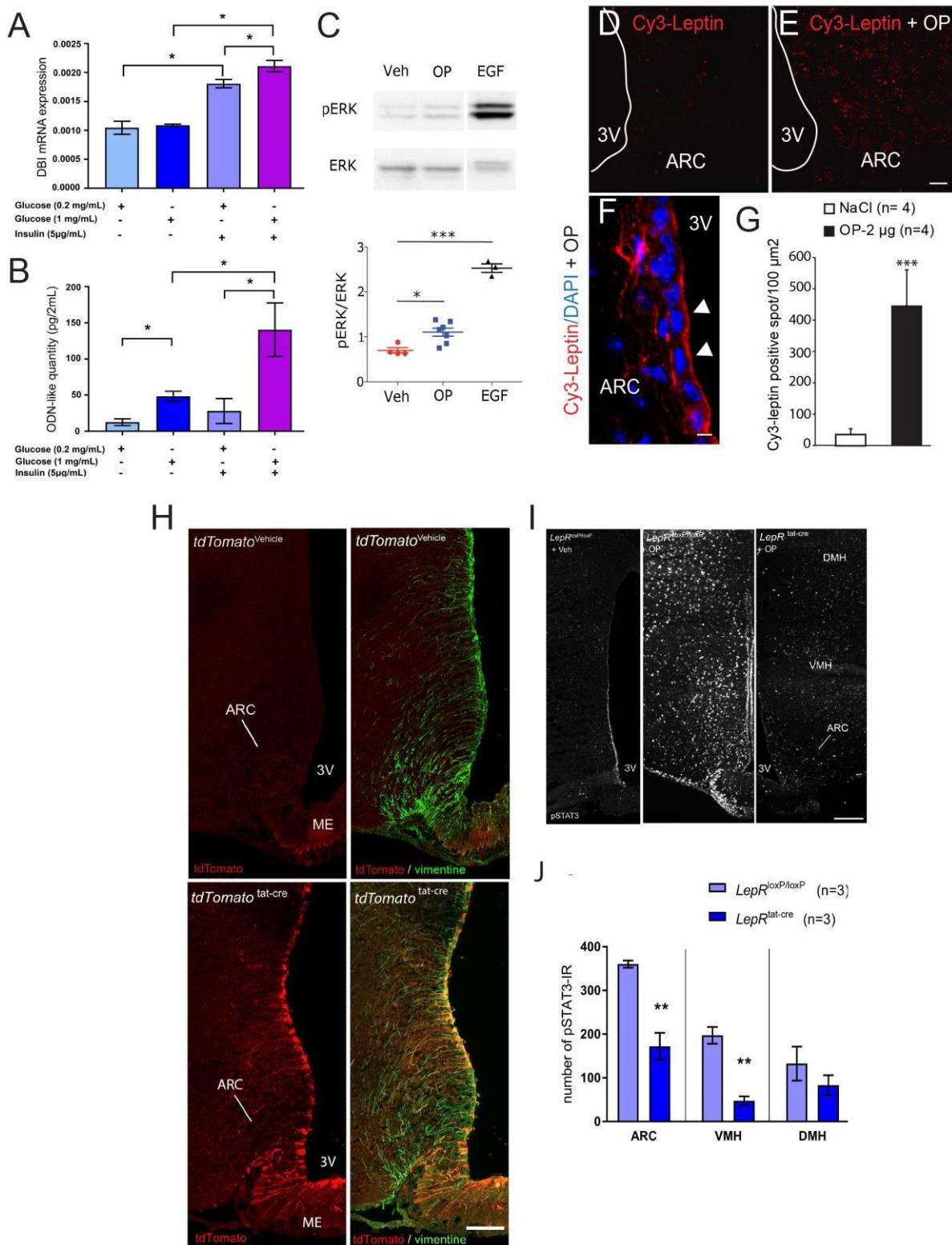
(E) POMC (green) and pSTAT3 (red) double-immunolabeling in the ARC of WT mice treated with NaCl or OP. The arrow indicates a double-positive cell. ARC, arcuate nucleus; 3V, third ventricle. Scale bars = 20  $\mu$ m.

(F) Daily food intake and (G) daily body weight variation in *ob/ob* mice treated with ip NaCl or leptin (100  $\mu$ g/kg) and either icv NaCl or OP (2  $\mu$ g). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001, # $p$  < 0.05, ## $p$  < 0.01, ### $p$  < 0.001, significant difference between leptin alone and leptin+OP conditions. ns: no significant difference between leptin alone and leptin+OP-treated mice.

(H) Cumulative food intake measured over a 24-h period in mice pre-treated with either ip NaCl or SLAN (20  $\mu$ g) and then administered NaCl or OP (2  $\mu$ g, icv). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001, significantly different from NaCl-treated mice. ns: no significant difference between SLAN+NaCl- and SLAN+OP-treated mice.

## **9. Glucose and Insulin Regulate Tanyctic ODN Secretion**

ODN being heavily expressed in tanyctyes (**Figures 1C and 1F**), which are increasingly recognized to function as glucose-sensing units [6], [31], we further explored the potential role of glucose in regulating ODN secretion in tanyctyes and whether insulin might play a role in this process by using primary cultures of rat tanyctyes. In contrast from what may have been expected from previous *in vivo* studies showing that ODN expression and release is regulated by glucose in the hypothalamus [22], switching tanyctyes from a culture medium with low glucose (0.2 mg/ml) to high glucose (1.0 mg/ml) had no effect on DBI transcript levels (**Figure 12A**). Interestingly, however, after 20 min of insulin treatment (5  $\mu$ g/ml), tanyctyes displayed increased DBI mRNA levels regardless of the concentration of glucose in the medium (**Figure 12A**). Assaying ODN levels in the medium using radioimmunoassay (RIA) revealed that, in accordance with the aforementioned studies performed in living hypothalamic explants [22], glucose acts as a trigger for the release of ODN peptides by tanyctyes (**Figure 12B**). Consistent with the fact that insulin induces DBI transcripts (**Figure 12A**), glucose-promoted ODN release is potentiated when tanyctyes are treated with insulin (**Figure 12B**).



**Figure 12. Effect of Central OP Injection on Leptin Transport**

(A-B) Quantification of (A) DBI mRNA expression and (B) ODN release in cultured tanyocytes treated with insulin (5  $\mu$ g/ml) in the presence of low (0.2 mg/ml) or high (1.0 mg/ml) glucose concentrations. \* $p < 0.05$ , significantly different from low glucose condition or between the presence and absence of insulin.

(C) Representative Western blot and quantitative comparison of ERK activation in cultured tanyocytes after treatment with NaCl (Veh), OP (2 µg/ml) or EGF (20 ng/ml). \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . significantly different from NaCl condition.

(D-F) Localization of Cy3-conjugated leptin in the ARC 30 min after its ip injection in saline (D) and OP-treated mice (E, F). Note the presence of Cy3-leptin internalization in putative tanyocytes lining the 3V in OP-treated mice (E and F, arrows in F). ARC, arcuate nucleus. Scale bars = 5 µm in D and E; 15 µm in F.

(G) Quantification of Cy3-conjugated leptin uptake within the ARC nucleus. \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from NaCl condition.

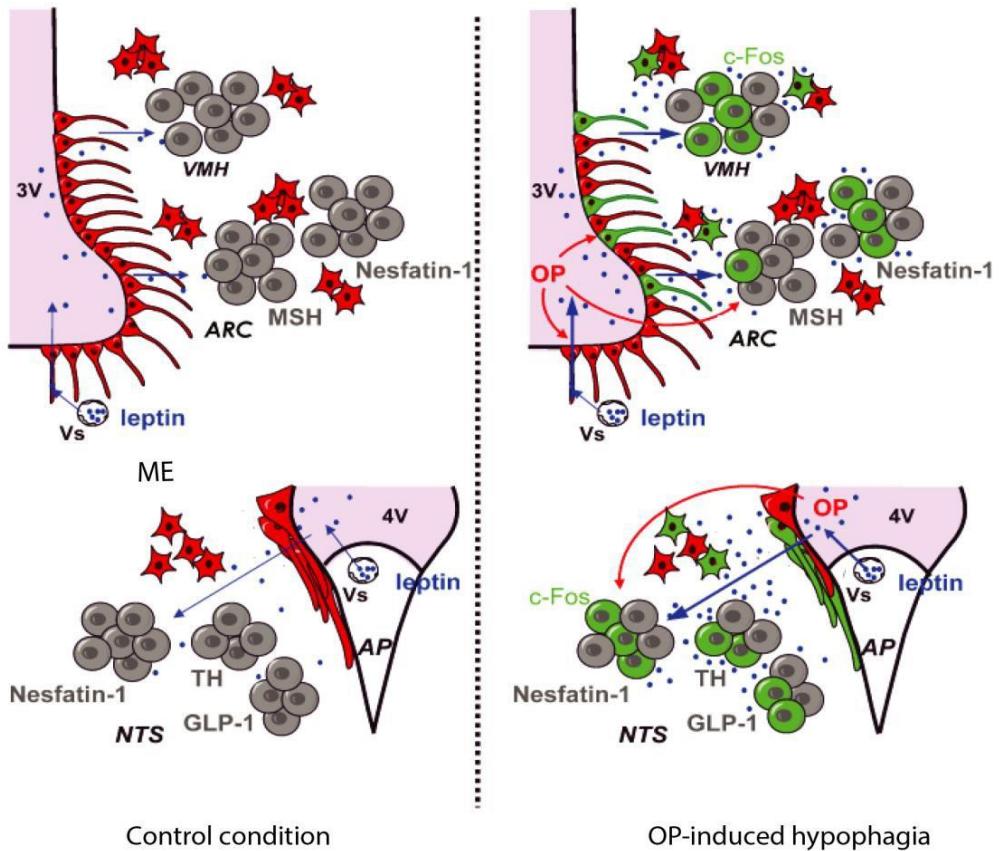
(H) Representative photomicrograph of dtTomato expression (right panels) in response to vehicle or TAT-Cre injection in 3V. dtTomato expression is observed in vimentine-positive tanyocytes (left panels). ARC, arcuate nucleus; ME, median eminence; 3V, third ventricle. Scale bar = 200 µm.

(I) Representative photomicrographs of pSTAT3 labeling in the ARC, VMH, and DMH of LepR<sup>loxP/loxP</sup> animals treated with vehicle (left panel) or OP (middle panel) and of OP-treated mice exhibiting a specific LepR deletion within tanyocytes (LepR<sup>loxP/loxP</sup>; right panel). ARC, arcuate nucleus; DMH, dorsomedial hypothalamus; VMH, ventromedial hypothalamus; 3V, third ventricle. Scale bar = 200 µm.

(J) Quantification of pSTAT3 immunoreactivity (pSTAT3-IR) in response to OP within hypothalamic nuclei of control animals (LepR<sup>loxP/loxP</sup>) and mice lacking LepR within tanyocytes (LepR<sup>loxP/loxP</sup>). \*\* $p < 0.01$ , significantly different from LepR<sup>loxP/loxP</sup> mice treated with OP. ARC, arcuate nucleus; DMH, dorsomedial hypothalamus; VMH, ventromedial hypothalamus.

## **10. OP Stimulates Tanyocyte-mediated Leptin Transport**

Since tanyocytes are well poised to act as a conduit for circulating metabolic signals, including leptin, into the hypothalamus [32], we next tested the intriguing possibility that OP may increase the efficiency of leptin action on hypothalamic feeding circuits by facilitating the transport of blood-borne leptin into the brain by tanyocytes. This leptin shuttle has been shown to depend both on LepR and ERK activities in tanyocytes [15]. Therefore, we first explored the putative role of OP in tanyctic ERK signaling in primary cultures. Similar to the erbB-1 ligand EGF (20 ng/ml), which was previously shown to restore the passage of circulating leptin into the hypothalamus of mice with diet-induced obesity [15], OP treatment (2 µg/ml) for 15 min was found to promote ERK phosphorylation in primary tanyocytes (**Figure 12C**). To further explore the potential role of OP in leptin transport *in vivo*, we performed single ip injections of Cy3-labeled leptin (100 µg/kg) in the leptin-deficient *ob/ob* mice 30 min after icv administration of NaCl or OP. Thirty minutes following Cy3-leptin injection, Cy3- fluorescence in hypothalamic nuclei (i.e., the ARC and VMH) was higher in OP-treated mice than in NaCl-treated control animals (**Figures 12D-G**). Interestingly, fluorescent spots were observed in the cell bodies of ARC tanyocytes lining the 3V to a greater extent in OP- than in NaCl-treated animals (**Figure 12F**). Finally, selective *LepR* deletion in tanyocytes via the stereotaxic infusion of the TAT-Cre fusion protein into the 3V [6], [33] (**Figure 12H**) of *LepR*<sup>loxP/loxP</sup> mice fed a NC diet abolished the ability of OP (2 µg, icv) to induce pSTAT3 in the hypothalamus relative to vehicle-injected *LepR*<sup>loxP/loxP</sup> littermates (**Figures 12I and 12J**). Altogether, these data demonstrate that the interaction of OP and LepR signaling pathways in tanyocytes plays a key role in regulating the shuttling of circulating leptin into the hypothalamus, which accounts for its action on neuronal circuits regulating food intake and energy homeostasis.



**Figure 13.** Hypothetical representation of the mechanisms leading to OP-induced reduction of food intake.

Tanycytes and tanycyte-like cells lining the 3V and 4V, respectively, constitute a diffusion barrier between the fenestrated blood vessels located within the ME and AP and the CSF. Moreover, they participate in the transport of leptin from the blood stream to the CSF. In basal conditions (left panel), leptin (blue dots) is present at a low concentration within the CSF (pink area) and its diffusion within the cerebral parenchyma is thereby limited. Upon OP icv injections (right panel), tanycytes and tanycyte-like cell activation may lead to a strong increase in the transport of leptin to CSF, resulting in a larger diffusion of this hormone in adjacent nuclei (i.e., ARC, VMH, and NTS; blue arrows). In turn, leptin-sensitive circuitries are strongly recruited within these structures and may support the OP-induced reduction of food intake. Upper panel, frontal view of hypothalamus; lower panel, dorsal view of DVC; red cells, ODN-positive cells; green cells, OP-activated cells (c-Fos-positive) including ODN- positive and -negative cells; AP, area postrema; GLP-1, glucagon like peptide-1; MSH, melanocyte-stimulating hormone; TH, tyrosine hydroxylase; Vs, blood vessels.

### **III. Materials and Methods**

#### **Animals**

Adult male C57BL/6J mice were purchased from Charles River Laboratories (L'Abresle, France). Some mice received an HFD (60% fat; SSNIFF GmbH, Germany). Experiments were performed in homozygous male C57BL/6J-*lep*<sup>ob</sup> (*ob/ob*), POMC-Tau-Topaz green fluorescent protein (GFP) transgenic mice [64], *tdTomato*<sup>loxP-STOP</sup>, or *LepR*<sup>loxP/loxP</sup> mice (Jax Mice; Jackson Laboratories). For acute OP injection and immunohistochemical studies, adult male C57BL/6J mice (12 to 15 weeks old) were housed in standard cages, maintained in a controlled environment (12 hours/12 hours light-dark cycle, 22 °C and 40-50% humidity) with free access to water and food (A04 pellets, SAFE, Augy, France). For chronic OP injection, adult male C57BL/6J mice (5 weeks old) were divided into 2 groups: Group 1 was fed with NC (A04 pellets, SAFE, Augy, France), Group 2 was given a HFD (45% fat, 13.2% protein and 41.8% carbohydrates) purchased from SSNIFF GmbH (Germany). Mice were randomly selected and sorted into experimental groups. Body weight and food intake were measured every week. After 10 weeks, mice underwent the implantation of a cannula in the lateral ventricle. Experiments conformed to EC Council Directive (2010/63/UE) and the French “Direction Départementale de la Protection des Populations des Bouches-du-Rhône” (animal housing facility accreditation: N° D13 0556; animal experimentation accreditation: N° 13□433).

#### **ODN and OP Synthesis**

Rat/mouse ODN (H-Gln-Ala-Thr-Val-Gly-Asp-Val-Asn-Thr-Asp-Arg-Pro-Gly-Leu-Leu- Asp-Leu-Lys-OH; DBI(33-50)) and its C-terminal octapeptide OP (H-Arg-Pro-Gly-Leu-Leu- Asp-Leu-Lys-OH; DBI(43-50)) were synthesized as previously described [48].

#### **Slice preparation and electrophysiology**

Coronal slices containing the ARC (200 µm thick) were cut with a Leica VT1000S in ice-cold (0-4 °C) low calcium/high magnesium artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing (in mM): 75 NaCl, 45 NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 KCl, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 7 MgCl<sub>2</sub>, 15 glucose, 31 sucrose, 2 ascorbic acid, 2 Na-pyruvate, 3 myo-inositol, pH 7.3-7.4, equilibrated with 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Slices were then transferred in a submerged recovery chamber filled with a standard oxygenated aCSF at room temperature containing (in mM): 115 NaCl, 26 NaHCO<sub>3</sub>, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 15 glucose, 2 ascorbic acid, 2 Na-pyruvate, 3 myo- inositol, pH 7.3-7.4. Slices were allowed to equilibrate at least 1 h at room temperature before starting recordings. GFP-expressing POMC neurons were identified *via* epifluorescence using a GFP filter set (470 nm excitation with a pE-100 CoolLED system, Scientifica) and patched under oblique infrared illumination (ScliceScope, Scientifica). Patch electrodes were pulled from borosilicate glass capillaries (resistance of 4-5 MΩ) and filled with an internal solution supplemented with 10 µM AlexaFluor 594 (Invitrogen). For voltage-clamp recordings of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (IPSCs), the internal

solution in the patch- electrode contained (in mM): 135 KCl, 10 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 5 EGTA, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 4 Mg-ATP, pH 7.35 (adjusted with KOH). IPSCs were recorded at -60 mV in the presence of kynurenic acid (2 mM, Sigma), a selective antagonist of ionotropic glutamate receptors. For current-clamp experiments, electrodes were filled with a solution containing (in mM): 120 mM K-gluconate, 10 KCl, 8 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 EGTA, 10 HEPES, 10 phosphocreatine, 2 Mg-ATP, 0.6 Na-GTP, pH 7.35 (adjusted with KOH). OP solution 100 nM was made up in standard aCSF and bath applied for 5-7 minutes. Data were acquired with an Axopatch 200A amplifier (Molecular Devices), low-pass filtered at 2 kHz and digitized at 10-20 kHz using a Digidata 1322A interface driven by pClamp 10.5 software (Molecular Devices). The detection and analysis of spontaneous IPSCs were achieved by the Mini Analysis software (version 6.0.3, Synaptosoft). The frequency and amplitude of synaptic events were determined 4-5 minutes after the beginning of OP perfusion. Statistical analysis was performed with the non-parametric paired sample Wilcoxon Signed Rank test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

### Surgery and icv Injection of OP

Cannula implantation was performed as previously described by Gaigé and colleagues [65]. One week post-surgery, mice were icv injected with 10 µl (2.5 µl/min) of physiological saline (NaCl 0.9%), OP (0.5 or 2 µg/day; 0.2 µg/µl), or ODN (2 µg/day; 0.2 µg/µl) solutions at the beginning of the dark phase. The doses used were chosen on the basis of previous work published by Lanfray and colleagues [22]. In leptin+OP co-administration, icv OP injection was performed 30 min prior to ip leptin treatment (100 µg/kg).

### TAT-Cre Delivery

A TAT-Cre fusion protein produced as previously detailed [6] was stereotactically infused into the 3V (1.5 µl over 5 min at 2 mg/ml; anteroposterior, -1.7 mm; midline, 0 mm; dorsoventral, -5.6 mm) or the 4V (1.5 µl over 5 min at 2 mg/ml; anteroposterior, -5.91 mm; midline, 0 mm; dorsoventral, -4.0 mm) of isoflurane-anesthetized mice. LepR expression was knocked out from cells in the brain selectively targeted by the infusion of TAT-Cre of *LepR*<sup>loxP/loxP</sup> mice, as reported previously [66]. TAT-Cre-mediated Tomato expression in *tdTomato*<sup>loxP-STOP</sup> mice was used to isolate tanycytes by FACS.

### Tanycyte Isolation by FACS

Tomato-positive and -negative cells were sorted and collected from ME and DVC microdissected explants of *tdTomato*<sup>loxP-STOP</sup> mice injected in the 3V and 4V, respectively, as described previously [6].

### Food Intake Measurements

Continuous food intake measurements and meal pattern analyses following acute OP treatment were performed using a previously described feeding station [65]. For food consumption during chronic treatment, non-fasting mice received an icv injection of NaCl (0.9%) or OP (2 µg) immediately prior to lights-off. Food intake (NC A04 or HFD pellets) was calculated as the difference between the pre-weighed and remaining food measured with a precision balance (Ohaus Scout Pro).

### Measurement of pica behavior (kaolin intake)

Pica behavior was assayed as previously described [67]. Briefly, kaolin pellets were prepared from pharmacological grade kaolin and gum Arabic (Sigma Chemical Co) mixed at a 99:1 ratio in distilled water. The pellets were dried at 37 °C for 72 h and then placed into individual cages. Mice were allowed access to regular food and kaolin pellets during a 5 days adaptation period. On the day of the experiment the last 24 h kaolin consumption was recorded.

### Telemetry Measurements

Locomotor activity was recorded using TA10TA-F20 telemetry probes (Data Sciences International). Mice were anesthetized as previously described [65]. A telemetry probe was implanted ip into each animal. After surgery, mice were housed individually and placed on a receiver RPC-1 (Data Sciences International). Telemetry radio signals emitted by the implanted transmitter were relayed to the data acquisition system via a consolidation matrix, converted into locomotor activity data using Dataquest ART 4.2 data acquisition software, and recorded at 5 min intervals.

### Glial Cell and Tanyocyte Cultures

Primary cultures of NTS glial cells and of ME tanyocytes were established from P0–P10 mice pups as described previously [15], [61]. After 10-15 days, NTS and ME cultures contained 95-99% GFAP-positive cells and 95-99% vimentin-positive tanyocytes, respectively.

### Tissue Histology and Oil Red O Staining

Oil Red O staining of hepatic sections was performed as previously described [68].

### Oral Glucose Tolerance Test and Glycemia Measurements

Glycemia measurements were carried out during the dark phase on mice having access to food *ad libitum*. Blood samples were collected from tail vein and glucose detection was performed as previously described [65]. For oral glucose tolerance testing, mice were fasted for 12 h and a bolus of glucose (1.5 g/kg) was administered *per os*.

### Tissue collection

Mice were anaesthetized using ip injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (16 mg/kg) and sacrificed by decapitation. The hypothalamus, dorsal vagal complex (DVC), liver, gonadic adipose tissue (GAT) and retroperitoneal adipose tissue (RPAT) were collected, rinsed in saline solution (NaCl 0.9%), snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until further analysis. Liver and adipose tissues were weighed and minced into small pieces (~1 mm<sup>3</sup>) before freezing. Liver and adipose tissues samples were also fixed by immersion in paraformaldehyde (PFA) 4% overnight.

### Oral glucose tolerance test and glycaemia measurement

Blood samples were collected from tail vein. A section of tail vein was pierced by a needle, and blood was directly applied to a strip to allow glucose detection with a glucose meter (Accu-Chek Performa nano, Roche Diagnostics Corp.). OP treatment was performed as described in Materials and Methods section and glycaemia measures were achieved 24 h after the last OP injection. For oral glucose tolerance test, fasted mice (12 h) received a bolus of glucose (1.5 g/kg). At 0, 5, 20, 60, 90, and 120 min after glucose administration, blood samples were collected and glycaemia was determined as described above.

### Real time PCR analysis

Animals used for RT-PCR analysis were sacrificed at the end of the treatment period. mRNA extraction and RT were made as described previously [67]. Briefly, total RNAs were extracted from frozen organ using TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. RT was realized using Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase in the presence of random hexamer primers (Promega). Gene expression analysis by real time PCR was performed using the LightCycler® 480 System (Roche Applied Science). The equivalent of 40 ng initial RNAs were subjected to PCR amplification in a 10 µl final volume using specific primers 0.25 µM (Table 1) and KAPA SYBR® FAST Master Mix (2X) optimized for Roche LightCycler® 480 (CliniSciences, KAPABiosystems). The generation of specific PCR products was confirmed by melting-curve analysis. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) was used as internal reference gene.

### Tissue histology and Oil Red O staining

Oil Red O (ORO) staining of hepatic sections was performed as previously described [68]. Briefly, 10 µm thick sections were prepared from fixed liver samples with a cryostat (Leica CM3050, France). ORO stock solution was prepared by dissolving 2.5 g ORO powder (Sigma-Aldrich) in 400 ml isopropanol. Sections were then incubated 6 min in ORO working solution (1.5 parts of ORO stock solution to one part of distilled water) and then washed three times in distilled water. RPAT were cut on a cryostat (Leica CM3050) and rinsed in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4).

Four microphotographs (x20) per animal were acquired using a Nikon Eclipse E600 light microscope coupled to a DXM 1200 Camera and ACT-1 software. The number of inclusions per surface unity ( $\text{mm}^2$ ) or the number of adipocytes per surface unity ( $\text{mm}^2$ ) was counted for each condition using the NIH Image J software.

### Tissue Preparation and Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on free-floating sections (40  $\mu\text{m}$ -thick). Immunohistochemistry conditions and antibodies used for labeling and cellular phenotyping are described in Table 2. Non-specific binding was assessed on alternate slices that were treated identically but in which the primary antibody was omitted. ODN antibody solution (1/400) pre-adsorbed overnight with  $10^{-6}$  M ODN failed to reveal specific labeling. c-Fos detection was performed as described by Girardet and colleagues [67]. Fluorescent antibody- and DAB-processed slides were air-dried and cover-slipped with an aqueous glycerol-based medium (Fluoprep; Dako, CA, USA).

### Image Acquisition and Data Processing

Fluorescence images were acquired by confocal microscopy (Zeiss LSM 710). In double- labeling experiments, images were sequentially acquired. All images were further processed in Adobe Photoshop 6.0, with only contrast and brightness adjustments. Photomicrographs of c-Fos labeling were taken on a Nikon Eclipse E600 light microscope using a DXM 1200 Camera equipped with ACT-1 software. c-Fos-positive nuclei were counted using NIH Image J software. Labeling and counting were performed on every fourth coronal section throughout the rostro-caudal axis from the brainstem to the hypothalamus. Cy3-leptin transport was quantified using NIH Image J.

### Construction of the Three-dimensional Models

The three-dimensional models of the brainstem and the hypothalamus were constructed using Free-D 3D reconstruction software [69].

### Measurement of ODN in Culture Media by RIA

Tanycytes were incubated for 45 min at 37 °C with fresh serum-free medium in the absence or presence of insulin. Tanycyte-conditioned media were collected, centrifuged at 200 x g for 10 min, desalted, and concentrated using a Sep-Pak C18 cartridge (Waters Corp., Milford). Bound material was eluted with 50% (v/v) acetonitrile/water containing 0.1% trifluoroacetic acid (v/v), freeze-dried, and kept at 4 °C until analyzed by RIA. The concentration of ODN was measured using an antiserum raised against synthetic rat ODN [70]. [ $\text{Tyr}^0$ ]-ODN was iodinated using the chloramine-T procedure [71] and purified on a Sep-Pak C18 cartridge. Dried samples were resuspended in phosphate buffer (0.1 M; pH 8) containing 0.1% Triton X-100. Final dilution of the ODN antiserum was 1:30,000 and

the total amount of [ $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>0</sup>]-ODN was 6,000 cpm/tube. Following 2 days of incubation at 4°C, the antibody-bound ODN fraction was precipitated by addition of bovine gamma globulin (1%, w/v) and polyethylene glycol 8000 (20%, w/v). After centrifugation (5,000 x g, 4°C, 45 min), the supernatant was removed and the pellet containing the bound fraction was counted with a gamma counter (2400 Automatic Gamma Counter, WIZARD2, PerkinElmer).

### Statistical Analysis

Masking was not used during data collection and analysis. Data are represented as mean  $\pm$  SEM. A one-way ANOVA was performed for comparisons between mice treated with different conditions. A Mann-Whitney U test was used for *post hoc* analysis. A repeated-measures ANOVA was performed in Figures 2B,C; 3; 4B; 6; 7; 8; 9A,C, 9D-F; 10A-E; 11B, D, F-H; 12A-C, G, J.

Labelling	Antibody	Host Species	Dilution	Incubation	Saturation	Secondary Antibody	
						Type/Reference	Dilution
<b>GFAP</b>	Z0334, Dako	Rabbit	1/1000	overnight at 4°C	3% NGS 0.3 % Triton X-100	Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400
	G3893 Sigma	Mouse	1/1000	overnight at 4°C	5% HS 0.3% Triton X-100	Alexa-594; A11032, Molecular Probes	1/400
<b>Vimentin</b>	AB5733 Merck Millipore	Chiken	1/2000	overnight at 4°C	4% NGS 0.3 % Triton X-100	Alexa-594; A11042, Molecular Probes	1/400
<b>ODN</b>	403 2207, Tonon et al, 1990	Rabbit	1/400	overnight at 4°C	1% BSA 0.3 % Triton X-100	Alexa-594; A11032, Molecular Probes	1/400
						Alexa-488; A11029, Molecular Probes	1/400
<b>c-Fos</b>	Ab-5, Calbiochem	Rabbit	1/10000	48 h at 4 °C	3% NGS 0.3 % Triton X-100	Biotinylated goat; Vector Labs	1/400
						Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400
	SC-52, Santacruz	Goat	1/5000	48 h at 4 °C	5% HS 0.3 % Triton X-100	Biotinylated goat; Vector Labs	1/400
						Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400
<b>p-Stat3 (Tyr705)</b>	9131, Cell Signalling	Rabbit	1/400	overnight at 4°C	3% NGS 0.3 % Triton X-100	Biotinylated goat; Vector Labs	1/200
						Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/200
						Alexa-594; A11012 Molecular Probes	1/200
<b>LepR</b>	Sc-1834, Santa Cruz	Goat	1/1000	overnight at 4°C	5% HS 0.3 % Triton X-100	Biotinylated goat; Vector Labs Avidin Texas Red Vector Labs	1/200 1/400
<b>Nesfatin-1/NUCB2</b>	H-003-22-B, Phoenix Pharm. Inc	Rabbit	1/10000	overnight at 4°C	3% NGS 0.3% Triton X-100	Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400
<b>GFP (POMC-GFP)</b>	A11122, Molecular Probes	Rabbit	1/1000	overnight at 4°C	3% NGS 0.3% Triton X-100	Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400
<b>TH</b>	MAB318, Merck Millipore - Chemicon	Mouse	1/1000	overnight at 4°C	3% NGS 0.3% Triton X-100	Alexa-594; A11032, Molecular Probes	1/400
<b>GLP1</b>	T-4057 Peninsula Lab.	Rabbit	1/800	overnight at 4°C	3% HS 0.3% Triton X-100	Alexa-488; A11034, Molecular Probes	1/400

**Table 1.** List of antibodies and immunohistochemistry conditions.

Gene Product	RefSeq	Primers	
		Fw	Rv
<b>DBI</b>	NM_001037999.2	TGCTCCCGCGCTTCG	CTGAGTCTTGA GGCGCTTCAC
<b>POMC</b>	NM_008895.3	ACGTGGAA GATGCCGAGATT	GGTTTCA GTCA GGGGCTGT
<b>NPY</b>	NM_023456.2	GGGGCTGTGTGGACTGACCCT	GATGTA GTGTCGCA GA GC GGAG
<b>AgRP</b>	NM_007427.2	AGCTTGCGGAGGTGCT	GCATTGAA GAA GC GG CAGT
<b>NUCB2</b>	NM_001130479.2	GCTGGATGCCCTCAAGACA	CTCCGCTCGTGTTCTTCAT
<b>GCG (GLP-1)</b>	NM_021332.2	TTCAA GACACAGAGGA GAA CCC	CATGA CGTTGGCAATGTTGT
<b>ObRb</b>	U42467.1	AATGACGCA GGGCTGTATGT	TCA GGCTCCA GAA GAA GAGG
<b>GAPDH</b>	NM_008084.3	TTCTCAA GCTCATTCCTGGTATG	GGATA GGGCTCTCTT GCTCA

**Table 2.** Primers sequences used for SYBR Green assays.

#### **IV. References**

- [1] Clasadonte J, Prevot V. The special relationship: glia-neuron interactions in the neuroendocrine hypothalamus. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2018;14 :25-44. DOI:10.1038/nrendo.2017.124.
- [2] García-Cáceres C, Balland E, Prevot V, Luquet S, Woods S, Koch M, Horvath T, Yi CX, Chowen J, Verkhratsky A, et al. Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nat. Neurosci.* 2019;22:7-14. DOI:10.1038/s41593-018-0286-y.
- [3] Dallaporta M, Bonnet MS, Horner K, Trouslard J, Jean A, Troadec JD. Glial cells of the nucleus tractus solitarius as partners of the dorsal hindbrain regulation of energy balance: a proposal for a working hypothesis. *Brain Res.* 2010 ;1350 :35-42. DOI : 10.1016/j.brainres.2010.04.025.
- [4] Douglass JD, Dorfman MD, Fasnacht R, Shaffer LD, Thaler JP. Astrocyte IKKbeta/NF kappaB signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. *Mol. Metab.* 2017;6:366-373. DOI:10.1016/j.molmet.2017.01.010.
- [5] García-Cáceres C, Fuente-Martín E, Burgos-Ramos E, Granado M, Frago LM, Barrios V, Horvath T, Argente J, Chowen JA. Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology.* 2011;152:1809-1818. DOI:10.1210/en.2010-1252.
- [6] Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Carmeliet P, et al. Tanycytic VEGF-A boosts blood hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab.* 2013;17:607-617. DOI:10.1016/j.cmet.2013.03.004.
- [7] Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* 2012;122:153-162. DOI:10.1172/JCI59660.
- [8] Zhang Y, Reichel JM, Han C, Zuniga-Hertz J, Cai D. Astrocytic process plasticity and IKKbeta/NF-kappaB in central control of blood glucose, blood pressure and body weight. *Cell Metab.* 2017;25:1091-1102. DOI:10.1016/j.cmet.2017.04.002.
- [9] Grayson BE, Levasseur PR, Williams SM, Smith MS, Marks DL, Grove KL. Changes in melanocortin expression and inflammatory pathways in fetal offspring of nonhuman primates fed a high-fat diet. *Endocrinology.* 2010;151:1622-1632. DOI:10.1210/en.2009-1019.
- [10] García-Cáceres C, Quarta C, Varela L, Gao Y, Gruber T, Legutko B, Jastroch M, Johansson P, Ninkovic J, Yi CX et al. Astrocytic insulin signaling couples brain glucose uptake with nutrient availability. *Cell.* 2016;166:867-880. DOI:10.1016/j.cell.2016.07.028.
- [11] Horvath TL, Sarman B, García-Cáceres C, Enriori PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen JA, Perez-Tilve D, et al. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:14875-14880. DOI:10.1073/pnas.1004282107.
- [12] Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Granado M, de Ceballos ML, Sánchez-Garrido MÁ, Sarman, B, Liu ZW, Dietrich MO, Tena-Sempere M, Argente-Arizón P, et al. Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J. Cli. Invest.* 2012;122:3900 3913. DOI:10.1172/JCI64102.

- [13] Kim JG, Suyama S, Koch M, Jin S, Argente-Arizon P, Argente J, Liu ZW, Zimmer MR, Jeong JK, Szigeti-Buck K, et al. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat. Neurosci.* 2014;17:908-910. DOI:10.1038/nn.3725.
- [14] Friedman JM. Leptin 20th Anniversary Issue 20 years of research on leptin: Physiology, pathophysiology and therapeutics. *Life Sci.* 2015;140:1-2.
- [15] Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, Rasika S, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, et al. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab.* 2014;19:293-301. DOI:10.1016/j.cmet.2013.12.015.
- [16] Farzampour Z, Reimer RJ, Huguenard J. Endozepines. *Adv. Pharmacol.* 2015;72:147-164. DOI:10.1016/bs.apha.2014.10.005.
- [17] Tonon M.C., Vaudry H., Chuquet J., Guillebaud F., Fan J., Masmoudi-Kouki O., Vaudry D., Lanfray D., Morin F., Prevot V., Papadopoulos V., Troadec J.D., Leprince J. (2019) Endozepines and their receptors: structure, functions and pathophysiological significance. *Pharmacol Ther.* 2019. pii: S0163-7258(19)30117-2. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.06.008.
- [18] Tonon MC, Désy L, Nicolas P, Vaudry H, Pelletier G. Immunocytochemical localization of the endogenous benzodiazepine ligand octadecaneuropeptide (ODN) in the rat brain. *Neuropeptides.* 1990;15:17-24.
- [19] Guillebaud F, Girardet C, Abysique A, Gaigé S, Barbouche R, Verneuil J, Jean A, Leprince J, Tonon MC, Dallaporta M, et al. Glial endozepines inhibit feeding-related autonomic functions by acting at the brainstem level. *Front. Neurosci.* 2017;11:308. DOI:10.3389/fnins.2017.00308.
- [20] De Mateos-Verchere JG, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Costentin J. The octadecaneuropeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;414:225-231. DOI:10.1016/s0014-2999(01)00771-3.
- [21] Matsuda K, Wada K, Miura T, Maruyama K, Shimakura SI, Uchiyama M, Leprince J, Tonon, MC, Vaudry H. Effect of the diazepam-binding inhibitor-derived peptide, octadecaneuropeptide, on food intake in goldfish. *Neuroscience.* 2007;150:425-432. DOI:10.1016/j.neuroscience.2007.09.012.
- [22] Lanfray D, Arthaud S, Ouellet J, Compère V, Do Rego JL, Leprince J, Lefranc B, Castel H, Bouchard C, Monge-Roffarello B, et al. Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines. *Diabetes.* 2013;62:801-810. DOI:10.2337/db11-0785.
- [23] do Rego JC, Orta MH, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Costentin J. Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecaneuropeptide: evidence for an endozepinergic tone regulating food intake. *Neuropsychopharmacology.* 2007;32:1641-1648. DOI:10.1038/sj.npp.1301280.
- [24] Compère V, Li S, Leprince J, Tonon MC, Vaudry H, Pelletier G. 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.* 2003 ;15:197-203.
- [25] Pecchi E, Dallaporta M, Charrier C, Pio J, Jean A, Moyse E, Troadec JD. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive radial-like cells are present in the vicinity of proliferative progenitors in the nucleus tractus solitarius of adult rat. *J. Comp. Neurol.* 2007;501:353-368. DOI:10.1002/cne.21259.

- [26] Langlet F., Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. Tanyocyte-like cells form a blood cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 2013;521:3389-3405. DOI:10.1002/cne.23355.
- [27] Hokfelt T, Foster G, Schultzberg M, Meister B, Schalling M, Goldstein M, Hemmings HC, Jr, Ouimet C, Greengard P. DARPP-32 as a marker for D-1 dopaminoceptive cells in the rat brain: prenatal development and presence in glial elements (tanyocytes) in the basal hypothalamus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1988;235:65-82. DOI:10.1007/978-1-4899-2723-1\_6.
- [28] Sidibe A, Mullier A, Chen P, Baroncini M, Boutin JA, Delagrange P, Prevot V, Jockers R. Expression of the orphan GPR50 protein in rodent and human dorsomedial hypothalamus, tanyocytes and median eminence. *J. Pineal. Res.* 2010;48:263-269. DOI:10.1111/j.1600-079X.2010.00750.x.
- [29] Barrachina MD, Martínez V, Wang L, Wei JY, Taché Y. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94:10455-10460. DOI:10.1073/pnas.94.19.10455.
- [30] Halpern Z, Elinav E, Gertler A. Development and characterization of high affinity leptins and leptin antagonists. *J. Biol. Chem.* 2011;286:4429-4442. DOI:10.1074/jbc.M110.196402.
- [31] Frayling C, Britton R, Dale N. ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanyocytes. *J. Physiol.* 2011;589:2275-2286. DOI:10.1113/jphysiol.2010.202051.
- [32] Prevot V, Dehouck B, Sharif A, Ciofi P, Giacopini P, Clasadonte J. The versatile tanyocyte: a hypothalamic integrator of reproduction and energy metabolism. *Endocr. Rev.* 2018;39:333-368. DOI:10.1210/er.2017-00235
- [33] Parkash J, Messina A, Langlet F, Cimino I, Loyens A, Mazur D, Gallet S, Balland E, Malone, SA, Pralong F, et al. Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic median eminence. *Nat. Commun.* 2015;6:6385. DOI:10.1038/ncomms7385.
- [34] Alho H, Fremeau RT Jr, Tiedge H, Wilcox J, Bovolin P, Brosius J, Roberts JL, Costa E. Diazepam binding inhibitor gene expression: location in brain and peripheral tissues of rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85:7018-7022. DOI:10.1073/pnas.85.18.7018.
- [35] Seeley RJ, Blake K, Rushing PA, Benoit S, Eng J, Woods SC, D'Alessio D. The role of CNS glucagon-like peptide-1 (7-36) amide receptors in mediating the visceral illness effects of lithium chloride. *J. Neurosci.* 2000;20:1616-1621.
- [36] Yamamoto K, Yamatodani A. Strain differences in the development of cisplatin induced pica behavior in mice. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 91; 2018:66-71. DOI:10.1016/j.vascn.2018.01.559.
- [37] van Swieten MM, Pandit R, Adan RA, van der Plasse G. The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. *J. Chem. Neuroanat.* 2014;61-62:207-220. DOI:10.1016/j.jchemneu.2014.05.004.
- [38] Dragunow M, Faull R. The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J. Neurosci. Methods.* 1989;29:261-265.
- [39] Bouyakdan K, Martin H, Liénard F, Budry L, Taib B, Rodaros D, Chrétien C, Biron É, Husson Z, Cota D, Pénaud L, Fulton S, Fioramonti X, Alquier T. The gliotransmitter ACBP controls feeding and energy homeostasis via the melanocortin system. *J. Clin. Invest.* 2019;130:2417-2430. DOI: 10.1172/JCI123454.

- [40] Zhan C, Zhou J, Feng Q, Zhang JE, Lin S, Bao J, Wu P, Luo M. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J. Neurosci.* 2013;33:3624-3632. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013.
- [41] Oh-I S, Shimizu H, Satoh T, Okada S, Adachi S, Inoue K, Eguchi H, Yamamoto M, Imaki T, Hashimoto K, et al. Identification of nesfatin-1 as a satiety molecule in the hypothalamus. *Nature.* 2006;443:709-712. DOI:10.1038/nature05162
- [42] Bonnet MS, Pecchi E, Trouslard J, Jean A, Dallaporta M, Troadec JD. Central nesfatin-1-expressing neurons are sensitive to peripheral inflammatory stimulus. *J.Neuroinflammation.* 2009;6:27. DOI:10.1186/1742-2094-6-27.
- [43] Shimizu H, Ohsaki A, Oh-I S, Okada S, Mori M. A new anorexigenic protein, nesfatin-1. *Peptides.* 2009;30:995-998.
- [44] Katsurada K, Maejima Y, Nakata M, Kodaira M, Suyama S, Iwasaki Y, Kario K, Yada T. Endogenous GLP-1 acts on paraventricular nucleus to suppress feeding: projection from nucleus tractus solitarius and activation of corticotropin-releasing hormone, nesfatin-1 and oxytocin neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014;451:276-281. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.07.116.
- [45] Yettefti K, Orsini JC, el Ouazzani T, Himmi T, Boyer A, Perrin J. Sensitivity of nucleus tractus solitarius neurons to induced moderate hyperglycemia, with special reference to catecholaminergic regions. *J. Auton. Nerv. Syst.* 1995;51:191-197.
- [46] Gandolfo P, Patte C, Leprince J, Thoumas J-L, Vaudry H, Tonon M-C. The stimulatory effect of the octadecapeptide (ODN) on cytosolic Ca<sup>2+</sup> in rat astrocytes is not mediated through classical benzodiazepine receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 1997;322:275-281. DOI:10.1016/s0014-2999(97)00012-5.
- [47] Lamacz M, Tonon MC, Smith-Rouet F, Patte C, Gasque P, Fontaine M, Vaudry H. The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes. *Mol. Brain. Res.* 1996;37: 290-296.
- [48] Leprince J, Gandolfo P, Thoumas JL, Patte C, Fauchère JL, Vaudry H, Tonon MC. Structure-activity relationships of a series of analogues of the octadecapeptide ODN on calcium mobilization in rat astrocytes. *J. Med. Chem.* 1998;41:4433-4438. DOI:10.1021/jm980275d.
- [49] Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature.* 2003;421:856-859. DOI:10.1038/nature01388.
- [50] Gao Q, Wolfgang MJ, Neschen S, Morino K, Horvath TL, Shulman GI, Fu XY. Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004;101:4661-4666. DOI:10.1073/pnas.0303992101
- [51] Lanfray D, Caron A, Roy MC, Laplante M, Morin F, Leprince J, Tonon MC, Richard D. Involvement of the Acyl-CoA binding domain containing 7 in the control of food intake and energy expenditure in mice. *Elife.* 2016;5 :e11742. DOI:10.7554/elife.11742.
- [52] Myers MG, Cowley MA, Munzberg H. Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 2008;70:537-556. DOI:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100707.
- [53] Caro JF, Kolaczynski JW, Nyce MR, Ohannesian JP, Opentanova I, Goldman WH, Lynn RB, Zhang PL, Sinha MK, Considine RV. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet.* 1996;348:159-161.

- [54] El-Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbaek C, Flier JS. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* 2000;105:1827-1832. DOI:10.1172/JCI9842. DOI: 10.1016/s0140-6736(96)03173-x.
- [55] Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, Porte D Jr. Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med.* 1996;2:589-593.
- [56] Hamdi Y, Kaddour H, Vaudry D, Bahdoudi S, Douiri S, Leprince J, Castel H, Vaudry H, Tonon MC, Amri M, et al. The octadecapeptide ODN protects astrocytes against hydrogen peroxide-induced apoptosis via a PKA/MAPK-dependent mechanism. *PLoS One.* 2012;7:e42498. DOI:10.1371/journal.pone.0042498.
- [57] Maniscalco JW, Rinaman L. Systemic leptin dose-dependently increases STAT3 phosphorylation within hypothalamic and hindbrain nuclei. *Am. J. Physiol.* 2014;306:R576-R585. DOI:10.1152/ajpregu.00017.2014.
- [58] Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Reombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science.* 1995;269:546-549. DOI:10.1126/science.7624778.
- [59] Balland E, Cowley MA. New insights in leptin resistance mechanisms in mice. *Front. Neuroendocrinol.* 2015;39:59-65. DOI:10.1016/j.yfrne.2015.09.004.
- [60] Baskin DG, Seeley RJ, Kuijper JL, LokS., Weigle D, Erickson JC, Palmiter RD, Schwartz MW. Increased expression of mRNA for the long form of the leptin receptor in the hypothalamus is associated with leptin hypersensitivity and fasting. *Diabetes.* 1998;47:538-543. DOI:10.2337/diabetes.47.4.538.
- [61] Dallaporta M, Pecchi E, Pio J, Jean A, Horner KC, Troadec JD. Expression of leptin receptor by glial cells of the nucleus tractus solitarius: possible involvement in energy homeostasis. *J. Neuroendocrinol.* 2009;21:57-67. DOI:10.1111/j.1365-2826.2008.01799.x.
- [62] Ottaway N, Mahbod P, Rivero B, Norman LA, Gertler A, D'Alessio DA, and Perez-Tilve D. Diet-induced obese mice retain endogenous leptin action. *Cell Metab.* 2015;21:877-882. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.04.015.
- [63] Knight ZA, Hannan KS, Greenberg ML, Friedman JM. Hyperleptinemia is required for the development of leptin resistance. *PLoS One* 5. 2010;e11376. DOI:10.1371/journal.pone.0011376.
- [64] Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science.* 2004;304:110-5. DOI:10.1126/science.1089459.
- [65] Gaigé S, Djelloul M, Tardivel C, Airault C, Félix B, Jean A, Lebrun B, Troadec JD, Dallaporta M. Modification of energy balance induced by the food contaminant T-2 toxin: a multimodal gut-to-brain connection. *Brain Behav. Immun.* 2014;37:54-72. DOI:10.1016/j.bbi.2013.12.008.
- [66] Bellefontaine N, Chachlaki K, Parkash J, Vanacker C, Colledge W, d'Anglemont de Tassigny X, Garthwaite J, Bouret SG, Prevot V. Leptin-dependent neuronal NO signalling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *J. Clin. Invest.* 2014;124:2550-2559.DOI:10.1172/JCI65928.

[67] Girardet C, Bonnet MS, Jdir R, Sadoud M, Thirion S, Tardivel C, Roux J, Lebrun B, Wanaverbecq N, Mounien L, et al. The food-contaminant deoxynivalenol modifies eating by targeting anorexigenic neurocircuitry. PLoS One. 2011;6:e26134. DOI:10.1371/journal.pone.0026134.

[68] Mehlem A, Hagberg CE, Muhl L, Eriksson U, Falkevall A. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. Nat. Protoc. 2013;8:1149-1154. DOI:10.1038/nprot.2013.055.

[69] Andrey P, Maurin Y. Free-D: an integrated environment for three-dimensional reconstruction from serial sections. J. Neurosci. Methods. 2005;45:233-244. DOI:10.1016/j.jneumeth.2005.01.006.

[70] Ghouili I, Bahdoudi S, Morin F, Amri F, Hamdi Y, Coly PM, Walet-Balieu ML, Leprince J, Zekri S, Vaudry H, et al. Endogenous expression of ODN-related peptides in astrocytes contributes to cell protection against oxidative stress: astrocyte-neuron crosstalk relevance for neuronal survival. Mol. Neurobiol. 2018;55:4596-4611. DOI:10.1007/s12035-017-0630-3.

[71] Vaudry H, Tonon MC, Delarue C, Vaillant R ; Kraicer J. Biological and radioimmunological evidence for melanocyte stimulating hormones (MSH) of extrapituitary origin in the rat brain. Neuroendocrinology. 1978;27:9-24 DOI:10.1159/000122796.



# RESULTATS SUPPLEMENTAIRES



# Rôle de l'exocytose dépendante des synaptobrévines 1-3 (VAMP1-3) dans le relargage de la leptine par les tanycytes hypothalamiques

## I. Introduction

Au sein du cerveau, le mode de transmission d'informations le plus étudié est la transmission synaptique. Ce phénomène implique le mécanisme d'exocytose régulée dépendant du calcium. Les neurones peuvent produire des neurotransmetteurs (glutamate, GABA), préférentiellement contenus dans de petites vésicules, mais également des peptides majoritairement stockés dans des vésicules à cœur dense. Ces vésicules, une fois produites, sont amarrées au niveau de la zone active de la terminaison axonale (Etape d'amarrage, Dresbach et al., 2001 ; Deák et al, 2009). Une étape de maturation des vésicules est ensuite possible afin de les rendre aptes à la fusion membranaire. Des protéines du cytoplasme viennent réguler l'assemblage des protéines liées à la membrane plasmique appelées soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) (Etape d'amorçage, Klenczin and Martin, 2000). Il existe plusieurs membres dans la famille des protéines SNARES que l'on peut regroupés en 2 groupes principaux : les vesicular-SNARE (v-SNARE) contenant les synaptobrévines ou Vesicle associated membrane protein (VAMP) et les target-SNARE (t-SNARE) comme la syntaxine et la synaptosomal associated protein of 25 kD (SNAP-25) (Söllner et al., 1993). En réponse à un signal, le plus souvent une augmentation du calcium intracellulaire, les v-SNARE et t-SNARE vont interagir ensemble pour former un complexe composé de 4 hélices  $\alpha$  et rapprocher les membranes vésiculaires et membranaires avant la fusion. L'importance des protéines SNARE dans le processus d'exocytose a été démontrée grâce aux études des effets des neurotoxines clostridiales. L'activité protéolytique de leurs chaînes légères est responsable du botulisme (Neurotoxine botulique ou BoNT) et du tétanos (Neurotoxine tétanique ou TeNT). L'intoxication des neurones avec ces toxines entraîne l'hydrolyse des protéines SNARES et bloque la libération des vésicules (Niemann et al., 1994 ; Montecucco and Schiavo, 1994). Le sérotype B de la neurotoxine botulique (BoNT/B) a une action spécifique des synaptobrévines 1 à 3.

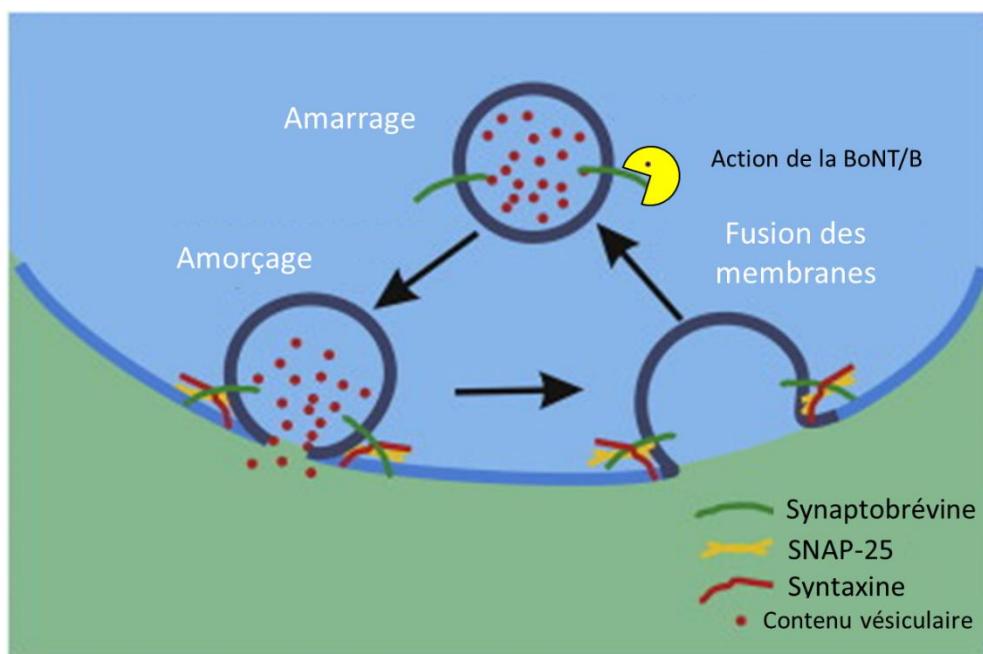


Figure 14: Résumé du rôle des protéines SNAREs dans la fusion des membranes vésiculaires et membranaires dans le processus d'exocytose. (Adapté de Xu et al., 2013).

La leptine est transportée par les tanocytes de l'éminence médiane avant d'être relarguée dans le LCR du 3V (Balland et al., 2014). Dans cette même étude, il a été démontré que les tanocytes des animaux *db/db* étaient capables de capturer la leptine mais sans pouvoir la faire sortir vers le LCR. L'administration d'EGF chez ces animaux, augmentant la phosphorylation de ERK dans l'éminence médiane, a permis à la leptine d'atteindre à nouveau l'hypothalamus. Ces résultats ont permis de montrer que la sécrétion de la leptine par les tanocytes était dépendante de cette voie de signalisation. Toutefois, le mode de sécrétion de la leptine demeure encore inconnu et peu d'informations sur les mécanismes de trafic intracellulaire des signaux périphériques au travers des tanocytes sont actuellement disponibles. Nous avons vu que l'application de leptine, au contact des tanocytes entraînait une vague calcique au sein de ces cellules (voir Etude 2). De plus, une étude a montré que des cellules gliales de la rétine (glie de Müller), morphologiquement proches des tanocytes, utilisent l'exocytose régulée pour sécréter le glutamate (Slezak et al., 2012).

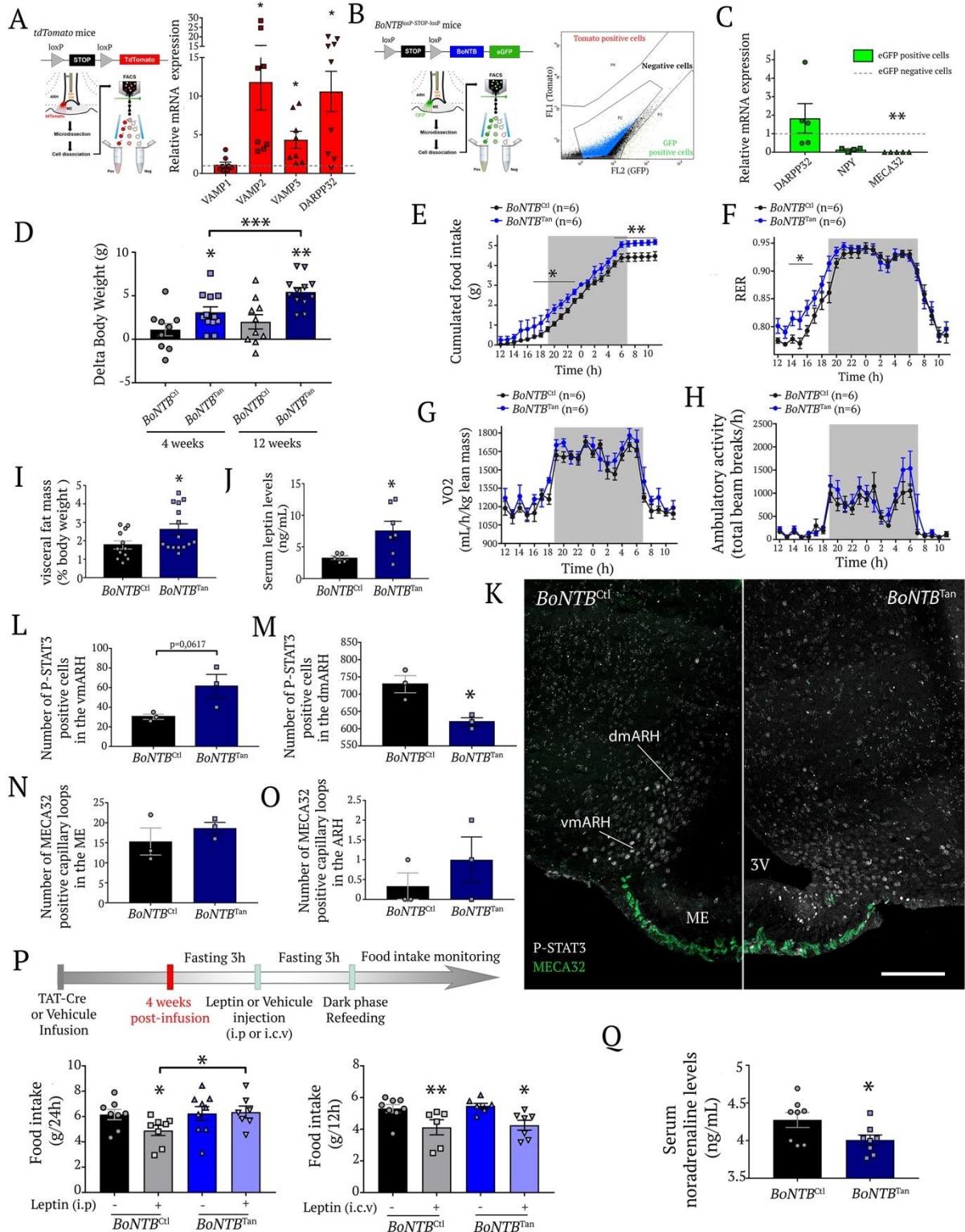
Ainsi dans cette étude, nous nous sommes intéressés au rôle de l'exocytose régulée dépendantes des VAMP1-3 dans les tanocytes afin d'évaluer son rôle dans la transcytose de la leptine et la régulation du métabolisme énergétique.

## II. Résultats

### 1. L'altération du trafic vésiculaire des tanocytes *in vivo* émousse l'accès de la leptine à l'ARH

Afin de connaître les potentiels rôles du trafic vésiculaire tanocytaire *in vivo*, nous avons d'abord évalué si les tanocytes expriment des composants de la superfamille de protéines SNARE dont les protéines de la membrane vésiculaire synaptobrénine 1-3 (Vamp1-3). Ces protéines jouent un rôle critique dans les exocytoses régulées (Kasai et al., 2012) y compris dans glie (Slezak et al., 2012). Leurs transcrits sont exprimés dans les tanocytes de l'éminence médiane de souris isolés par cytométrie en flux chez des souris grâce à la protéine fluorescente rouge Tomato après injection de TAT-Cre chez des animaux *tdTomato* (**Figure 1A**). Bien que l'ARNm de la *Vamp1* ait été exprimé à des niveaux similaires dans les tanocytes que dans les cellules négatives à la Tomato, les transcrits de la *Vamp2* et de la *Vamp3* semblent particulièrement enrichis dans la population de tanocytes (**Figure 1A**). Les protéines VAMP1, 2 et 3 ont également été détectées dans les cultures primaires tanocytes de rat *in vitro* (**Figure 2A**). Ensuite, nous avons induit l'expression transgénique de la chaîne légère de la neurotoxine botulique de sérotype B (BoNT/B) dans les tanocytes grâce à l'injection de TAT-Cre, dans le 3V des souris *BoNTB,EGFP<sup>loxP-STOP-loxP</sup>* (Slezak et al., 2012). Nous appellerons, par la suite, ces animaux *BoNTB<sup>Tan</sup>* et *BoNTB<sup>Ctl</sup>* désignera leurs contrôles issus de la même portée. Cette toxine bloque efficacement l'exocytose en clivant VAMP1-3 (Humeau et al., 2000 ; Schiavo et al., 1992). L'expression sélective de ce transgène dans les tanocytes hypothalamiques a été vérifiée par cytométrie en flux grâce à la présence de la protéine fluorescente verte EGFP, qui est co-exprimée avec la toxine (**Figure 1B**, **Figure 2B**). Les cellules fluorescentes vertes isolées exprimaient le marqueur tanocytaire DARPP-32, mais pas le marqueur neuronal NPY ni le marqueur cellulaire endothéial MECA32 (**Figure 1B**). L'expression de BoNT/B dans les tanocytes n'a pas affecté l'expression des ARNm de *Vamp1* et de *Vamp2*, mais nous avons observé une régulation négative significative de la transcription de *Vamp3* (**Figure 2C**).

L'expression de BoNT/B dans les tanocytes a augmenté le gain de masse corporelle (**Figure 1D**), la prise alimentaire (**Figure 1E**) et le RER pendant la période de jour (**Figure 1F**), mais n'a pas affecté la consommation d'oxygène (**Figure 1G**) ni l'activité locomotrice (**Figure 1H**) en comparaison avec leurs contrôles de la même portée. Cela a également augmenté la masse grasse viscérale (**Figure 1I**) et la concentration plasmatique de leptine (**Figure 1J**). Malgré une leptinémie plus importante chez les *BoNTB<sup>Tan</sup>*, l'expression endogène de pSTAT3, observée au matin, après la prise alimentaire nocturne habituelle, était significativement diminuée dans le dmARC (**Figure 1M et 1K**). Cela semble indiquer que la leptine en circulation avait un accès restreint à l'hypothalamus. De plus, les sont dans l'incapacité à réduire la consommation alimentaire suite à l'injection de leptine par voie intrapéritonéale comparés au *BoNTB<sup>Ctl</sup>*. Toutefois, l'injection intracérébroventriculaire de leptine était aussi efficace que chez les souris *BoNTB<sup>Tan</sup>* que *BoNTB<sup>Ctl</sup>* (**Figure 1P**) pour réduire la prise alimentaire. Nous avons également constaté que l'expression de BoNT/B dans les tanocytes hypothalamiques de souris pouvait également perturber l'activité générale du système nerveux sympathique, comme le suggère la diminution des taux circulants de noradrénaline observés chez les *BoNTB<sup>Tan</sup>* comparés *BoNTB<sup>Ctl</sup>* (**Figure 1Q**).



**Figure 1.** VAMPs 1-3 are expressed in median eminence tanycytes and blunting their activity by expressing *Botulinum neurotoxin type B* (BoNT-B) partially phenocopies *LepR<sup>TanKO</sup>* mice.

(A) Schéma résumant la principe de tri cellulaire des tanycytes *TdTomato*. Le graphique représente l'expression relative d'ARNm pour VAMP 1-3 et un marqueur tanycytaires DARPP32 dans les cellules positive pour la fluorescence *TdTomato* comparée à celles obtenues dans les cellules non fluorescentes triées de manière aléatoire à partir du même échantillon d'éminence médiane. La ligne grise représente la moyenne obtenue par les cellules négatives.

(B) Schéma résumant la principe de tri des tanocytes positifs à la GFP issus d'échantillons d'éminence médiane de souris *BoNTB*<sup>Tan</sup>. L'image représente les différentes populations triées à partir d'un échantillon d'éminence médiane d'une souris *BoNTB*<sup>Tan</sup>.

(C) Graphique représentant l'expression relative d'ARNm codant pour DARPP32, NPY et MECA32 dans les cellules positives à GFP des animaux *BoNTB*<sup>Tan</sup> rapportée sur celle des cellules négatives.

(D) Graphique représentant le pourcentage de prise de poids chez les animaux *BoNTB*<sup>Tan</sup> et leurs contrôles *BoNTB*<sup>Ctl</sup>, 4 semaines (panel de gauche) et 12 semaines (panel de droite) après infusion de TAT-Cre dans le troisième ventricule.

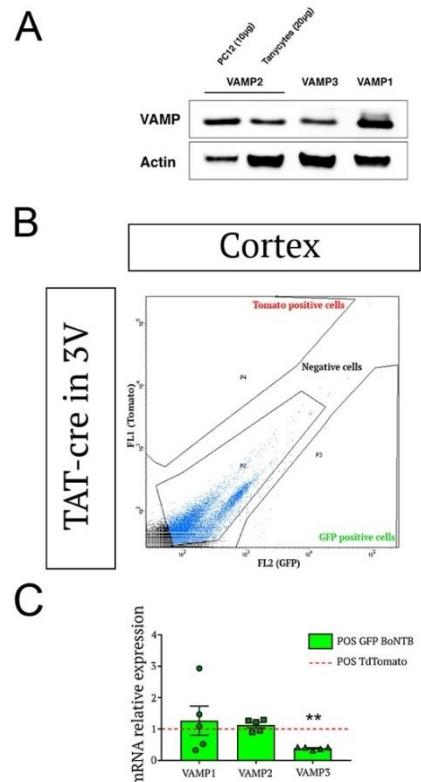
(E-H) Mesure de la prise alimentaire moyennée sur 48H (E), du ratio d'échange respiratoire (F), de la consommation d'oxygène (G) et de l'activité locomotrice (H) chez les souris *BoNTB*<sup>Tan</sup> et leurs contrôles de la même portée, 4 semaines après infusion de TAT-Cre. Un test Two-way ANOVA associé à un test LSD de Fisher non corrélé a été appliqué. \*:  $p<0.05$  *BoNTB*<sup>Ctl</sup> vs *BoNTB*<sup>Tan</sup>. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(I) Pourcentage de masse graisseuse viscérale en fonction de la masse corporelle et leptinémie sérique (J), 12 semaines après infusion de TAT-Cre.. Un test de Mann-Whitney test a été appliqué \*:  $p<0.05$  *BoNTB*<sup>Ctl</sup> vs *BoNTB*<sup>Tan</sup>. Representative photomicrograph and quantification of basal pSTAT3 (L, M) in the arcuate nucleus and MECA32 in ME immunofluorescence (N, O) Scale bar: 200 $\mu$ m.

(K-O) Photomicrographie représentative (K) et quantification du marquage pSTAT3 basal (L, M) dans le noyau arqué (ARH) ventromédial (vm) et dorsomédial (dm). (N, O) Quantification du marquage MECA32 dans le noyau arqué et l'éminence médiane (ME). Echelle : 200 $\mu$ m. Un test t de Student non apparié a été appliqué. \*:  $p<0.05$  *BoNTB*<sup>Ctl</sup> vs *BoNTB*<sup>Tan</sup>. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(P) Schéma résumant le principe du test de tolérance à la leptine en i.p et i.c.v. Le graphique du dessous, à gauche, représente la prise alimentaire des souris *BoNTB*<sup>Ctl</sup> (panneau noir/gris) et *BoNTB*<sup>Tan</sup> (panneaux bleus) 24H après injection en i.p de leptine (3mg/kg) ou véhicule (PBS pH 8,0). Le graphique de droite représente la prise alimentaire des souris *BoNTB*<sup>Ctl</sup> (panneau noir/gris) et *BoNTB*<sup>Tan</sup> (panneaux bleus) 12H après injection en i.c.v. de leptine (2 $\mu$ g dans 2 $\mu$ L) ou véhicule (PBS pH 8,0). Un test de Mann Whitney a été appliqué. \* :  $p<0,05$  ; \*\* :  $p<0,01$  ; leptine vs véhicule et entre les groupes indiqués. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(Q) Graphique représentant la concentration sérique de noradrénaline chez des souris *BoNTB*<sup>Ctl</sup> vs *BoNTB*<sup>Tan</sup>, 12 semaines après l'infusion de TAT-Cre. Le test t de Student a été appliqué. \*:  $p<0.05$  *BoNTB*<sup>Ctl</sup> vs *BoNTB*<sup>Tan</sup>.



**Figure 2.** Vérification de l'expression des VAMP1-3 dans les cultures primaires de tanocytes et chez les souris *BoNTB<sup>Tan</sup>*

(A) Western blots montrant l'expression de VAMP1, VAMP2 and VAMP3 dans des lysats de tanocytes de culture.

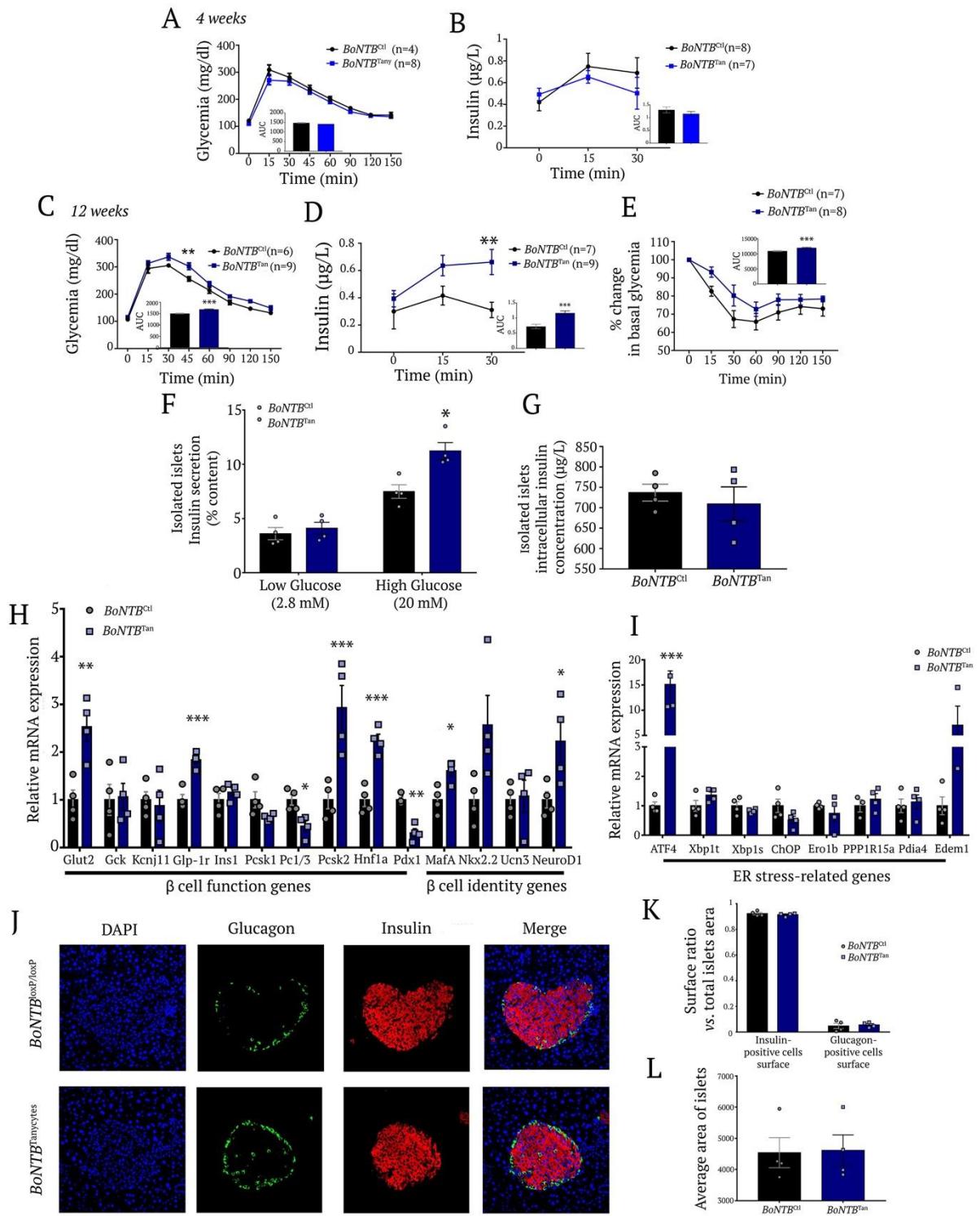
(B) Image représentant les différentes populations cellulaires triées dans un échantillon de cortex issu d'une souris *BoNTB<sup>Tan</sup>*.

(C) Graphique représentant l'expression relative d'ARNm des VAMPs 1-3 dans les tanocytes GFP triés à partir d'éminences médianes issues d'animaux *BoNTB<sup>Tan</sup>*, sur celle observée dans les tanocytes exprimant la Tomato (dont la moyenne d'expression est représentée par la ligne rouge).

## 2. L'expression de BoNT/B dans les tanocytes provoque une intolérance au glucose et une intolérance à l'insuline.

Les souris *BoNTB<sup>Tan</sup>* n'ont montré aucune altération de la capacité à gérer un bolus exogène de glucose par rapport aux animaux *BoNTB<sup>Ctl</sup>*, 4 semaines après l'infusion de TAT-Cre dans le 3V (**Figure 3A et 3B**). Par contre, 12 semaines après l'induction de la recombinaison, les souris *BoNTB<sup>Tan</sup>* présentaient une glycémie plus élevée que leurs contrôles, de 30 à 45 minutes après l'injection de glucose (**Figure 3C**) malgré une sécrétion d'insuline induite par cette même injection plus importante que chez les *BoNTB<sup>Ctl</sup>* (**Figure 3D**). Nous avons également observé que les souris *BoNTB<sup>Tan</sup>* présentaient une intolérance à l'insuline par rapport aux souris *BoNTB<sup>Ctl</sup>* (**Figure 3E**). En même temps, les îlots pancréatiques isolés provenant d'animaux *BoNTB<sup>Tan</sup>* ont montré une sécrétion d'insuline accrue en réponse à des concentrations élevées de glucose en comparaison avec les îlots des témoins (**Figure 3F**), alors que leur contenu cellulaire en insuline était similaire (**Figure 3G**). Cela suggère qu'un mécanisme compensatoire pourrait être déclenché par une insulinorésistance des cellules  $\beta$  de ces animaux (Weir et Bonner-Weir, 2004). Le profilage de l'expression génétique des îlots de Langerhans des animaux *BoNTB<sup>Ctl</sup>* et *BoNTB<sup>Tan</sup>* a révélé la

modification de l'expression de plusieurs marqueurs clés des cellules  $\beta$ , tandis que d'autres n'ont pas été affectés par l'expression transgénique de BoNT/B dans les tanocytes. L'augmentation de la fonction cellulaire (c.-à-d. la sécrétion d'insuline) dans les îlots de  $BoNTB^{tan}$  a été associée à une augmentation des taux d'ARNm de *Glut2*, *Glp-1r*, *Pcsk2* et *Hnf1a* et à une diminution de l'expression des *Pdx1* et *Pc1/3* (**Figure 3H**). Les transcrits des marqueurs de la réponse UPR *Atf4* et *Edem1* ont également été augmentés (**Figure 3I**). Nous n'avons observé aucune différence marquée dans la distribution des cellules  $\alpha$  et  $\beta$  du pancréas entre des souris  $BoNTB^{tan}$  et  $BoNTB^{ctl}$ , 12 semaines après l'administration de Tat-Cre (**Figure 3J-L**). Dans l'ensemble, ces données suggèrent que même si les fonctions des cellules  $\beta$  sont amplifiées chez les souris  $BoNTBTan$ , elles continuent de présenter une altération de l'homéostasie du glucose. Cette compensation des cellules  $\beta$  (c.-à-d. l'augmentation de la sécrétion d'insuline) peut être déclenchée par la résistance à l'insuline, dans laquelle le maintien de la fonction des cellules  $\beta$  est observé (Weir et Bonner-Weir, 2004).



**Figure 3.** L'expression de la BoNT/B dans les tanocytes de l'éminence médiane entraîne une intolérance au glucose et à l'insuline.

(A) Courbe représentant la glycémie au cours d'un test de tolérance au glucose chez des souris *BoNTB<sup>Ctl</sup>* et *BoNTB<sup>Tany</sup>*, 4 semaines après injection de TAT-Cre. Le graphique représente l'aire sous la courbe. Un test two-way ANOVA avec correction de Tukey a été appliqué. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(B) Concentration sérique d'insuline pendant les 30 premières minutes d'un test de tolérance au glucose chez des souris *BoNTB<sup>Ctl</sup>* et *BoNTB<sup>Tany</sup>*, 4 semaines après injection de TAT-Cre. Le graphique représente l'aire

sous la courbe . Un test two-way ANOVA avec correction de Tukey a été appliqué. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(C) Courbes représentant la glycémie au cours d'un test de tolérance au glucose chez des souris  $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ , 12 semaines après injection de TAT-Cre. Le graphique représente l'aire sous la courbe. Un test two-way ANOVA avec correction de Tukey a été appliqué à la courbe. \*\* :  $p<0,01$   $BoNTB^{Ctl}$  vs  $BoNTB^{Tan}$ . Un test t de Student a été appliqué à l'aire sous la courbe. \*\*\* :  $p<0,001$   $BoNTB^{Ctl}$  vs  $BoNTB^{Tan}$ . Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(D) Concentration sérique d'insuline pendant les 30 premières minutes d'un test de tolérance au glucose chez des souris  $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ , 12 semaines après injection de TAT-Cre. Le graphique représente l'aire sous la courbe . Un test two-way ANOVA avec correction de Tukey a été appliqué. \*\* :  $p<0,01$   $BoNTB^{Ctl}$  vs  $BoNTB^{Tan}$ . Un test t de Student a été appliqué à l'aire sous la courbe. \*\*\* :  $p<0,001$   $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ . Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(E) Variation en pourcentage de la glycémie basale lors d'un test de tolérance à l'insuline chez des souris  $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ , 12 semaines après injection de TAT-Cre. Le graphique représente l'aire sous la courbe. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(F) Graphique représentant la sécrétion d'insuline des îlots pancréatiques totaux isolés de souris  $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ , 12 semaines après injection de TAT-Cre, après application d'une faible et forte concentration en glucose. Un test t de Student a été appliqué. \* :  $p<0,05$ .  $BoNTB^{Ctl}$  vs  $BoNTB^{Tan}$ . Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(G) Graphique représentant la concentration d'insuline dans un îlot pancréatique isolé de souris  $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ , 12 semaines après infusion de TAT-Cre. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(H) Expression relative de l'ARNm relatif à la fonction des cellules  $\beta$  et marqueurs d'identité des îlots pancréatiques isolés de souris  $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ , 12 semaines après infusion de TAT-Cre. Un test t de Student ou un test de Mann Whitney a été appliqué en réponse au test de normalité. \* :  $p<0,05$ , \*\* :  $p<0,01$ , \*\*\* :  $p<0,001$   $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ . Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(I) Expression relative d'ARNm relatif des marqueurs de stress ER des îlots pancréatiques isolés de souris  $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ , 12 semaines après perfusion de TAT-Cre. Un test t de Student ou un test de Mann Whitney a été appliqué en réponse au test de normalité. \*\*\* :  $p<0,001$   $BoNTB^{Ctl}$  vs  $BoNTB^{Tan}$ . Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

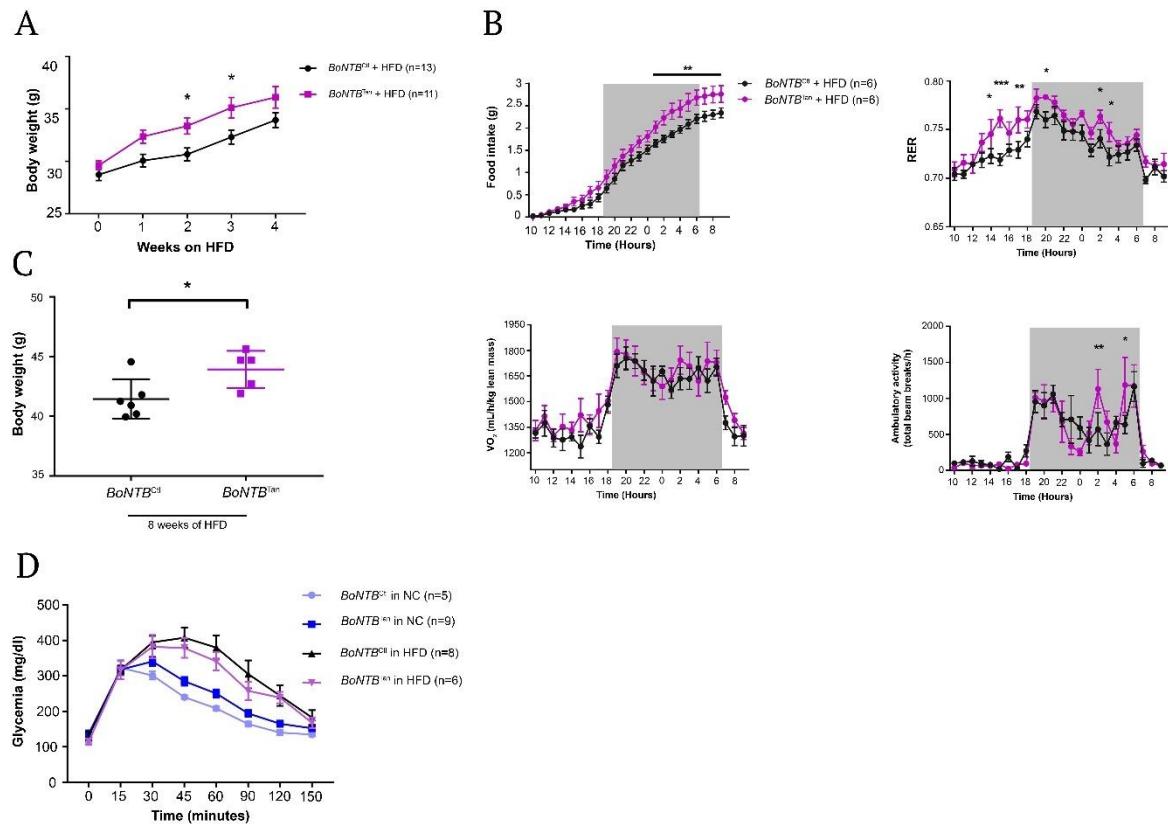
(J) Images confocales représentant le marquage pour les noyaux (bleu), le glucagon (vert) et le l'insuline (rouge) dans des îlots pancréatiques isolés de souris  $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ , 12 semaines après injection de TAT-Cre.

(K) Graphique représentant le ratio entre la surface des îlots exprimant l'insuline (panneau de gauche) ou le glucagon (partie de droite) sur la surface totale des îlots d'animaux  $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ , 12 semaines après injection de TAT-Cre. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

(L) Graphique représentant la surface moyenne des îlots pancréatiques des souris  $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$ , 12 semaines après l'infusion de TAT-Cre. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes  $\pm$  SEM.

### 3. L'expression de la BoNT/B dans les tanocytes, amplifie l'effet du régime gras

Nous avons également placé des animaux  $BoNTB^{Tan}$  et leur contrôles sous régime gras (60% de lipides) pendant 8 semaines. Dès la seconde semaine de ce régime, les souris exprimant la BoNT/B dans les tanocytes présentent un poids significativement supérieur aux  $BoNTB^{Ctl}$  alors que les deux groupes avaient un poids moyen homogène lors du changement de nourriture (**Figure 4A**). Nous avons suivi le métabolisme de base des  $BoNTB^{Ctl}$  et  $BoNTB^{Tan}$  en cages métaboliques individuelles, 4 semaines après le début du régime gras. Tout comme en NC, les  $BoNTB^{Tan}$  mangent davantage, présentent un RER supérieur sans altération majeure de leurs dépenses énergétiques (**Figure 4B**) pouvant expliquer la différence de prise de poids constatée. Elle est d'ailleurs maintenue jusqu'à 8 semaines de régime gras (**Figure 4C**). Concernant la tolérance au glucose, après 4 semaines de régime gras, nous n'avons constaté aucune différence entre les deux groupes, suggérant que ce laps de temps est suffisant pour les animaux contrôles répondent au glucose exogène de manière comparable que les  $BoNTB^{Tan}$  (**Figure 4D**).



**Figure 4.** L'expression de la BoNT/B dans les tanycytes hypothalamiques sensibilise au régime gras

(A) Courbes de masses corporelles brutes des animaux *BoNTB*<sup>ctrl</sup> et *BoNTB*<sup>Tan</sup> sous régime gras (60% de lipides).

(B) Mesure de la prise alimentaire moyennée sur 48H (haut, gauche), du ratio d'échange respiratoire (haut, droit), de la consommation d'oxygène (bas, gauche) et de l'activité locomotrice (bas, droit) chez les souris *BoNTB*<sup>Tan</sup> et leurs contrôles de la même portée, après 4 semaines de régime gras. Un test Two-way ANOVA associé à un test LSD de Fisher non corrélé a été appliqué. \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001 *BoNTB*<sup>ctrl</sup> vs *BoNTB*<sup>Tan</sup>. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes ± SEM.

(C) Mesure de la masse corporelle brutes chez les animaux *BoNTB*<sup>ctrl</sup> et *BoNTB*<sup>Tan</sup>, après 8 semaines de régime gras. Un test t de Student a été appliqué. \*: p<0.05 *BoNTB*<sup>ctrl</sup> vs *BoNTB*<sup>Tan</sup>. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes ± SEM.

(D) Courbes représentant la glycémie au cours d'un test de tolérance au glucose chez des souris *BoNTB*<sup>ctrl</sup> (bleu clair) et *BoNTB*<sup>Tan</sup> (bleu foncé), sous régime normal et *BoNTB*<sup>ctrl</sup> (noir) et *BoNTB*<sup>Tan</sup> (violet) après 4 semaines de régime gras. Le graphique représente l'aire sous la courbe. Un test two-way ANOVA avec correction de Tukey a été appliqué. Les valeurs sont représentées sous forme de moyennes ± SEM.

### III. Matériel et Méthodes

#### 1. Animaux

Toutes les souris C57Bl/6J ont été stabilisées dans une pièce à température contrôlée (21-22 °C), sans agent pathogène spécifique, avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures et un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Les souris Tg(CAG-BoNT/B,EGFP)U75-56wp/J ont été conçues par Franck Pfeifer (Université de Strasbourg, France ; JAX Stock No. 018056) et utilisées dans d'une précédente publication (Slezak et al., 2012). Les études sur les animaux ont été approuvées par

les Comités institutionnels d'éthique pour le soin et l'utilisation des animaux expérimentaux de l'Université de Lille. Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux directives d'utilisation des animaux spécifiées par la Directive du Conseil de l'Union européenne du 22 septembre 2010 (2010/63/EU).

## **2. Injections de TAT-Cre et pAAV-Dio2-iCre-2A-GFP**

La protéine de fusion TAT-Cre a été produite comme indiqué précédemment (Peitz et al., 2002). Les deux produits ont été infusés stéréotaxiquement dans le troisième ventricule (2 $\mu$ L sur 15 min à concentration stock de 1,27 mg/ml ; antéropostérieur, -1,7 mm ; ligne médiane, 0 mm ; dorsoventral, -5,6 mm) de souris floxées anesthésiées à l'isoflurane 1 semaine avant les expériences.

### **1. Tri cellulaire activé par fluorescence (FACS) et analyses PCR en temps réel**

#### **1.1. Isolation des tanyocytes hypothalamiques par FACS**

L'éminence médiane des souris *tdTomato*<sup>loxP/+</sup> et *Tg(CAG-BoNT/B,EGFP)U75-56wp/J* injectées avec la TAT-Cre ont été microdissectées et dissociées enzymatiquement par le système de dissociation à la papaïne (Worthington, Lakewood, NJ) afin d'obtenir des suspensions monocellulaires. Le FACS a été réalisé à l'aide d'un cytomètre trieur de cellules EPICS ALTA (Beckman Coulter, Inc.). La décision de tri était basée sur des mesures de fluorescence *tdTomato* (excitation 488nm ; détection : bande passante 675+/-20nm) ou de fluorescence GFP (excitation 488nm ; détection : bande passante 525+/-30 nm) en comparant les suspensions cellulaires des animaux *tdTomato* positifs ou GFP positifs et d'échantillons témoins, comme indiqué en Figure 1B. Pour chaque animal, 4000 cellules *tdTomato* positives et négatives ou 200 cellules GFP positives et négatives ont été triées directement dans le tampon d'extraction 10 $\mu$ L 0,1% Triton® X-100 (Sigma-Aldrich) et 0,4 U/ $\mu$ l RNaseOUT™ (ThermoFisher).

#### **1.2. Analyses quantitatives RT-PCR**

Pour les analyses d'expression génique, les suspensions d'ARNm obtenus à partir d'explants hypothalamiques microdissectionnés ou de tanyocytes triés FACS ont été rétrotranscrits grâce à la SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies). Une étape de préamplification linéaire a été ensuite réalisée sur les cellules triées uniquement, en utilisant le protocole TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (P/N 4366128, Applied Biosystems). La PCR en temps réel a été réalisée sur le système PCR 7900HT Applied Biosystems utilisant des sondes d'expression génétique TaqMan® spécifiques suivants (Applied Biosystems) : DARPP32 (Ppp1r1b\_Mm00454892\_m1), (LepR\_Mm01262070\_m1); VAMP1 (Vamp1-Mn00772307\_m1), VAMP2 (Vamp2-Mn0125243\_m1), VAMP3 (Vamp3-Mn01268442\_g1), NPY (NPY-Mm03048253\_m1), MECA32 (Plvap-Mm00453379\_m1). Les gènes de ménage rapporteurs sont les suivants: r18S (18S-Hs999999901\_s1) ; ACTB (Actb-Mm00607939\_s1). Les données sur l'expression génique ont été analysées à l'aide des logiciels SDS 2.4.1 et Data Assist 3.0.1 (Applied Biosystem).

## **2. Mesures physiologiques**

### ***2.1. Analyse du métabolisme de base***

Des cages métaboliques (TSE Systems GmbH, Allemagne) ont été utilisées pour analyser la prise alimentaire, la dépense énergétique totale, la consommation d'oxygène, la production de dioxyde de carbone, les mouvements ambulatoires (nombre de rupture totale du faisceau/h) des souris. Les souris ont été stabilisées individuellement et acclimatées aux cages pendant 48 heures avant les mesures expérimentales. Au cours du test pair-fed, les animaux considérés comme « paired-fed » ont été nourris avec la même quantité de nourriture que celle que le groupe témoin avait consommé au cours des 24 dernières heures.

### ***2.2. Test de tolérance au glucose et dosage de l'insuline***

Les souris ont été mises à jeun sur la nuit avant l'expérience. L'échantillon de sang pour le dosage d'insuline a été prélevé avant, 15 et 30 min après l'administration de glucose avec capillaire en verre au niveau de la queue. Les échantillons ont été conservés sur glace jusqu'à la fin de l'expérience avant d'être centrifugés (4 °C, 600 tr/min, 15 min) pour recueillir le sérum. Ils ont ensuite été congelés à -80 °C jusqu'à la réalisation du dosage ELISA pour l'insuline selon les recommandations du fabricant (Mercodia). La glycémie basale a été mesurée avant l'administration de glucose par voie intraperitoneale (i.p.), (1,5 mg de glucose/g de masse corporelle), 15, 30, 45, 60, 120 et 150 minutes après l'administration de glucose à l'aide d'un glucomètre (boîtier OneTouch® Verio).

### ***2.3. Test de tolérance à l'insuline***

Les souris ont été mises à jeun 6 heures avant l'expérience. La glycémie basale a été mesurée avant l'administration d'insuline en i.p. (0,75UI/kg de masse corporelle), 15, 30, 45, 60, 120 et 150 min après l'administration de glucose à l'aide d'un glucomètre (boîtier OneTouch® Verio).

### ***2.4. Test de sensibilité à la leptine in vivo***

Les souris ont d'abord été séparées une par cage et mises à jeun pendant 3 heures dans l'après-midi. Les animaux ont ensuite été répartis en deux groupes et ont reçu des injections i.p. ou i.c.v. de leptine murine recombinante (3mg/kg ; Harbor-UCLA Medical Center, California) ou de véhicule (PBS pH 8.0) 3 heures avant de remettre la nourriture. La masse corporelle et la prise alimentaire ont été mesurées avant, 12h et 24h après traitement.

## **3. Analyse du cerveau et des tissus périphériques**

### ***3.1. Immunohistofluorescence et analyse des pSTAT3 et MECA-32***

Les souris adultes ont été sacrifiées par décapitation le matin, à l'allumage des lumières (phase de jour). Les cerveaux ont été prélevés avant d'être directement inclus dans le Tissue Tek (Sakura®) et congelés en frais. Des coupes coronaires d'une épaisseur de 20 µm ont été réalisées, post-fixées avec une solution de 2 % de paraformaldéhyde pendant une heure et traitées pour l'immunofluorescence comme décrit précédemment ([Bouret et al., 2012](#)) en utilisant des anticorps primaires dirigés contre pSTAT3 (Tyr705) (1:1000 ; #9131, Cell Signaling Technology) et contre

MECA32 (1:500 ; 550563, BD Parmingen). Des images de la double immunofluorescence ont été acquises à l'aide d'un microscope Apotome Axio.Z2 (caméra AxioCam MRm, Zeiss). Les lames ont ensuite été codées pour dissimuler les groupes de traitement et les cellules immunoréactives (IR) pSTAT3 ont été comptées sur huit sections représentatives par animal. Les vaisseaux immunoréactifs MECA-32 sont visualisés dans le plexus superficiel primaire de la zone externe de l'éminence médiane mais certains vaisseaux immunoréactifs MECA-32 forment des boucles capillaires intra-infundibulaires. Le nombre total de boucles fenestrées a été évalué sur toute la surface rostrocaudale de l'éminence médiane et du noyau arqué chez chaque animal (8 sections d'éminence médianes représentatives par animal). Le nombre moyen de cellules ou de vaisseaux immunopositifs par zone a ensuite été comparé entre les groupes.

### ***3.2. Études sur les îlots pancréatiques***

Les pancréas ont été digérés par collagénase de type V (C9263 ; 1,5 mg/ml) pendant 11 minutes à 37 °C comme décrit précédemment (Annicotte et al., 2009, Rabhi et al., 2016). Rapidement, après digestion et séparation dans un milieu à gradient de densité, les îlots ont été purifiés par séparation manuelle sous microscope et cultivés durant la nuit dans un milieu RPMI 1640 (Gibco, 61870-010) contenant 1mM de FBS (Gibco, 10270-106) et pénicilline/streptomycine. Pour les tests de sécrétion d'insuline, une trentaine d'îlots ont été exposés à 2,8 mM ou 20 mM de glucose dans un tampon HEPES Krebs-Ringer bicarbonate contenant 0,5% de BSA sans acide gras. L'insuline libérée dans le milieu a été mesurée 1 heure plus tard à l'aide du kit Ultrasensitive Insulin ELISA (Mercodia). Les données sont exprimées sous forme de ratio sur la teneur totale en insuline.

### ***3.3. Extraction d'ARN, mesures et profilage des îlots pancréatiques***

L'ARN total a été extrait des îlots à l'aide du kit RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Tokyo, Japon) selon les recommandations du fabricant. L'expression de l'ARNm a été mesurée après rétrotranscription par qPCR en temps réel avec Master Mix FastStart SYBR Green (Roche) selon les recommandations du fabricant et des oligonucléotides spécifiques du gène. Les résultats de la qPCR en temps réel ont été normalisés en fonction des taux d'ARNm de référence de la cyclophiline endogène. Les résultats sont exprimés en tant que niveau relatif d'ARNm d'une expression génétique spécifique en utilisant la formule 2-ΔCt.

### ***3.4. Immunofluorescence (IF) sur les coupes de pancréas murins***

La IF a été effectuée comme décrit précédemment (Annicotte et al., 2009, Blanchett et al., 2011). Brièvement, après démasquage de l'antigène au tampon citrate (Sigma) des coupes parffinées de pancréas de 5 µm d'épaisseur ont été incubées avec les anticorps primaires suivants : anti-Insuline (Dako ; A0564, 1:1000), anti-Glucagon (Sigma-Aldrich ; G2654, 1:1000). Le marquage d'immunofluorescence a été révélé à l'aide d'anticorps secondaires anti-cochon d'Inde conjugués Alexa 568 et anti-Souris conjugués Alexa 488 (1:500, Jackson ImmunoResearch). Les noyaux ont été révélés au Hoescht. Afin de réaliser l'analyse morphométrique, les images ont été traités sur le logiciel ImageJ par un observateur qui ignorait les groupes expérimentaux.

## **4. Expériences sur les cultures primaires et les lignées cellulaires**

### **4.1. Culture primaire de tanocytes**

Les tanocytes ont été isolés à partir de l'éminence médiane des rats âgés de 10 jours (P10) comme décrit précédemment (Prevot et al., 2003).

### **4.2. Extraction de protéines et western blot**

Les protéines ont été extraites dans 300µl de tampon de lyse (#FNN0011, Invitrogen) pour une culture de tanocytes de 10cm. Le lysat a été homogénéisé et clarifié par centrifugation à 12000 tr/min pendant 10min à 4 °C. La teneur en protéines a été déterminée selon la méthode de Bradford. Des aliquots d'extraits protéiques contenant la même quantité de protéines ont été préparées dans un tampon d'échantillon 5X et chauffées pendant 5min. Les protéines ont été séparées sur des gels à gradient de Nupage 4-12% dans un tampon MES et transférées dans une membrane de nitrocellulose (Invitrogen). La membrane a été bloquée dans le TBS contenant 0,1% de Tween 20 et de BSA 3% pendant 1 heure à température ambiante et soumise à l'immunoblotting pendant la nuit à 4 °C. Pour visualiser l'immunoréaction, la membrane a été incubée avec des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase (Sigma) pendant 1 heure à température ambiante et développée par chimiluminescence (Super signal West Dura, Invitrogen). Les anticorps utilisés pour le western blotting étaient l'anti-VAMP1 (#104002, Synaptic System), l'anti-VAMP2 (#104211, Synaptic System), l'anti-VAMP3 (#104103, Synaptic System), Synaptic et l'anti-actine (#A5441 ; Sigma) et ont été utilisés au 1:1000.

## **5. Statistiques**

Les résultats sont présentés sous forme de Moyenne ± Erreur type (SEM). Les échantillons ou les animaux ont été exclus si leurs valeurs se situent à l'extérieur de l'écart-type de ± 2 fois l'écart-type ou qu'un échec expérimental objectif ait été observé. Les investigateurs ne connaissaient pas les groupes d'animaux ou ces derniers ont été randomisés. Pour vérifier si les populations suivent une distribution gaussienne, un test de normalité a été effectué (test de Kolgomorov-Smirnov pour n entre 5 et 7 ; test Shapiro-Wilk pour  $n \geq 7$ ). Pour les distributions normales, un test paramétrique a été utilisé ; pour deux comparaisons de population, un test de Student non apparié (bilatéral pour le traitement et l'expérience de phénotypage, bilatéral dans le cas contraire) a été utilisé comme indiqué dans les légendes des figures. Pour un test de comparaison multiple, une analyse de variance par un test ANOVA dans un ou deux sens, suivi par un test post hoc Sidak, a été effectué. Pour les distributions non gaussiennes, nous avons utilisé le test de Mann-Whitney pour comparer deux groupes. L'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 7 (GraphPad, San Diego, CA). Le seuil de signification était  $p < 0,05$ .

# DISCUSSIONS



## Etude 1 : Impact de l'obésité maternel sur le développement de la structure de l'éminence médiane

L'étude de Kim et ses collaborateurs a permis de montrer que l'obésité maternelle durant la grossesse perturbait l'organisation générale de la BHE ainsi que sa perméabilité dans l'éminence médiane de l'hypothalamus. En effet, lors de l'injection d'Evans Blue (un marqueur de perméabilité en intraveineux chez des petits, au jour post-natal 0, issus de mère en surpoids ou présentant un poids normal, la diffusion du marqueur dans l'éminence médiane (EM) est plus prononcée chez les petits provenant d'une mère obèse. L'Evans Blue pénètre davantage dans le parenchyme hypothalamique. Afin d'expliquer cette différence, ils ont quantifié le nombre de vaisseaux exprimant un marqueur des fenestrations dans les vaisseaux ; la protéine MECA32 dans l'EM et le noyau arqué (ARC). L'augmentation de la perméabilité de l'éminence médiane chez les petits issus de mamans obèses est associée avec une augmentation du nombre de vaisseaux fenestrés positifs au MECA32 sans augmentation du nombre total de vaisseaux dans la structure. Mais, contrairement à ce qui avait déjà été publié ([Langlet et al., 2013](#)), cette augmentation ne semble pas être associée avec un changement de la densité de marquage associé aux jonctions serrées : ZO-1 au niveau des parois du troisième ventricule.

Les auteurs ont choisi d'utiliser la densité de marquage sur la totalité de la paroi gauche du troisième ventricule (3V) pour exprimer ce résultat. Il peut être tout à fait approprié dans beaucoup de cas, c'est pour cela qu'il est utilisé en première intention dans ce type d'étude. Toutefois, dans ce cas précis, la densité de pixels ne permet pas d'apprécier le maillage caractéristique du marquage ZO-1 sur les parois du 3V (nid d'abeille). Ainsi, si le marquage peut être aussi dense dans les 2 conditions, il est possible que sa structure soit différente, indiquant un dysfonctionnement et cela n'a pas été présenté. Ensuite, le fait d'avoir choisi une si grande région d'intérêt peut également entraîner une sous-estimation de ce que l'on observe. Il a été précédemment décrit que les défauts de la fonction de barrière portée par les tanyocytes de l'éminence médiane étaient observable en regard de l'augmentation du nombre de vaisseaux fenestrés. Il aurait peut-être été intéressant de quantifier la densité de pixels uniquement dans la zone du 3V où les auteurs ont observé l'augmentation du nombre de vaisseaux fenestrés et la comparer avec une zone semblable chez les animaux contrôles. Toutefois, les auteurs ont, par la suite, fait part du changement de la fonction de la barrière de l'éminence médiane au travers de l'expression en ARNm de la claudine-1 marqueurs des jonctions serrées exprimés spécifiquement par les tanyocytes. Les auteurs ont observé une augmentation d'expression de ce marqueur dans des extraits d'ARC des petits issus d'un mère obète.

Ces résultats intéressants suggèrent que la manipulation de l'environnement maternel, notamment par l'alimentation, durant la gestation, induit des changements morphologiques de la barrière hématoencéphalique de leur progéniture. Les mécanismes impliqués dans le développement de ces différences structurales ne sont pas développés et l'analyse de l'épigénétique de ces animaux pourrait être une bonne piste. L'étude du devenir de ces jeunes animaux pourrait également être un élément supplémentaire à exploiter afin de vérifier si les changements morphologiques observés dans l'EM à P0 auront des répercussions métaboliques à l'âge adulte. L'étude du transport des signaux métaboliques comme la leptine pourrait également être abordé.

## Etude 2 : Le rôle des récepteurs à la leptine (LepR) dans le transport tanycytaire de la leptine

La leptine, hormone sécrétée par les adipocytes en périphérie, joue un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie énergétique en contrôlant la prise alimentaire et la dépense énergétique (Ahima et Flier, 2000 ; Caron et al., 2018 ; Cohen et al., 2001b ; de Luca et al., 2005 ; Friedman, 2019 ; Pan et Myers, 2018). Pour cela, elle a besoin de traverser la barrière hémato-encéphalique et d'accéder à des neurones spécifiques sensibles à la leptine dans l'hypothalamus et ailleurs, un processus, en partie, médié par les tanocytes (Balland et al., 2014).

Nos résultats montrent de façon convaincante que, contrairement aux études récentes qui remettent en question l'expression des récepteurs à la leptine (LepR) dans les tanocytes (Yoo et al., 2019), ces derniers ne sont pas seulement exprimés mais sont fonctionnellement actifs dans les tanocytes de l'éminence médiane de l'hypothalamus. L'hypothèse selon laquelle les LepR ne sont pas exprimés dans les tanocytes pourrait s'expliquer par le fait que, comme les astrocytes, ces cellules gliales hypothalamiques spécialisées n'expriment pas les gènes rapporteurs Cre dépendants couramment utilisés dans les modèles animaux de type LepR::Cre (Yuan et al., 2018) ou que les techniques alternatives utilisées à ce jour ne sont pas assez sensibles (Yoo et al., 2019). De plus, dans les lignées de souris Cre-dépendantes inductibles utilisées par d'autres équipes (Yoo et al., 2019), l'accessibilité du gène LepR dans les tanocytes peut être altérée par l'utilisation du tamoxifène, connu pour modifier l'architecture chromatinienne (Zhou et al., 2019), interférer avec l'activité du récepteur aux œstrogènes et affecter son métabolisme (Liu et al., 2018). Nous avons, dans notre cas, résolu ces problèmes techniques grâce à une série de méthodes et d'outils pour détecter la présence et l'activité des LepR.

De plus, nous démontrons que la signalisation des LepR dans les tanocytes joue un rôle critique dans le mécanisme de transcytose par lequel ils transportent la leptine circulante dans l'hypothalamus. De plus, l'activation des LepR par la leptine entraîne l'activation précoce du récepteur EGF (EGFR), dont le laboratoire avait, précédemment et par hasard, démontré la capacité à rétablir la sensibilité à la leptine périphérique chez des animaux obèses induits par l'alimentation (Balland et al., 2014). Cette activation de l'EGFR, qui dépend de l'action de la leptine sur son récepteur dans les tanocytes, est nécessaire pour libérer la leptine internalisée dans le compartiment cellulaire de l'endosome précoce, en déclenchant la voie de signalisation ERK. Nous avons montré que les LepR et l'EGFR semblent former un complexe capable de se lier à la leptine comme à l'EGF. Toutefois, il reste à déterminer si l'activation de l'EGFR par le EGF seul module également les effets de la liaison de la leptine ainsi que les processus en aval, y compris l'activation ERK ou la libération de leptine.

La leptine centrale exerce également des effets spécifiques et complémentaires en périphérie. Sur le tissu adipeux, elle agit, notamment, sur la régulation de la répartition des nutriments en diminuant l'expression des enzymes clés de la lipogénèse de *novo* et en stimulant les niveaux de pHSL, essentiels pour l'activation de la lipolyse (Buettner et al., 2008 ; Caron et al., 2018). De manière intéressante, en plus des légères conséquences sur le poids corporel, nous montrons que la suppression de l'expression des LepR dans les tanocytes de l'éminence médiane de souris mâles adultes, entraîne un phénotype conséquent. La recombinaison dans le modèle, augmente la prise alimentaire ainsi que l'utilisation disproportionnée des glucides, favorisant ainsi l'accumulation de lipides et modifiant considérablement la capacité du cerveau à contrôler l'homéostasie du glucose. Nous avons observé que ce dernier élément est associé à une déficience marquée des cellules pancréatiques et une modification du tonus sympathique.

La capacité de la leptine à réguler ces divers paramètres métaboliques réside dans les neurones exprimant la LepR dans le noyau arqué (ARC), à savoir les neurones à la proopiomélanocortine (Pomc) et les neurones exprimant le peptide associé à l'Agouti (Agrp). Ces neurones sont connus pour être impliqués dans le contrôle de la lipogenèse du tissu adipeux (Buettner et al., 2008) et dans l'homéostasie du glucose (Coppari et al., 2005), en réponse à ce signal d'adiposité. Par exemple, la suppression des LepR dans les neurones Pomc ou Agrp entraîne une obésité modérée, tandis que l'élimination des LepR dans les neurones Agrp et Pomc combinés entraîne des effets cumulatifs importants sur l'adiposité sans changement significatif de la prise alimentaire (Balthasar et al., 2004 ; van de Wall et al., 2008). Le fait que nos souris imitent ce phénotype métabolique suggère que la déplétion des LepR dans les tanocytes empêche l'accès de la leptine aux neurones Pomc et Agrp et ses actions dans les populations neuronales du second ordre. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'expression du transcrit Agrp, un antagoniste des récepteurs de la mélanocortine, et celle de Socs3, un gène de réponse à la leptine connu (Howard et Flier, 2006), sont régulées à la baisse dans l'ARC lorsque les LepR tanocytaire sont retirés. Il est intéressant de noter que le système mélanocortine est impliqué à la fois dans l'homéostasie du glucose (Berglund et al., 2012 ; Coppari et al., 2005 ; Vauthier et al., 2017) et dans la régulation de la lipogenèse dans le tissu adipeux blanc grâce au système nerveux sympathique (Buettner et al., 2008) et que les taux de noradrénaline circulante sont réduits chez les souris ne présentant pas de LepR dans les tanocytes.

A la lumière de ces résultats, nous proposons l'hypothèse selon laquelle la diminution d'activité des neurones Pomc et Agrp dans le noyau arqué dorsomédian (dmARC) en réponse à la leptine, altère leur capacité à communiquer correctement avec d'autres neurones via le système mélanocortine (Fan et al., 2000 ; Obici et al., 2001). Ce dysfonctionnement modifie l'activité des neurones du système nerveux autonome du tronc cérébral et de la moelle épinière (Rossi et al., 2011 ; Sohn et al., 2013), et donc leur contrôle des tissus périphériques cibles (Caron et al., 2018 ; Coppari et Bjorbaek, 2012). En effet, nous avons constaté que la diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques chez les souris dépourvues de LepR dans les tanocytes était associée à une augmentation significative de leur expression des récepteurs adrénnergiques  $\alpha$ 2A. Ce résultat concorde avec les études antérieures montrant que l'activation de ces récepteurs est associée à une diminution de la tolérance au glucose et de l'exocytose insulinique chez  $\beta$  les souris (Fagerholm et al., 2011). De plus, chez l'humain, un polymorphisme conduisant à la surexpression du récepteur adrénnergique  $\alpha$ 2A ADRA2A est associé à un risque accru de développer un DT2 (Rosengren et al., 2010). Nos résultats suggèrent que l'élimination de l'expression des récepteurs de la leptine dans les tanocytes peut entraîner une diminution de la sécrétion d'insuline qui peut s'expliquer par une surexpression des récepteurs adrénnergiques  $\alpha$ 2A. Dans l'ensemble, ces résultats combinent les lacunes dans notre compréhension du mécanisme d'action de la leptine:

- i) la leptine atteint les neurones dmARC par une voie impliquant le transport transcytique par les tanocytes d'éminence médiane. Ce transport dépend de l'activation d'un complexe LepR/EGFR et de la signalisation ERK.
- ii) la leptine stimule ensuite les neurones dmARH contrôlant le système mélanocortine et le tonus sympathique,
- iii) cela diminue le stockage des lipides dans le tissu adipeux et contrôle l'homéostasie du glucose en façonnant la fonction et la plasticité des cellules des îlots pancréatiques par la modulation de l'expression des récepteurs adrénnergiques. Pour appuyer ces propos, les altérations du transport tanocytaire de la leptine se manifestent par une diminution du tonus sympathique, une augmentation de l'adiposité viscérale, une stéatose hépatique et une intolérance au glucose avec dysfonction pancréatique.

Des études longitudinales menées chez l'Homme montrent que le diabète de type 2 (DT2) se développe chez des sujets présentant une hypersécrétion d'insuline en phase normoglycémique et prédiabétique afin de maintenir la glycémie près de la normale. Cela s'effectue souvent dans un contexte de surconsommation chronique de nutriments et d'insulinorésistance liée à l'obésité, jusqu'à atteindre un seuil auquel cette réponse cellulaire compensatoire  $\beta$  devient insoutenable (Prentki et Nolan, 2006). Pour compenser l'insulinorésistance, en augmentant la sécrétion d'insuline, il faut habituellement améliorer la fonction des cellules  $\beta$  et augmenter la masse cellulaire  $\beta$ , stimulée par l'apport accru en glucose et en acides gras libres (Steil et al., 2001). Cependant, le diabète est une maladie hétérogène (Tuomi et al., 2014), et un modèle alternatif caractérisé par l'altération de la sécrétion d'insuline due à un déficit fonctionnel pourrait prédominer dans certains groupes ethniques. Cette variabilité phénotypique a pu être observée dans une étude japonaise où la proportion de patients progressant vers l'apparition du DT2 était de 50 % chez les patients présentant un dysfonctionnement des cellules  $\beta$  isolées. En comparaison, cette proportion est de 14 % chez les patients présentant une insulinorésistance (Morimoto et al., 2013). Curieusement, dans une étude épidémiologique, des patients coréens atteints de DT2, ont développé une altération de la sécrétion d'insuline et une résistance à l'insuline, 10 ans avant l'apparition du diabète. Puis, ces mêmes patients ont présenté une altération de la compensation cellulaire  $\beta$  avec une diminution brusque de la sécrétion d'insuline au cours des 2 dernières années avant l'apparition du DT2 (Ohn et al., 2016). Cela met en évidence le rôle central du dysfonctionnement des cellules  $\beta$  dans la pathogenèse du DT2 dans les populations asiatiques. L'existence de deux schémas de progression de la maladie peut également être mise en évidence grâce au fait que les patients T2D d'Asie de l'Est présentent un IMC beaucoup plus bas que les patients européens, mais plus de graisse intra-abdominale pour des valeurs similaires (Yoon et al., 2006). Dans notre modèle animal, l'atténuation du transport tanyctaire de la leptine entraîne un déficit initial de sécrétion d'insuline. Douze semaines après la suppression sélective de LepR dans les tanyocytes d'éminence médiane, les souris LepR<sup>TanKO</sup> développent une altération de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, dans un contexte de graisse viscérale accrue mais de sensibilité normale à l'insuline. Cette altération de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, qui est potentiellement à la base de l'altération de l'homéostasie du glucose, peut être observée au niveau des îlots pancréatiques isolés sans aucun changement apparent dans leur taille ou leur organisation. Cela suggère plutôt une modification de l'intégrité fonctionnelle des cellules  $\beta$  qui imite le phénotype humain principal décrit ci-dessus.

## Etude 3 : Implication des endozépines centrales dans l'amélioration de phénotype d'obésité induit par un régime gras

Dans cette étude, nous avons montré que les endozépines sont exprimées par les cellules gliales, y compris les tanocytes, dans l'hypothalamus et le complexe vagal dorsal (DVC). Ces molécules y jouent un rôle dans le contrôle de la prise alimentaire en activant les voies anorexigènes centrales. Il est important de noter que l'action anorexigène des endozépines dépend strictement de la présence de leptine et est liée à l'activation STAT3. En regard de l'effet de la co-administration de l'OP et de leptine chez la souris ob/ob, l'OP semble exercer ses effets anorexigènes et anti-obésité en augmentant la sensibilité de la leptine par un mécanisme qui facilite le transport tanocytaire de la leptine du sang vers l'hypothalamus. En concordance avec cette hypothèse, l'élimination sélective des récepteurs à la leptine (LepR) dans les tanocytes estompe la phosphorylation STAT3 induite par l'OP dans l'hypothalamus.

### L'expression des endozépines gliales dans les structures liées à la prise alimentaire

Des études pionnières ont rapporté une distribution hétérogène de l'ARNm DBI dans le cerveau de rat, avec des niveaux d'expression plus élevés dans l'hypothalamus, les parois du troisième ventricule (3V), et l'area postrema (AP) (Alho *et al.*, 1988). L'immunohistochimie pour l'ODN couplée à la technique de microscopie électronique a confirmé son association avec les cellules gliales et épendymales (Tonon *et al.*, 1990). Nos résultats, combinant l'immunodétection de l'ODN et l'amplification de l'ARNm pour DBI dans le cerveau de la souris, sont cohérents avec ces résultats précédents et peuvent s'étendre jusqu'au tronc cérébral. Comme précédemment rapporté pour l'hypothalamus (Lanfrey *et al.*, 2013), l'expression gliale de l'ODN a été observée dans les astrocytes présents dans le noyau du tractus solitaire (NTS) et les cellules ressemblant à des tanocytes autour de l'AP. De façon intéressante, les taux d'ARNm pour DBI dans l'hypothalamus et le DVC sont réduits après un jeûne et sont normalisés après la réalimentation. Ces mêmes taux sont également réduits chez les souris passées sous régime gras (HFD) par rapport aux souris nourries au régime normal (NC). Ces résultats sont concordants avec l'effet anorexigène endogène des endozépines gliales, exprimé principalement par les tanocytes et les cellules de type « tanocyte » de l'hypothalamus et du DVC respectivement.

### Les circuits neuronaux impliqués dans l'anorexie induite par les endozépines

En effectuant une première analyse du schéma de prise alimentaire en réponse aux endozépines, nous avons montré que le traitement par l'ODN ou l'OP diminuait à la fois la taille des repas et le taux d'alimentation. Pourtant le ratio de satiété, un indicateur de satiété, était augmenté après le traitement à l'ODN. Ce profil suggère que l'ODN ou l'OP a inhibé la prise alimentaire par un mécanisme de contrôle de la taille des repas. Les injections d'OP n'ont pas modifié l'activité locomotrice aux moments où les effets anorexigènes de la molécule ont été observés. De ce fait, l'action anorexigène des endozépines ne peut pas être une simple conséquence d'une modification du niveau d'éveil, chez l'animal, par la modulation du signal GABA. De plus, l'OP n'a pas modifié la quantité de kaolin ingérée, excluant ainsi que l'effet anorexigène observé soit dû à l'induction de nausées chez l'animal (Seeley *et al.*, 2000) ; Yamamoto and Yamatodani, 2018). Jusqu'à présent, les structures centrales activées en réponse aux endozépines n'étaient que partiellement identifiées (Compère *et al.*, 2003). En utilisant l'immunomarquage c-Fos, nous avons révélé une activation cellulaire liée à l'OP au sein des noyaux du NTS-AP, du noyau arqué (ARC), du noyau paraventriculaire (PVN) et de l'hypothalamus ventro-médian (VMH). Ce schéma d'activation semble cohérent avec la réduction de la prise alimentaire induite par l'OP. Les neurones POMC sont des neurones anorexigènes connus pour avoir un impact sur l'homéostasie énergétique par

l'intermédiaire des récepteurs à l' $\alpha$ MSH/mélanocortine de type 3 et 4 (MCR<sub>3/4</sub>) (van Swieten *et al.*, 2014). Bloquer l'activité des MCR<sub>3/4</sub> supprime les effets anorexigènes des ODN (Matsuda *et al.*, 2007 ; Lanfray *et al.*, 2013). Étonnamment, seule une faible proportion des neurones POMC de l'ARC sont positifs au marquage c-Fos en réponse à une OP (6 %). D'autre part, des enregistrements de patch-clamp de cellules entières effectués sur des tranches d'hypothalamus ont révélé que l'application d'OP dans le bain, active une plus grande proportion significative de neurones POMC de l'ARC (environ 33% des neurones POMC testés). Plusieurs points pourraient expliquer cet écart apparent entre les résultats c-Fos et les résultats électrophysiologiques des neurones POMC de l'ARC. Il est bien admis que des discordances entre l'augmentation du marquage c-Fos et l'activation neuronale ont pu être observées dans certaines conditions. En effet, l'absence d'augmentation d'expression de c-Fos ne devrait pas automatiquement signifier que les neurones ne sont pas activés, puisque c-Fos est connu pour n'être induit que dans les neurones fortement activés (Dragunow and Faull, 1989). Par contre, l'immunohistochimie pSTAT3 a révélé une plus forte proportion de neurones POMC marqués dans l'ARC (20 %) que lors du marquage c-Fos, ce qui est plus compatible avec les résultats électrophysiologiques. Néanmoins, ces résultats, obtenus dans des conditions expérimentales différentes (*in vivo* vs *in vitro*), pourraient révéler la coexistence de mécanismes distincts. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en plus de la stimulation de la navette leptine tanycytique, mise en évidence dans le présent travail, l'OP pourrait également stimuler directement les neurones POMC. D'autant qu'il a déjà été rapporté que l'injection d'OP dans l'ARC avait entraîné une réduction de l'apport alimentaire (Lanfray *et al.*, 2013) et que Bouyakdan et ses collègues (Bouyakan *et al.*, 2019) ont récemment montré que l'ODN a activé sélectivement les neurones POMC de l'ARC sur des tranches hypothalamiques par le biais d'un récepteur à l'ODN couplé aux protéines G. A l'inverse, près de 30 % des neurones POMC dans le NTS expriment c-Fos après un traitement à l'OP. Il a récemment été démontré qu'une activation sélective aiguë des neurones POMC du NTS entraîne une réduction rapide et significative de la prise alimentaire, alors que les neurones POMC dans l'ARC ne modifient le comportement alimentaire qu'après une activation prolongée (Zhan *et al.*, 2013). Cependant, les neurones POMC de l'ARC ou du NTS ne représentent qu'une petite fraction des cellules dans lesquelles OP induit l'expression c-Fos. Ainsi, les résultats actuels suggèrent le recrutement de voies anorexigènes supplémentaires. La nesfatin-1, un peptide de 82 acides aminés exprimé dans diverses régions du cerveau, y compris les noyaux hypothalamiques et du tronc cérébral (Oh-I *et al.*, 2006 ; Bonnet *et al.*, 2009), présente un effet de diminution de la prise alimentaire (Shimizu *et al.*, 2009). Nous rapportons dans cette étude, que les neurones nesfatin-1 comprennent une proportion significative de cellules exprimant le c-Fos en réponse à l'OP, tant dans l'hypothalamus que dans le NTS. Cela suggère une contribution significative de ces neurones dans le phénotype de type anorexigénique induit par OP. De plus, les neurones au peptide proche du glucagon (GLP-1) du NTS sont fortement stimulés en réponse à l'OP. Il a été démontré que les neurones GLP-1 du NTS projettent leurs axones dans le PVN et activent directement les neurones nesfatin-1 dans le PVN pour limiter la prise alimentaire (Katsurada *et al.*, 2014). L'activation des récepteurs aux catécholamines A2/C2 par l'OP, constaté grâce à l'augmentation du co-marquage du Tyrosine hydrolase/c-Fos dans le NTS, pourrait transmettre à l'hypothalamus des renseignements sur l'alimentation associée à l'OP (c.-à-d. la glycémie ou le signal de satiété) provenant du NTS. En effet, on a rapporté que ces cellules catécholaminergiques médient les effets des variations de la glycémie sur la prise alimentaire et transmettent l'information sur l'alimentation du NTS aux structures du cerveau antérieur impliquées dans l'alimentation (Yettefti *et al.*, 1995). Dans leur ensemble, ces données appuient fortement l'hypothèse selon laquelle l'OP agit directement ou indirectement avec les réseaux neuronaux impliqués dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique. Cela peut expliquer, en partie, la modification de la taille et de la fréquence des repas. Enfin, une proportion

importante d'astrocytes et de tanocytes entourant les 3V et 4V semble être activée après l'injection de l'OP. Ces résultats corroborent des études *in vitro* antérieures montrant que l'ODN et l'OP peuvent agir comme facteurs contrôlant l'activité des cellules astrogliales (Gandolfo *et al.*, 1997 ; Lamacz *et al.*, 1996 ; Leprince *et al.*, 1998).

### Les endozépines comme agents augmentant la sensibilité à la leptine

L'une des principales conclusions de la présente étude est l'absence d'hypophagie induite par l'OP chez les souris *ob/ob* déficientes en leptine, à la suite d'un traitement aigu ou chronique. Cela suggère que l'action des endozépines nécessite la présence de la leptine circulante. La signalisation intracellulaire de la leptine implique la voie JAK/STAT après la phosphorylation et la translocation nucléaire de STAT3. Par conséquent, la perturbation du site de fixation STAT3 sur LepR (Bates *et al.*, 2003) ou la suppression de l'expression neuronale de STAT3 (Gao *et al.*, 2004) entraîne une hyperphagie et une obésité graves. Dans cette étude, nous montrons que l'OP induit pSTAT3 dans les neurones des souris ARC, VMH et du NTS chez les souris sauvages (WT) mais pas chez les souris *ob/ob*, qui présentent une mutation sur le gène codant pour la leptine. De plus, l'expression c-Fos induite par l'OP s'est avérée absente chez les souris *ob/ob*. Grâce à la co-injection d'OP et de faibles doses de leptine chez des souris *ob/ob*, nous avons démontré que l'OP potentialise l'effet de la leptine sur la réduction de la consommation alimentaire et sur la perte de poids. Les effets anorexigènes de l'OP, chez la souris WT, peuvent être bloqués par l'injection périphérique de l'antagoniste de la leptine SLAN. Dans l'ensemble, nos données sous-entendent une interaction entre les endozépines et la leptine endogène. De manière intéressante, il a récemment été rapporté que l'action anorexigène de l'injection intrapéritonéale de leptine est atténuée par l'inhibition pharmacologique du récepteur métabolotrope aux endozépines (Lanfray *et al.*, 2016). Les souris soumises au régime gras, hyperleptinémiques, présentent une sensibilité accrue aux effets anorexigènes aigus anorexiques aigus de l'OP, par rapport aux souris nourries par NC. Cela suggère que l'OP facilite l'accès de la leptine circulante aux circuits neuronaux régulant l'alimentation, un processus où les tanocytes peuvent agir comme un pivot (Prevot *et al.*, 2018). Les tanocytes de l'éminence médiane (EM) expriment des LepR fonctionnels et fonctionnent comme une navette pour la leptine entre le sang et le liquide céphalorachidien (LCR) grâce à un processus dépendant de la signalisation ERK (Balland *et al.*, 2014). Cette voie est altérée chez les individus présentant une résistance périphérique à la leptine, caractéristique bien connue de l'obésité diététique (Myers *et al.*, 2008) et associée à une réduction du transport de la leptine dans le cerveau (Caro *et al.*, 1996 ; El Haschimi *et al.*, 2000 ; Schwartz *et al.*, 1996). Toutefois, le transport tanocytaire de la leptine a pu être restauré, chez des animaux obèses, par l'activation de la phosphorylation de ERK dans les tanocytes par des voies alternatives de signalisation (Balland *et al.*, 2014). Comme précédemment décrit dans les astrocytes (Hamdi *et al.*, 2012), nos données montrent que l'OP favorise l'activation ERK dans les tanocytes cultivés. Nos expériences *in vivo* montrent également que le traitement à l'OP augmente l'accès de la leptine fluorescente injectée dans la circulation à l'hypothalamus. De plus, l'élimination sélective des LepR dans les tanocytes entrave l'activation de STAT3 dans l'hypothalamus par l'OP. Dans l'ensemble, nos données suggèrent fortement que l'OP médit ses effets sur l'homéostasie énergétique en activant le transport de la leptine par les tanocytes, dépendant de ERK. Il est intéressant de noter que Maniscalco et Rinaman (Maniscalco and Rinaman, 2014) ont observé une sensibilité différentielle de l'activation STAT3 en réponse à la leptine dans l'ARC, le VMH et le NTS. Selon ces données, l'ARC présente une sensibilité à la leptine plus élevée que le NTS ou le VMH. Le marquage pSTAT3 maximal est obtenu après une dose relativement faible de leptine (50 µg/kg). De plus, sa réponse à la leptine est soumise à saturation dans une plage correspondante aux taux plasmatiques endogènes de leptine (c.-à-d. de 10 à 130 µg/kg ; Campfield *et al.*, 1995). Sur la base de nos données, il est tentant de spéculer que les endozépines pourraient moduler la sensibilité de la

leptine dans l'ARC en réponse à l'alimentation en augmentant le transport tanyctaire de la leptine (Balland et al., 2014 ; Balland and Cowley, 2015) et en régulant l'expression du LepRb dans l'hypothalamus (Baskin et al., 1998). Comme on l'a récemment proposé pour les astrocytes (Garcia-Caceres et al., 2019), l'intégration de signaux énergétiques dans les tanyctes pourrait donc jouer un rôle actif dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Figure 13). La question de savoir si des mécanismes semblables existent également dans le cadre du NTS et du 4V ne peut pas être exclue puisque les cellules de type tanycte de l'AP expriment également les LepR (Dallaporta et al., 2009), ainsi que les transcrits de DBI. De plus, Bouyakdan et ses collaborateurs (Bouyakan et al., 2019) ont récemment démontré que la suppression de la DBI dans les astrocytes favorisait l'hyperphagie et l'obésité d'origine alimentaire chez la souris. Ceci renforce l'idée que les peptides apparentés au DBI agissent comme des gliotransmetteurs pour moduler le bilan énergétique.

En résumé, nos données indiquent que les niveaux d'expression des endozépines gliales dépendent de l'état nutritionnel et ne sont pas régulés pendant l'obésité. Le traitement aux endozépines exogènes exerce un effet anorexigène par un mécanisme dépendant de la leptine. Nos données suggèrent également que les tanyctes et les cellules ressemblant à des tanyctes du tronc cérébral sont des sources majeures d'endozépines gliales. De plus, l'expression et la libération d'endozépines tanyctaires peuvent être particulièrement élevées lors d'une poussée de glucose et d'insuline suite à l'ingestion d'aliments puisque nous avons démontré que l'insuline induit la production de transcriptions DBI et que le glucose et l'insuline déclenchent de façon synergétique la libération de ODN par les tanyctes.

## Discussion sur les résultats supplémentaires

Intervenir sur le transport tanyctaire en exprimant, de façon spécifique, la neurotoxine botulique de sérotype B dans les tanyctyes (souris *BoNTB<sup>Tan</sup>*) donne des résultats phénotypiques similaires au modèle murin utilisé dans l'étude 2 (souris *LepR<sup>TanKO</sup>*) concernant la prise alimentaire, la libération de catécholamines, la tolérance à la leptine ainsi que l'activation de p-STAT3 en condition post-prandiales basales. De plus, les animaux *BoNTB<sup>Tan</sup>* semblent également être plus sensibles au régime gras, grossissant plus rapidement que les témoins de la même portée. Ces résultats nous amène à suggérer que le transport de la leptine par les tanyctyes soit dépendant de la voie d'exocytose dépendante. Nous avons également observé des perturbations de l'homéostasie du glucose associés à des modifications pancréatiques. Toutefois, certaines différences ont été observées au niveau de la sécrétion d'insuline et de la résistance à l'insuline, soulignant une divergence entre l'incapacité de sécréter de l'insuline chez les souris *LepR<sup>TanKO</sup>* et la capacité augmentée de sécréter de l'insuline face à un certain degré de résistance à l'insuline dans le modèle *BoNTB<sup>Tan</sup>*. Alors que chez les souris *LepR<sup>TanKO</sup>*, les modifications génétiques ne résultent qu'en l'absence des LepR n'affectant, à priori, que l'activité de la leptine sur les tanyctyes, chez les souris *BoNTB<sup>Tan</sup>*, la recombinaison a probablement un impact sur le transport général de plusieurs hormones métaboliques dont la leptine. Le modèle *LepR<sup>TanKO</sup>* empiète sur la fonction intrinsèque des cellules β pancréatiques qui ne sont pas capables de sécréter de l'insuline lors de la charge de glucose. Le modèle *BoNTB<sup>Tan</sup>*, a favorisé le développement de l'insulinorésistance qui est associée à une capacité de sécrétion d'insuline exacerbée même dans les îlots isolés. Par conséquent, on aurait pu s'attendre à ce que les souris *BoNTB<sup>Tan</sup>* présentent des altérations plus prononcées que les souris *LepR<sup>TanKO</sup>*, au niveau des fonctions pancréatiques. Cependant, le phénotype des souris *BoNTB<sup>Tan</sup>* et *LepR<sup>TanKO</sup>* est similaire au niveau de l'intolérance au glucose, suggérant que l'apparition de certains mécanismes compensatoires, probablement dus au blocage du transport tanyctaire d'autres hormones. Une diminution du transport dans l'hypothalamus d'hormones délétères comme par exemple la résistance adipokine ([Muse et al., 2007](#)) ou les cytokines inflammatoires pourrait éventuellement limiter l'altération de l'homéostasie du glucose. De plus, chez les souris *BoNTB<sup>Tan</sup>*, une altération potentielle du transport de l'insuline dans l'ARC pourrait atténuer la signalisation de l'insuline et réduire la sensibilité des neurones de l'ARC à l'hormone et entraîner une résistance générale à l'insuline, comme on l'a observé chez les souris *BoNTB<sup>Tan</sup>*.



# CONCLUSIONS & PERSPECTIVES



Grâce au modèle animal BoNTB<sup>Tan</sup> nous avons pu démontrer que la perturbation de la voie d'exocytose dépendante des protéines VAMP1-3 spécifiquement dans les tanocytes entraîne des perturbations métaboliques visibles. Cela suggère ce mécanisme de sécrétion dans les tanocytes hypothalamiques joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme énergétique. Toutefois, perturber un mécanisme aussi général est susceptible d'affecter le transport de multiples signaux simultanément et donc plusieurs fonctions métaboliques. Ces résultats ouvrent néanmoins de nouvelles perspectives concernant l'implication de la voie de transport et de sécrétion tanycytaires dans le cadre d'autres molécules pour atteindre dans l'hypothalamus médiobasal, ce qui justifie des recherches supplémentaires. Nous avons donc choisi d'explorer les mécanismes impliqués dans le transport par les tanocytes d'une hormone en particulier: la leptine. Pour cela nous avons choisi d'affecter l'expression de ses récepteurs spécifiques dans les tanocytes.

L'étude de notre modèle murin LepR<sup>TanKO</sup> semble avoir mis en évidence des mécanismes moléculaires et cellulaires comme la collaboration étroite entre LepR-EGFR-ERK dans le transport transcytique de la leptine circulante dans l'hypothalamus par les tanocytes, régulant l'accès physiologique de la leptine aux neurones sensibles à la leptine dans le cerveau. La perturbation du transport de la leptine par les tanocytes a été décrite comme étant un facteur pouvant intervenir dans le développement de l'obésité et de la résistance à la leptine. Le fait que ce transport peut être amélioré grâce à l'injection chronique d'EGF ([Balland et al., 2014](#)) concorde bien avec nos résultats. Toutefois, certaines études montrent que le transport de la leptine exogène à l'hypothalamus semble tout à fait fonctionnel après des temps d'exposition au régime gras conséquents (20 jours pour [Kleinert et al., 2019](#) ; 20 semaines pour [Harrison et al., 2019](#)). Il est important de rappeler qu'il y a une différence entre le transport de la leptine endogène et exogène et que ce dernier peut occulter le premier. De plus, nous n'avons que trop peu d'informations concernant la plasticité des structures cérébrales impliquées dans le transport de la leptine, dont l'hypothalamus et l'EM, au cours de l'exposition à un régime gras. Des données non publiées collectées au sein du laboratoire suggèrent que l'exposition au régime gras peut affecter le nombre de vaisseaux fenestrés dans l'éminence médiane ainsi que l'organisation des jonctions serrées au niveau des parois du 3V qui font face à l'ARC, quand l'animal est mis à jeun. Ce mécanisme pourrait permettre aux signaux métaboliques de diffuser plus facilement dans l'ARC. Puisque nous avons vu que le régime maternel intervient dans la plasticité de la barrière de l'EM de la descendance, il est donc plausible de penser que le régime alimentaire puisse également la modifier au cours de la vie. Notre modèle LepR<sup>TanKO</sup> nous a permis d'évaluer l'impact de l'expression des LepR dans les tanocytes sur le transport de l'hormone vers l'hypothalamus sans intervention d'un régime riche en graisses et des potentielles conséquences associées (inflammation centrale et périphérique, perturbation de la physiologie globale et éventuels mécanismes de compensation mis en place).

L'état de phosphorylation de STAT3 basal dans l'ARC des souris LepR<sup>TanKO</sup> montre que l'expression des LepR dans les tanocytes ne perturbe pas significativement l'accès de la leptine aux cellules de la vmARC. La présence de projections neuronales, dont les corps cellulaires proviennent de cette zone, vers les vaisseaux fenestrés suggère que ces neurones ont un accès direct aux signaux circulants. Par contre l'accès de la leptine au niveau des neurones du dmARC semble dépendre de l'expression des LepR dans les tanocytes. Au vu du phénotype métabolique de nos animaux et de celui des souris chez qui on a réduit l'expression des LepR dans les vaisseaux et plexus choroïdes ([Di Spiezio et al., 2018](#)), ces résultats suggèrent que l'action de la leptine, sur la partie ventrale de l'ARC, pourrait intervenir majoritairement sur la sensibilité à la récompense. L'activité de la leptine sur partie dorsomédiane de l'ARC pourrait, quant à elle, jouer un rôle préférentiel dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Ce processus de transport dépendant de l'expression des LepR tanycytaires, semble nécessaire au contrôle central du métabolisme lipidique périphérique et de

l'homéostasie du glucose. Notre étude montre également un lien entre le transport tanyctaire déficient de la leptine et la pathophysiologie de l'insuffisance cellulaire pancréatique, dans un contexte non-obèse. Tout comme dans l'étude de Geller et ses collaborateurs, notre travail suggère que les tanyctes sont des relais importants dans la communication entre la périphérique et le cerveau dans le cadre de la régulation du métabolisme énergétique (Geller et al., 2019).

Toutefois, le phénotype métabolique observé dans le modèle LepR<sup>TanKO</sup> est plus faible que celui d'un db/db suggérant que l'expression des LepRb dans les tissus périphériques et/ou au cours du développement est d'une grande importance dans la régulation du métabolisme énergétique. Nous n'avons également retrouvé qu'une partie du phénotype des animaux qui présentent une délétion des LepR dans les neurones NPY/AgRP et POMC (van de Wall et al., 2008). Une explication possible serait que nous ne constatons que la recombinaison induite par l'injection de TAT-Cre dans le 3V n'affecte que 60% des tanyctes de l'éminence médiane, laissant à la leptine une possibilité réduite d'accès.

Enfin, nous avons constaté que l'expression des LepR dans les tanyctes semble être essentiel à l'activité des endozépines comme l'OP dans l'hypothalamus. En suggérant que l'OP puisse faciliter le transport de la leptine vers ses cibles neuronales, le bon fonctionnement de l'expression des LepR dans les tanyctes semble être un facteur à prendre en considération dans le cadre du développement de thérapies impliquant les endozépines.

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes impliqués dans le transport des signaux périphériques par les tanyctes, voici nos principales perspectives concernant **l'étude du rôle des récepteurs à la leptine dans les tanyctes** :

- Afin de confirmer que le phénotype observé au sein des tissus périphériques des animaux LepR<sup>TanKO</sup> est bien associé à une perte du transport de la leptine jusqu'au neurones cibles de l'hypothalamus, nous souhaiterions vérifier si ce dernier peut être renversé par l'administration centrale de leptine. Pour cela, nous évaluerions le phénotype de nos animaux avant d'injecter de la leptine en i.c.v (injection aiguë). Les animaux devraient pouvoir améliorer leur tolérance au glucose et/ou leur sécrétion d'insuline et/ou leur concentration sanguine en noradrénaline.
- Evaluer la cinétique de développement du phénotype. Pour ce qui est de la dysfonction pancréatique, nous nous focalisés dans un premier temps à 12 semaines, au moment où le phénotype est le plus marqué. Nous prévoyons donc de refaire les expériences menées sur le pancréas, 4 semaines après la recombinaison. Ainsi, nous pourrions comprendre les mécanismes impliquées dans l'hypersécrétion d'insuline et comparer les changements observés dans l'expression des gènes entre 4 et 12 semaines après recombinaison.
- Visualiser la perte de transport de la leptine dans notre modèle animal. Pour cela, nous effectuons des mises au point à propos de l'injection de leptine fluorescente chez nos modèles. Ainsi nous prévoyons d'injecter cette molécule, chez nos animaux, en intraveineuse et de comparer le transport de cette molécule entre les animaux traités à la TAT-Cre et leur contrôles.
- Vérifier si la diminution du tonus sympathique est bien à l'origine du phénotype observé dans tous les tissus étudiés (augmentation de l'accumulation des lipides dans le tissu adipeux et le foie, dysfonctionnement du pancréas). Pour cela, un marquage des tissus avec un anticorps dirigé contre la Tyrosine hydrolase est envisagé.

- Suite à la baisse d'activation pSTAT3 dans le modèle LepR<sup>TanKO</sup> après injection d'OP en i.c.v, il serait intéressant d'observer le phénotype associé à l'administration centrale de l'OP sur le métabolisme énergétique du modèle et ses contrôles. Ainsi, nous pourrions évaluer la part d'implication du transport de la leptine dans l'action anorexigène de l'OP.

Enfin voici les principales perspectives concernant **l'étude du mécanisme d'exocytose dépendante des VAMP1-3 :**

- Procéder à l'étude de la cinétique de développement du phénotype d'hypersécrétion de l'insuline par les pancréas des animaux *BoNTB*<sup>Tan</sup>. Pour cela, nous allons refaire les expériences sur les îlots pancréatiques isolés mais à des temps plus courts que celui étudié ici (12 semaines après recombinaison). La comparaison des résultats obtenus à ceux du modèle de l'étude 2 (LepR<sup>TanKO</sup>) nous permettra peut-être d'évaluer ce qui est dépendant de la leptine et des autres hormones ou signaux.
- Evaluer la tolérance des animaux *BoNTB*<sup>Tan</sup> à d'autres hormones métaboliques périphériques comme la ghréline.
- Observer si l'injection i.c.v de la leptine ou la ghréline ou l'insuline chez les *BoNTB*<sup>Tan</sup> permet de restaurer le phénotype. L'injection i.c.v permet de contourner le transport tanyctaire. L'amélioration d'un des paramètres métaboliques grâce cette injection suggérera l'implication du transport tanyctaire de la molécule injectée dans le processus.



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53.
- Adair, L., and Dahly, D. (2005). Developmental determinants of blood pressure in adults. *Annu. Rev. Nutr.* 25, 407–434.
- Agnew, W.F., Alvarez, R.B., Yuen, T.G., and Crews, A.K. (1980). Protein synthesis and transport by the rat choroid plexus and ependyma: an autoradiographic study. *Cell Tissue Res.* 208, 261–281.
- Ahima, R.S. (2005a). Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 307–313.
- Ahima, R.S., and Flier, J.S. (2000). Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 327–332.
- Ahima, R.S., and Flier, J.S. (2000). Leptin. *Annu Rev Physiol* 62, 413–437.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382, 250–252.
- Akiyoshi, H., Gonda, T., and Terada, T. (1998). A comparative histochemical and immunohistochemical study of aminergic, cholinergic and peptidergic innervation in rat, hamster, guinea pig, dog and human livers. *Liver* 18, 352–359.
- Aleshire, S.L., Hajdu, I., Bradley, C.A., and Parl, F.F. (1985). Choroid plexus as a barrier to immunoglobulin delivery into cerebrospinal fluid. *J. Neurosurg.* 63, 593–597.
- Allison, M.B., Patterson, C.M., Krashes, M.J., Lowell, B.B., Myers, M.G., and Olson, D.P. (2015). TRAP-seq defines markers for novel populations of hypothalamic and brainstem LepR<sup>b</sup> neurons. *Mol Metab* 4, 299–309.
- Alasio J, Olszewski PK, Levine AS, Schiøth HB (2012): Feed-forward mechanisms: Addiction-like behavioral and molecular adaptations in overeating. *Front Neuroendocrinol* 33:127–139.
- Andersson, U., Filipsson, K., Abbott, C.R., Woods, A., Smith, K., Bloom, S.R., Carling, D., and Small, C.J. (2004). AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J. Biol. Chem.* 279, 12005–12008.
- Andrews, Z.B., Liu, Z.-W., Wallingford, N., Erion, D.M., Borok, E., Friedman, J.M., Tschöp, M.H., Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G.I., et al. (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454, 846–851.
- Annicotte, J.-S., Blanchet, E., Chavey, C., Iankova, I., Costes, S., Assou, S., Teyssier, J., Dalle, S., Sardet, C., and Fajas, L. (2009). The CDK4-pRB-E2F1 pathway controls insulin secretion. *Nat. Cell Biol.* 11, 1017–1023.
- Aponte, Y., Atasoy, D., and Sternson, S.M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 14, 351–355.
- Armulik, A., Genové, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev. Cell* 21, 193–215.
- Arvidsson, U., Riedl, M., Elde, R., and Meister, B. (1997). Vesicular acetylcholine transporter (VAcChT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J. Comp. Neurol.* 378, 454–467.

- Auriau, J., Roujeau, C., Belaid Choucair, Z., Oishi, A., Derviaux, C., Roux, T., Trinquet, E., Hermine, O., Jockers, R., and Dam, J. (2018). Gain of affinity for VEGF165 binding within the VEGFR2/NRP1 cellular complex detected by an HTRF-based binding assay. *Biochem Pharmacol* 158, 45-59.
- Ayus, J.C., Achinger, S.G., and Arief, A. (2008). Brain cell volume regulation in hyponatremia: role of sex, age, vasopressin, and hypoxia. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 295, F619–F624.
- Bacart, J., Leloire, A., Levoye, A., Froguel, P., Jockers, R., and Couturier, C. (2010). Evidence for leptin receptor isoforms heteromerization at the cell surface. *FEBS Lett.* 584, 2213–2217.
- Back, S.H., and Kaufman, R.J. (2012). Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem* 81, 767-793.
- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., et al. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature* 394, 790–793.
- Ballard, E., Chen, W., Tiganis, T., and Cowley, M.A. (2019). Persistent leptin signalling in the arcuate nucleus impairs hypothalamic insulin signalling and glucose homeostasis in obese mice. *Neuroendocrinology*.
- Ballard, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., et al. (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab.* 19, 293–301.
- Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S.M., Lee, C.E., Tang, V., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Chua, S.C., Jr., Elmquist, J.K., et al. (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* 42, 983-991.
- Balthasar, N., Dalgaard, L.T., Lee, C.E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R.A., Kenny, C.D., et al. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123, 493–505.
- Banizs, B., Pike, M.M., Millican, C.L., Ferguson, W.B., Komlosi, P., Sheetz, J., Bell, P.D., Schwiebert, E.M., and Yoder, B.K. (2005). Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus. *Development* 132, 5329–5339.
- Banks, W.A. (2019). The blood-brain barrier as an endocrine tissue. *Nat Rev Endocrinol* 15, 444-455.
- Barker, D.J. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 301, 1111.
- Baroncini, M., Allet, C., Leroy, D., Beauvillain, J.-C., Francke, J.-P., and Prevot, V. (2007). Morphological evidence for direct interaction between gonadotrophin-releasing hormone neurones and astroglial cells in the human hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 19, 691–702.
- Barrett, P., Ivanova, E., Graham, E.S., Ross, A.W., Wilson, D., Plé, H., Mercer, J.G., Ebling, F.J., Schuhler, S., Dupré, S.M., et al. (2006). Photoperiodic regulation of cellular retinol binding protein, CRBP1 [corrected] and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J. Endocrinol.* 191, 687–698.
- Bartness, T.J., Kay Song, C., Shi, H., Bowers, R.R., and Foster, M.T. (2005). Brain-adipose tissue cross talk. *Proc Nutr Soc* 64, 53–64.
- Bartness, T.J., Vaughan, C.H., and Song, C.K. (2010). Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 34 Suppl 1, S36-42.

- Baskin, D.G., Breininger, J.F., and Schwartz, M.W. (1999). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* **48**, 828–833.
- Batailler, M., Derouet, L., Butruille, L., and Migaud, M. (2016). Sensitivity to the photoperiod and potential migratory features of neuroblasts in the adult sheep hypothalamus. *Brain Struct Funct* **221**, 3301–3314.
- Bates, S.H., Dundon, T.A., Seifert, M., Carlson, M., Maratos-Flier, E., and Myers, M.G. (2004). LRb-STAT3 signaling is required for the neuroendocrine regulation of energy expenditure by leptin. *Diabetes* **53**, 3067–3073.
- Bates, S.H., Kulkarni, R.N., Seifert, M., and Myers, M.G. (2005). Roles for leptin receptor/STAT3-dependent and -independent signals in the regulation of glucose homeostasis. *Cell Metab.* **1**, 169–178.
- Bates, S.H., Stearns, W.H., Dundon, T.A., Schubert, M., Tso, A.W.K., Wang, Y., Banks, A.S., Lavery, H.J., Haq, A.K., Maratos-Flier, E., et al. (2003). STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* **421**, 856–859.
- Bechtold, D.A., Sidibe, A., Saer, B.R.C., Li, J., Hand, L.E., Ivanova, E.A., Darras, V.M., Dam, J., Jockers, R., Luckman, S.M., et al. (2012). A role for the melatonin-related receptor GPR50 in leptin signaling, adaptive thermogenesis, and torpor. *Curr. Biol.* **22**, 70–77.
- Begley, D. (2004). ABC Transporters and the Blood-Brain Barrier. *Current Pharmaceutical Design* **10**, 1295–1312.
- Begley, D.J., and Brightman, M.W. (2003). Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Prog Drug Res* **61**, 39–78.
- Bélanger, M., Allaman, I., and Magistretti, P.J. (2011). Differential effects of pro- and anti-inflammatory cytokines alone or in combinations on the metabolic profile of astrocytes. *J. Neurochem.* **116**, 564–576.
- Bellefontaine, N., Chachlaki, K., Parkash, J., Vanacker, C., Colledge, W., d'Anglemont de Tassigny, X., Garthwaite, J., Bouret, S.G., and Prevot, V. (2014). Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *Journal of Clinical Investigation* **124**, 2550–2559.
- Bence, K.K., Delibegovic, M., Xue, B., Gorgun, C.Z., Hotamisligil, G.S., Neel, B.G., and Kahn, B.B. (2006). Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action. *Nat. Med.* **12**, 917–924.
- Benford, H., Bolborea, M., Pollatzek, E., Lossow, K., Hermans-Borgmeyer, I., Liu, B., Meyerhof, W., Kasparov, S., and Dale, N. (2017). A sweet taste receptor-dependent mechanism of glucosensing in hypothalamic tanycytes. *Glia* **65**, 773–789.
- Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.* **22**, 9048–9052.
- Berger, U.V., and Hediger, M.A. (2001). Differential distribution of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in tanycytes of the third ventricle. *J. Comp. Neurol.* **433**, 101–114.
- Berglund, E.D., Liu, T., Kong, X., Sohn, J.-W., Vong, L., Deng, Z., Lee, C.E., Lee, S., Williams, K.W., Olson, D.P., et al. (2014). Melanocortin 4 receptors in autonomic neurons regulate thermogenesis and glycemia. *Nat. Neurosci.* **17**, 911–913.

- Berglund, E.D., Vianna, C.R., Donato, J., Jr., Kim, M.H., Chuang, J.C., Lee, C.E., Lauzon, D.A., Lin, P., Brule, L.J., Scott, M.M., et al. (2012). Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J Clin Invest* 122, 1000–1009.
- Berthoud HR (2012): The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. *Proc Nutr Soc* 71:478–487.
- Berthoud, H.R., and Jeanrenaud, B. (1979). Acute hyperinsulinemia and its reversal by vagotomy after lesions of the ventromedial hypothalamus in anesthetized rats. *Endocrinology* 105, 146–151.
- Berthoud, H.-R., and Morrison, C. (2008). The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol* 59, 55–92.
- Betley, J.N., Cao, Z.F.H., Ritola, K.D., and Sternson, S.M. (2013). Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell* 155, 1337–1350.
- Bhaskar, V., Goldfine, I.D., Gerstner, R., Michelson, K., Tran, C., Nonet, G., Bohmann, D., Pongo, E., Zhao, J., Horwitz, A.H., et al. (2016). An allosteric antibody to the leptin receptor reduces body weight and reverses the diabetic phenotype in the Lep(ob) /Lep(ob) mouse. *Obesity (Silver Spring)* 24, 1687–1694.
- Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., and Larsen, P.R. (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23, 38–89.
- Bjørbaek, C., El-Haschimi, K., Frantz, J.D., and Flier, J.S. (1999). The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J. Biol. Chem.* 274, 30059–30065.
- Bjørbaek, C., Elmquist, J.K., Michl, P., Ahima, R.S., van Bueren, A., McCall, A.L., and Flier, J.S. (1998). Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* 139, 3485–3491.
- Blanchet, E., Annicotte, J.-S., Lagarrigue, S., Aguilar, V., Clapé, C., Chavey, C., Fritz, V., Casas, F., Apparailly, F., Auwerx, J., et al. (2011). E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat. Cell Biol.* 13, 1146–1152.
- Bolborea, M., Laran-Chich, M.-P., Rasri, K., Hildebrandt, H., Govitrapong, P., Simonneaux, V., Pévet, P., Steinlechner, S., and Klosen, P. (2011). Melatonin controls photoperiodic changes in tanyocyte vimentin and neural cell adhesion molecule expression in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 152, 3871–3883.
- Borg, M.A., Sherwin, R.S., Borg, W.P., Tamborlane, W.V., and Shulman, G.I. (1997). Local ventromedial hypothalamus glucose perfusion blocks counterregulation during systemic hypoglycemia in awake rats. *J. Clin. Invest.* 99, 361–365.
- Boulant, J.A., and Hardy, J.D. (1974). The effect of spinal and skin temperatures on the firing rate and thermosensitivity of preoptic neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 240, 639–660.
- Bouret, S., and Richmond, B.J. (2015). Sensitivity of locus ceruleus neurons to reward value for goal-directed actions. *J. Neurosci.* 35, 4005–4014.
- Bouret, S.G., Bates, S.H., Chen, S., Myers, M.G., and Simerly, R.B. (2012). Distinct roles for specific leptin receptor signals in the development of hypothalamic feeding circuits. *J. Neurosci.* 32, 1244–1252.
- Bouret, S.G., Draper, S.J., and Simerly, R.B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304, 108–110.

- Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnürch, H., Gotsch, U., Vestweber, D., Risau, W., and Dejana, E. (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* 87, 630–641.
- Brightman, M.W., and Reese, T.S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* 40, 648–677.
- Brito, M.N., Brito, N.A., Baro, D.J., Song, C.K., and Bartness, T.J. (2007). Differential activation of the sympathetic innervation of adipose tissues by melanocortin receptor stimulation. *Endocrinology* 148, 5339–5347.
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., and Hökfelt, 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.
- Buettner, C., Muse, E.D., Cheng, A., Chen, L., Scherer, T., Pocai, A., Su, K., Cheng, B., Li, X., Harvey-White, J., et al. (2008). Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med* 14, 667–675.
- Buettner, C., Pocai, A., Muse, E.D., Etgen, A.M., Myers, M.G., Jr., and Rossetti, L. (2006). Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell Metab* 4, 49–60.
- Buijs, R.M., Chun, S.J., Niijima, A., Romijn, H.J., and Nagai, K. (2001). Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J. Comp. Neurol.* 431, 405–423.
- Bulat, M., and Klarica, M. (2011). Recent insights into a new hydrodynamics of the cerebrospinal fluid. *Brain Res Rev* 65, 99–112.
- Burcelin, R., Uldry, M., Foretz, M., Perrin, C., Dacosta, A., Nenniger-Tosato, M., Seydoux, J., Cotecchia, S., and Thorens, B. (2004). Impaired glucose homeostasis in mice lacking the alpha1b-adrenergic receptor subtype. *J. Biol. Chem.* 279, 1108–1115.
- Butler, A.A., Marks, D.L., Fan, W., Kuhn, C.M., Bartolome, M., and Cone, R.D. (2001). Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nat. Neurosci.* 4, 605–611.
- Butt, A.M., Jones, H.C., and Abbott, N.J. (1990). Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J. Physiol. (Lond.)* 429, 47–62.
- Cabot, J. (1990). Sympathetic preganglionic neurons: cytoarchitecture, ultrastructure, and biophysical properties. *Central Regulation of Autonomic Function*.
- Cakir, I., Cyr, N.E., Perello, M., Litvinov, B.P., Romero, A., Stuart, R.C., and Nilini, E.A. (2013). Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing. *J. Biol. Chem.* 288, 17675–17688.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92–96.
- Campos, Y., Qiu, X., Gomero, E., Wakefield, R., Horner, L., Brutkowski, W., Han, Y.-G., Solecki, D., Frase, S., Bongiovanni, A., et al. (2016). Alix-mediated assembly of the actomyosin-tight junction polarity complex preserves epithelial polarity and epithelial barrier. *Nat Commun* 7, 11876.
- Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol. Rev.* 84, 277–359.

- Cannon, W.B. (1929). ORGANIZATION FOR PHYSIOLOGICAL HOMEOSTASIS. *Physiological Reviews* 9, 399–431.
- Cannon, W.B., and Washburn, A.L. (1993). An explanation of hunger. 1911. *Obes. Res.* 1, 494–500.
- Cao, W.-H., and Morrison, S.F. (2006). Glutamate receptors in the raphe pallidus mediate brown adipose tissue thermogenesis evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. *Neuropharmacology* 51, 426–437.
- Cardinal, P., André, C., Quarta, C., Bellocchio, L., Clark, S., Elie, M., Leste-Lasserre, T., Maitre, M., Gonzales, D., Cannich, A., et al. (2014). CB1 cannabinoid receptor in SF1-expressing neurons of the ventromedial hypothalamus determines metabolic responses to diet and leptin. *Mol Metab* 3, 705–716.
- Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K., and Considine, R.V. (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348, 159–161.
- Caron, A., Dungan Lemko, H.M., Castorena, C.M., Fujikawa, T., Lee, S., Lord, C.C., Ahmed, N., Lee, C.E., Holland, W.L., Liu, C., et al. (2018). POMC neurons expressing leptin receptors coordinate metabolic responses to fasting via suppression of leptin levels. *Elife* 7.
- Caron, A., Lee, S., Elmquist, J.K., and Gautron, L. (2018). Leptin and brain-adipose crosstalks. *Nat Rev Neurosci* 19, 153–165.
- Caron, E., Sachot, C., Prevot, V., and Bouret, S.G. (2010). Distribution of leptin-sensitive cells in the postnatal and adult mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology* 518, 459–476.
- Carreño, F.R., and Seelaender, M.C.L. (2004). Liver denervation affects hepatocyte mitochondrial fatty acid transport capacity. *Cell Biochem. Funct.* 22, 9–17.
- Carrion, E., Hertzog, J.H., Medlock, M.D., Hauser, G.J., and Dalton, H.J. (2001). Use of acetazolamide to decrease cerebrospinal fluid production in chronically ventilated patients with ventriculopleural shunts. *Arch. Dis. Child.* 84, 68–71.
- Casanueva, F.F., and Dieguez, C. (1999). Neuroendocrine regulation and actions of leptin. *Front Neuroendocrinol* 20, 317–363.
- Cedernaes J, Schioth HB, Benedict C. Determinants of shortened, disrupted, and mistimed sleep and associated metabolic health consequences in healthy humans. *Diabetes* 2015; 64:1073–1080.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2004). Trends in intake of energy and macronutrients—United States, 1971–2000. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 53, 80–82.
- Chachlaki, K., Garthwaite, J., and Prevot, V. (2017). The gentle art of saying NO: how nitric oxide gets things done in the hypothalamus. *Nature Reviews Endocrinology* 13, 521–535.
- Chaker, Z., Codega, P., and Doetsch, F. (2016). A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5, 640–658.
- Chakravarty, S. (2005). Toll-Like Receptor 4 on Nonhematopoietic Cells Sustains CNS Inflammation during Endotoxemia, Independent of Systemic Cytokines. *Journal of Neuroscience* 25, 1788–1796.
- Chan, O., Zhu, W., Ding, Y., McCrimmon, R.J., and Sherwin, R.S. (2006). Blockade of GABA(A) receptors in the ventromedial hypothalamus further stimulates glucagon and sympathoadrenal but not the hypothalamo-pituitary-adrenal response to hypoglycemia. *Diabetes* 55, 1080–1087.

- Chao, P.-T., Yang, L., Aja, S., Moran, T.H., and Bi, S. (2011). Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. *Cell Metab.* 13, 573–583.
- Charan, J., and Biswas, T. (2013). How to Calculate Sample Size for Different Study Designs in Medical Research? *Indian Journal of Psychological Medicine* 35, 121-126.
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., More, K.J., Breitbart, R.E., et al. (1996). Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in db/db Mice. *Cell* 84, 491–495.
- Chen, R., Wu, X., Jiang, L., and Zhang, Y. (2017). Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity. *Cell Rep* 18, 3227–3241.
- Cheung, C.C., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138, 4489–4492.
- Chin-Chance, C., Polonsky, K.S., and Schoeller, D.A. (2000). Twenty-four-hour leptin levels respond to cumulative short-term energy imbalance and predict subsequent intake. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2685–2691.
- Chmielewski, A., Hubert, T., Descamps, A., Mazur, D., Daoudi, M., Ciofi, P., Fontaine, C., Caiazzo, R., Pattou, F., Prevot, V., et al. (2019). Preclinical Assessment of Leptin Transport into the Cerebrospinal Fluid in Diet-Induced Obese Minipigs. *Obesity (Silver Spring)* 27, 950-956.
- Chmielewski, A., Hubert, T., Descamps, A., Mazur, D., Daoudi, M., Ciofi, P., Fontaine, C., Caiazzo, R., Pattou, F., Prevot, V., et al. (2019). Preclinical Assessment of Leptin Transport into the Cerebrospinal Fluid in Diet-Induced Obese Minipigs. *Obesity (Silver Spring)* 27, 950–956.
- Choi, S.J., Kim, F., Schwartz, M.W., and Wisse, B.E. (2010). Cultured hypothalamic neurons are resistant to inflammation and insulin resistance induced by saturated fatty acids. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E1122-1130.
- Chua, S.C., Liu, S.M., Li, Q., Sun, A., DeNino, W.F., Heymsfield, S.B., and Guo, X.E. (2004). Transgenic complementation of leptin receptor deficiency. II. Increased leptin receptor transgene dose effects on obesity/diabetes and fertility/lactation in lepr-db/db mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 286, E384-392.
- Ciofi, P. (2011). The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. *Neurosci. Lett.* 487, 187–190.
- Ciofi, P., Garret, M., Lapirot, O., Lafon, P., Loyens, A., Prevot, V., and Levine, J.E. (2009). Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 150, 5509-5519.
- Clasadonte, J., Scemes, E., Wang, Z., Boison, D., and Haydon, P.G. (2017). Connexin 43-Mediated Astroglial Metabolic Networks Contribute to the Regulation of the Sleep-Wake Cycle. *Neuron* 95, 1365-1380.e5.
- Claudio, L., Kress, Y., Norton, W.T., and Brosnan, C.F. (1989). Increased vesicular transport and decreased mitochondrial content in blood-brain barrier endothelial cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J. Pathol.* 135, 1157–1168.
- Cohen, P., Zhao, C., Cai, X., Montez, J.M., Rohani, S.C., Feinstein, P., Mombaerts, P., and Friedman, J.M. (2001a). Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest* 108, 1113-1121.

- Coleman, D.L. (1973). Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice. *Diabetologia* 9, 294–298.
- Conductier, G., Brau, F., Viola, A., Langlet, F., Ramkumar, N., Dehouck, B., Lemaire, T., Chapot, R., Lucas, L., Rovère, C., et al. (2013). Melanin-concentrating hormone regulates beat frequency of ependymal cilia and ventricular volume. *Nat. Neurosci.* 16, 845–847.
- Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., and Bauer, T.L. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* 334, 292–295.
- Coppari, R., and Bjorbaek, C. (2012). Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 11, 692–708.
- Coppari, R., Ichinose, M., Lee, C.E., Pullen, A.E., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Tang, V., Liu, S.M., Ludwig, T., Chua, S.C., et al. (2005). The hypothalamic arcuate nucleus: A key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metabolism* 1, 63–72.
- Coppola, A., Liu, Z.-W., Andrews, Z.B., Paradis, E., Roy, M.-C., Friedman, J.M., Ricquier, D., Richard, D., Horvath, T.L., Gao, X.-B., et al. (2007). A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab.* 5, 21–33.
- Correia, M.L.G., Haynes, W.G., Rahmouni, K., Morgan, D.A., Sivitz, W.I., and Mark, A.L. (2002). The concept of selective leptin resistance: evidence from agouti yellow obese mice. *Diabetes* 51, 439–442.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A.B., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312, 927–930.
- Cowley, M.A., Pronchuk, N., Fan, W., Dinulescu, D.M., Colmers, W.F., and Cone, R.D. (1999). Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 24, 155–163.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480–484.
- Cuevas, P., Gutierrez-Diaz, J.A., Reimers, D., Dujovny, M., Diaz, F.G., and Ausman, J.I. (1984). Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. *Anat. Embryol.* 170, 155–159.
- Cui, H., and Lutter, M. (2013). The expression of MC4Rs in D1R neurons regulates food intake and locomotor sensitization to cocaine. *Genes Brain Behav.* 12, 658–665.
- Cummings, D.E., and Overduin, J. (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *J. Clin. Invest.* 117, 13–23.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., and Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714–1719.
- Dagogo-Jack, S. (2001). Human Leptin Regulation and Promise in Pharmacotherapy. *Current Drug Targets* 2, 181–195.
- Dale, N. (2011). Purinergic signaling in hypothalamic tanycytes: potential roles in chemosensing. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 237–244.
- Dallman MF, Pecoraro NC, la Fleur SE (2005): Chronic stress and comfort foods: Self-medication and abdominal obesity. *Brain Behav Immun* 19:275–280.

Davson, H., Welch, K., and Segal, M. Physiology and pathophysiology of the cerebrospinal fluid. 1987. New York: Churchill Livingstone.

de Luca, C., Kowalski, T.J., Zhang, Y., Elmquist, J.K., Lee, C., Kilimann, M.W., Ludwig, T., Liu, S.M., and Chua, S.C., Jr. (2005). Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. *J Clin Invest* 115, 3484-3493.

De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J.A., and Velloso, L.A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146, 4192-4199.

Deák, F., Liu, X., Khvotchev, M., Li, G., Kavalali, E.T., Sugita, S., and Südhof, T.C. (2009). Alpha-latrotoxin stimulates a novel pathway of Ca<sup>2+</sup>-dependent synaptic exocytosis independent of the classical synaptic fusion machinery. *J Neurosci*. 29, 8639-8648.

DeFuria, J., Belkina, A.C., Jagannathan-Bogdan, M., Snyder-Cappione, J., Carr, J.D., Nersesova, Y.R., Markham, D., Strissel, K.J., Watkins, A.A., Zhu, M., et al. (2013). B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 5133-5138.

Dehouck, M.P., Méresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., and Cecchelli, R. (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem*. 54, 1798-1801.

Dejana, E., Orsenigo, F., and Lampugnani, M.G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell. Sci.* 121, 2115-2122.

Dejana, E., Tournier-Lasserve, E., and Weinstein, B.M. (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev. Cell* 16, 209-221.

Del Bigio, M.R. (2010). Ependymal cells: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 119, 55-73.

Denis, R.G.P., Joly-Amado, A., Webber, E., Langlet, F., Schaeffer, M., Padilla, S.L., Cansell, C., Dehouck, B., Castel, J., Delbès, A.-S., et al. (2015). Palatability Can Drive Feeding Independent of AgRP Neurons. *Cell Metab*. 22, 646-657.

Denver, R.J., Bonett, R.M., and Boorse, G.C. (2011). Evolution of leptin structure and function. *Neuroendocrinology* 94, 21-38.

Dhillon, H., Zigman, J.M., Ye, C., Lee, C.E., McGovern, R.A., Tang, V., Kenny, C.D., Christiansen, L.M., White, R.D., Edelstein, E.A., et al. (2006). Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* 49, 191-203.

Di Spiezio, A., Sandrin, E.S., Dore, R., Müller-Fielitz, H., Storck, S.E., Bernau, M., Mier, W., Oster, H., Jöhren, O., Pietrzik, C.U., et al. (2018). The LepR-mediated leptin transport across brain barriers controls food reward. *Mol Metab* 8, 13-22.

Diano, S., Leonard, J.L., Meli, R., Esposito, E., and Schiavo, L. (2003). Hypothalamic type II iodothyronine deiodinase: a light and electron microscopic study. *Brain Res*. 976, 130-134.

Djogo, T., Robins, S.C., Schneider, S., Kryzskaya, D., Liu, X., Mingay, A., Gillon, C.J., Kim, J.H., Storch, K.F., Boehm, U., et al. (2016). Adult NG2-Glia Are Required for Median Eminence-Mediated Leptin Sensing and Body Weight Control. *Cell Metab* 23, 797-810.

Dobbing, J., and Sands, J. (1970). Timing of neuroblast multiplication in developing human brain. *Nature* 226, 639-640.

- Dodd, G.T., Decherf, S., Loh, K., Simonds, S.E., Wiede, F., Balland, E., Merry, T.L., Münzberg, H., Zhang, Z.-Y., Kahn, B.B., et al. (2015). Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. *Cell* **160**, 88–104.
- Dresbach, T., Qualmann, B., Kessels, M.M., Garner, C.C., and Gundelfinger, E.D. (2001). The presynaptic cytomatrix of brain synapses. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 94–116.
- Driessler, F., and Baldock, P.A. (2010). Hypothalamic regulation of bone. *J. Mol. Endocrinol.* **45**, 175–181.
- Ducy, P., Amling, M., Takeda, S., Priemel, M., Schilling, A.F., Beil, F.T., Shen, J., Vinson, C., Rueger, J.M., and Karsenty, G. (2000). Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* **100**, 197–207.
- Dumon, C., Diabira, D., Chudotvorova, I., Bader, F., Sahin, S., Zhang, J., Porcher, C., Wayman, G., Medina, I., and Gaiarsa, J.-L. (2018). The adipocyte hormone leptin sets the emergence of hippocampal inhibition in mice. *Elife* **7**.
- Dunn, S.L., Björnholm, M., Bates, S.H., Chen, Z., Seifert, M., and Myers, M.G. (2005). Feedback inhibition of leptin receptor/Jak2 signaling via Tyr1138 of the leptin receptor and suppressor of cytokine signaling 3. *Mol. Endocrinol.* **19**, 925–938.
- Dunn-Meynell, A.A., Rawson, N.E., and Levin, B.E. (1998). Distribution and phenotype of neurons containing the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in rat brain. *Brain Res.* **814**, 41–54.
- Ebling, F.J.P., and Lewis, J.E. (2018). Tanyocytes and hypothalamic control of energy metabolism. *Glia* **66**, 1176–1184.
- Ehrlich, P. (1904). Über die Beziehung chemischer Konstitution. Verteilung, Und Pharmakologischer Wirkung.
- Elefteriou, F., Ahn, J.D., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., Kondo, H., Richards, W.G., Bannon, T.W., Noda, M., et al. (2005). Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* **434**, 514–520.
- El-Haschimi, K., Pierroz, D.D., Hileman, S.M., Bjørbaek, C., and Flier, J.S. (2000). Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **105**, 1827–1832.
- Elizondo-Vega, R., Cortes-Campos, C., Barahona, M.J., Oyarce, K.A., Carril, C.A., and García-Robles, M.A. (2015). The role of tanyocytes in hypothalamic glucosensing. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 1471–1482.
- Elmquist, J.K., Coppari, R., Balthasar, N., Ichinose, M., and Lowell, B.B. (2005). Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J. Comp. Neurol.* **493**, 63–71.
- el-Salhy, M., Stenling, R., and Grimelius, L. (1993). Peptidergic innervation and endocrine cells in the human liver. *Scand. J. Gastroenterol.* **28**, 809–815.
- Ennis, S.R., and Keep, R.F. (2006). The effects of cerebral ischemia on the rat choroid plexus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26**, 675–683.
- Eriksson, J.G., Forsén, T., Tuomilehto, J., Jaddoe, V.W.V., Osmond, C., and Barker, D.J.P. (2002). Effects of size at birth and childhood growth on the insulin resistance syndrome in elderly individuals. *Diabetologia* **45**, 342–348.
- Ernst, M.B., Wunderlich, C.M., Hess, S., Paehler, M., Mesaros, A., Koralov, S.B., Kleinridders, A., Husch, A., Münzberg, H., Hampel, B., et al. (2009). Enhanced Stat3 activation in POMC neurons

provokes negative feedback inhibition of leptin and insulin signaling in obesity. *J. Neurosci.* 29, 11582–11593.

Fagerholm, V., Haaparanta, M., and Scheinin, M. (2011). alpha2-adrenoceptor regulation of blood glucose homeostasis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 108, 365–370.

Fan, W., Dinulescu, D.M., Butler, A.A., Zhou, J., Marks, D.L., and Cone, R.D. (2000). The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology* 141, 3072–3079.

Farooqi, I.S., and O'Rahilly, S. (2005). Monogenic obesity in humans. *Annu. Rev. Med.* 56, 443–458.

Farooqi, I.S., and O'Rahilly, S. (2014). 20 years of leptin: human disorders of leptin action. *J. Endocrinol.* 223, T63–70.

Farooqi, I.S., Matarese, G., Lord, G.M., Keogh, J.M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S.A., Perna, F., Fontana, S., et al. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *Journal of Clinical Investigation* 110, 1093–1103.

Farr, S.A., Banks, W.A., and Morley, J.E. (2006). Effects of leptin on memory processing. *Peptides* 27, 1420–1425.

Farr, S.A., Yamada, K.A., Butterfield, D.A., Abdul, H.M., Xu, L., Miller, N.E., Banks, W.A., and Morley, J.E. (2008). Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. *Endocrinology* 149, 2628–2636.

Faubel, R., Westendorf, C., Bodenschatz, E., and Eichele, G. (2016). Cilia-based flow network in the brain ventricles. *Science* 353, 176–178.

Fay, D.S., and Gerow, K. (2013). A biologist's guide to statistical thinking and analysis (). WormBook : the online review of *C elegans* biology, 10.1895/wormbook.1891.1159.1891.

Fekete, C., and Lechan, R.M. (2014). Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr. Rev.* 35, 159–194.

Fekete, C., Kelly, J., Mihály, E., Sarkar, S., Rand, W.M., Légrádi, G., Emerson, C.H., and Lechan, R.M. (2001). Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology* 142, 2606–2613.

Felgenhauer, K. (1974). Protein size and cerebrospinal fluid composition. *Klin. Wochenschr.* 52, 1158–1164.

Figenschau, Y., Knutsen, G., Shahazeydi, S., Johansen, O., and Sveinbjörnsson, B. (2001). Human articular chondrocytes express functional leptin receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 190–197.

Fliers, E., Klieverik, L.P., and Kalsbeek, A. (2010). Novel neural pathways for metabolic effects of thyroid hormone. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 230–236.

Frayling, C., Britton, R., and Dale, N. (2011). ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J. Physiol. (Lond.)* 589, 2275–2286.

Friedman, J.M. (2019). Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nature Metabolism* 1, 754–764.

Frühbeck, G., Méndez-Giménez, L., Fernández-Formoso, J.-A., Fernández, S., and Rodríguez, A. (2014). Regulation of adipocyte lipolysis. *Nutr Res Rev* 27, 63–93.

- Fu, L., Patel, M.S., Bradley, A., Wagner, E.F., and Karsenty, G. (2005). The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation. *Cell* 122, 803–815.
- Fulton, S., Woodside, B., and Shizgal, P. (2000). Modulation of brain reward circuitry by leptin. *Science* 287, 125–128.
- Funai, K., and Cartee, G.D. (2009). Inhibition of contraction-stimulated AMP-activated protein kinase inhibits contraction-stimulated increases in PAS-TBC1D1 and glucose transport without altering PAS-AS160 in rat skeletal muscle. *Diabetes* 58, 1096–1104.
- Furube, E., Mannari, T., Morita, S., Nishikawa, K., Yoshida, A., Itoh, M., and Miyata, S. (2014). VEGF-dependent and PDGF-dependent dynamic neurovascular reconstruction in the neurohypophysis of adult mice. *J. Endocrinol.* 222, 161–179.
- Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol.* 16, 181–188.
- Gainsford, T., Willson, T.A., Metcalf, D., Handman, E., McFarlane, C., Ng, A., Nicola, N.A., Alexander, W.S., and Hilton, D.J. (1996). Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hemopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 14564–14568.
- Gao, Q., Wolfgang, M.J., Neschen, S., Morino, K., Horvath, T.L., Shulman, G.I., and Fu, X.-Y. (2004). Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4661–4666.
- Gao, Y., Ottaway, N., Schriever, S.C., Legutko, B., García-Cáceres, C., de la Fuente, E., Mergen, C., Bour, S., Thaler, J.P., Seeley, R.J., et al. (2014). Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. *Glia* 62, 17–25.
- Gao, Y., Yao, T., Deng, Z., Sohn, J.-W., Sun, J., Huang, Y., Kong, X., Yu, K., Wang, R., Chen, H., et al. (2017). Trpc5 Mediates Acute Leptin and Serotonin Effects via Pomp Neurons. *Cell Reports* 18, 583–592.
- García, M.A., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J.C., Oñate, S.A., et al. (2003). Hypothalamic ependymal-glial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J. Neurochem.* 86, 709–724.
- Garcia-Caceres, C., Balland, E., Prevot, V., Luquet, S., Woods, S.C., Koch, M., Horvath, T.L., Yi, C.X., Chowen, J.A., Verkhratsky, A., et al. (2019). Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nat Neurosci* 22, 7–14.
- Gardner, C.D., Kiazand, A., Alhassan, S., Kim, S., Stafford, R.S., Balise, R.R., Kraemer, H.C., and King, A.C. (2007). Comparison of the Atkins, Zone, Ornish, and LEARN diets for change in weight and related risk factors among overweight premenopausal women: the A TO Z Weight Loss Study: a randomized trial. *JAMA* 297, 969–977.
- Gautron, L., Elmquist, J.K., and Williams, K.W. (2015). Neural control of energy balance: translating circuits to therapies. *Cell* 161, 133–145.
- Geary, N., and Smith, G.P. (1982). Pancreatic glucagon and postprandial satiety in the rat. *Physiol. Behav.* 28, 313–322.
- Geller, S., Arribat, Y., Netzahualcoyotzi, C., Lagarrigue, S., Carneiro, L., Zhang, L., Amati, F., Lopez-Mejia, I.C., and Pellerin, L. (2019). Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metab.* 30, 833–844.e7.

- Ghersi-Egea, J.-F., and Damkier, H. (2017). Blood–Brain Interfaces Organization in Relation to Inorganic Ion Transport, CSF Secretion, and Circulation. In *Brain Edema*, (Elsevier), pp. 29–48.
- Gibbs, J., Young, R.C., and Smith, G.P. (1973). Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature* 245, 323–325.
- Giordano, A., Frontini, A., Castellucci, M., and Cinti, S. (2004). Presence and distribution of cholinergic nerves in rat mediastinal brown adipose tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 923–930.
- Giordano, A., Song, C.K., Bowers, R.R., Ehlen, J.C., Frontini, A., Cinti, S., and Bartness, T.J. (2006). White adipose tissue lacks significant vagal innervation and immunohistochemical evidence of parasympathetic innervation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291, R1243–1255.
- Goldmann, E.E. (1913). Vitalfarbung am zentralnervensystem. *Abhandl Konigl Preuss Akad Wiss* 1, 1–60.
- Gonçalves, G.H.M., Li, W., Garcia, A.V.C.-G., Figueiredo, M.S., and Bjørbaek, C. (2014). Hypothalamic agouti-related peptide neurons and the central melanocortin system are crucial mediators of leptin's antidiabetic actions. *Cell Rep* 7, 1093–1103.
- Gouazé, A., Brenachot, X., Rigault, C., Krezymon, A., Rauch, C., Nédélec, E., Lemoine, A., Gascuel, J., Bauer, S., Pénicaud, L., et al. (2013). Cerebral cell renewal in adult mice controls the onset of obesity. *PLoS ONE* 8, e72029.
- Graesser, D., Solowiej, A., Bruckner, M., Osterweil, E., Juedes, A., Davis, S., Ruddle, N.H., Engelhardt, B., and Madri, J.A. (2002). Altered vascular permeability and early onset of experimental autoimmune encephalomyelitis in PECAM-1-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 109, 383–392.
- Guadaño-Ferraz, A., Obregón, M.J., St Germain, D.L., and Bernal, J. (1997). The type 2 iodothyronine deiodinase is expressed primarily in glial cells in the neonatal rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 10391–10396.
- Haan, N., Goodman, T., Najdi-Samiei, A., Stratford, C.M., Rice, R., El Agha, E., Bellusci, S., and Hajihosseini, M.K. (2013). Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *J. Neurosci.* 33, 6170–6180.
- Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1998). Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* 1, 271–272.
- Håkansson, M.L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R.C., and Meister, B. (1998). Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. *J. Neurosci.* 18, 559–572.
- Hall, C.N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N.B., Mishra, A., Sutherland, B.A., O'Farrell, F.M., Buchan, A.M., Lauritzen, M., and Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508, 55–60.
- Hallmann, R., Horn, N., Selg, M., Wendler, O., Pausch, F., and Sorokin, L.M. (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol. Rev.* 85, 979–1000.
- Hamrick, M.W., Pennington, C., Newton, D., Xie, D., and Isales, C. (2004). Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine. *Bone* 34, 376–383.
- Hanson ES, Dallman MF (1995): Neuropeptide Y (NPY) may integrate responses of hypothalamic feeding systems and the hypothalamopituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 7:273–279.
- Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251–262.

- Harris, M., Aschkenasi, C., Elias, C.F., Chandrankunnel, A., Nillni, E.A., Bjørbaek, C., Elmquist, J.K., Flier, J.S., and Hollenberg, A.N. (2001). Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J. Clin. Invest.* 107, 111–120.
- Harrison, L., Schriever, S.C., Feuchtinger, A., Kyriakou, E., Baumann, P., Pfuhlmann, K., Messias, A.C., Walch, A., Tschöp, M.H., and Pfluger, P.T. (2019). Fluorescent blood–brain barrier tracing shows intact leptin transport in obese mice. *International Journal of Obesity* 43, 1305–1318.
- Haugaard, N., Vaughan, M., Haugaard, E.S., and Stadie, W.C. (1954). Studies of radioactive injected labeled insulin. *J. Biol. Chem.* 208, 549–563.
- Hawke, Z., Ivanov, T.R., Bechtold, D.A., Dhillon, H., Lowell, B.B., and Luckman, S.M. (2009). PACAP neurons in the hypothalamic ventromedial nucleus are targets of central leptin signaling. *J. Neurosci.* 29, 14828–14835.
- Hawkins, B.T., Sykes, D.B., and Miller, D.S. (2010). Rapid, reversible modulation of blood-brain barrier P-glycoprotein transport activity by vascular endothelial growth factor. *J. Neurosci.* 30, 1417–1425.
- Hawley, S.A., Boudeau, J., Reid, J.L., Mustard, K.J., Udd, L., Mäkelä, T.P., Alessi, D.R., and Hardie, D.G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and M025 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J. Biol.* 2, 28.
- Hegyi, K., Fülöp, K., Kovács, K., Tóth, S., and Falus, A. (2004). Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell Biol. Int.* 28, 159–169.
- Henson, H.E., Parupalli, C., Ju, B., and Taylor, M.R. (2014). Functional and genetic analysis of choroid plexus development in zebrafish. *Front Neurosci* 8, 364.
- Hervé, F., Ghinea, N., and Scherrmann, J.-M. (2008). CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J* 10, 455–472.
- Hiyama, T.Y., Watanabe, E., Ono, K., Inenaga, K., Tamkun, M.M., Yoshida, S., and Noda, M. (2002). Nax channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature Neuroscience* 5, 511–512.
- Hofmann, K., Lamberz, C., Piotrowitz, K., Offermann, N., But, D., Scheller, A., Al-Amoudi, A., and Kuerschner, L. (2017). Tanyocytes and a differential fatty acid metabolism in the hypothalamus. *Glia* 65, 231–249.
- Holder, J.L., Zhang, L., Kublaoui, B.M., DiLeone, R.J., Oz, O.K., Bair, C.H., Lee, Y.-H., and Zinn, A.R. (2004). Sim1 gene dosage modulates the homeostatic feeding response to increased dietary fat in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, E105–113.
- Hommel, J.D., Trinko, R., Sears, R.M., Georgescu, D., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Thurmon, J.J., Marinelli, M., and DiLeone, R.J. (2006). Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron* 51, 801–810.
- Horvath, T.L., Andrews, Z.B., and Diano, S. (2009). Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 78–87.
- Horvath, T.L., Sarman, B., García-Cáceres, C., Enriori, P.J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., Borok, E., Argente, J., Chowen, J.A., Perez-Tilve, D., et al. (2010). Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 14875–14880.
- Hosoi, T., Sasaki, M., Miyahara, T., Hashimoto, C., Matsuo, S., Yoshii, M., and Ozawa, K. (2008). Endoplasmic reticulum stress induces leptin resistance. *Mol. Pharmacol.* 74, 1610–1619.

- Houseknecht, K.L., Mantzoros, C.S., Kuliawat, R., Hadro, E., Flier, J.S., and Kahn, B.B. (1996). Evidence for Leptin Binding to Proteins in Serum of Rodents and Humans: Modulation With Obesity. *Diabetes* 45, 1638–1643.
- Howard, J.K., and Flier, J.S. (2006). Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab* 17, 365–371.
- Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzameli, I., Bjørbaek, C., and Flier, J.S. (2004). Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Soc3. *Nat. Med.* 10, 734–738.
- Howard, J.K., Lord, G.M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M.A., Ritter, M.A., Lechler, R.I., and Bloom, S.R. (1999). Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J. Clin. Invest.* 104, 1051–1059.
- Howarth, N.C., Saltzman, E., and Roberts, S.B. (2001). Dietary fiber and weight regulation. *Nutr. Rev.* 59, 129–139.
- Humeau, Y., Doussau, F., Grant, N.J., and Poulain, B. (2000). How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. *Biochimie* 82, 427–446.
- Huo, L., Gamber, K., Greeley, S., Silva, J., Huntoon, N., Leng, X.-H., and Bjørbaek, C. (2009). Leptin-dependent control of glucose balance and locomotor activity by POMC neurons. *Cell Metab.* 9, 537–547.
- Huo, L., Münzberg, H., Nillni, E.A., and Bjørbaek, C. (2004). Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic trh gene expression by leptin. *Endocrinology* 145, 2516–2523.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., et al. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88, 131–141.
- Huxley, R., Owen, C.G., Whincup, P.H., Cook, D.G., Rich-Edwards, J., Smith, G.D., and Collins, R. (2007). Is birth weight a risk factor for ischemic heart disease in later life? *Am. J. Clin. Nutr.* 85, 1244–1250.
- Hwa, J.J., Ghibaudi, L., Gao, J., and Parker, E.M. (2001). Central melanocortin system modulates energy intake and expenditure of obese and lean Zucker rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R444–451.
- Iliff, J.J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B.A., Peng, W., Gundersen, G.A., Benveniste, H., Vates, G.E., Deane, R., Goldman, S.A., et al. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Sci Transl Med* 4, 147ra111.
- Imbernon, M., Beiroa, D., Vázquez, M.J., Morgan, D.A., Veyrat-Durebex, C., Porteiro, B., Díaz-Arteaga, A., Senra, A., Busquets, S., Velásquez, D.A., et al. (2013). Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology* 144, 636–649.e6.
- Ionescu, E., Rohner-Jeanrenaud, F., Berthoud, H.R., and Jeanrenaud, B. (1983). Increases in plasma insulin levels in response to electrical stimulation of the dorsal motor nucleus of the vagus nerve. *Endocrinology* 112, 904–910.
- Irani, B.G., Le Foll, C., Dunn-Meynell, A., and Levin, B.E. (2008). Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons. *Endocrinology* 149, 5146–5154.

Iriki, M., and Simon, E. (2012). Differential control of efferent sympathetic activity revisited. *J Physiol Sci* 62, 275–298.

Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T., and Tsukita, S. (2001). Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J. Cell Biol.* 154, 491–497.

Ivanova, E.A., Bechtold, D.A., Dupré, S.M., Brennand, J., Barrett, P., Luckman, S.M., and Loudon, A.S.I. (2008). Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knockout mouse. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 294, E176–182.

Jang, P.-G., Namkoong, C., Kang, G.M., Hur, M.-W., Kim, S.-W., Kim, G.H., Kang, Y., Jeon, M.-J., Kim, E.H., Lee, M.-S., et al. (2010). NF- $\kappa$ B activation in hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons is essential in illness- and leptin-induced anorexia. *J. Biol. Chem.* 285, 9706–9715.

Jänig, W. (2006). The integrative action of the autonomic nervous system: neurobiology of homeostasis (Cambridge: Cambridge Univ. Press).

Jansen, A.S., Hoffman, J.L., and Loewy, A.D. (1997). CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Res.* 766, 29–38.

Janzer, R.C., and Raff, M.C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253–257.

Jeong, J.H., Lee, D.K., and Jo, Y.-H. (2017). Cholinergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate food intake. *Mol Metab* 6, 306–312.

Jin, L., Zhang, S., Burguera, B.G., Couce, M.E., Osamura, R.Y., Kulig, E., and Lloyd, R.V. (2000). Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology* 141, 333–339.

Jo, Y.H., Chen, Y.J., Chua, S.C., Jr., Talmage, D.A., and Role, L.W. (2005). Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron* 48, 1055–1066.

Johanson, C.E., Duncan, J.A., Klinge, P.M., Brinker, T., Stopa, E.G., and Silverberg, G.D. (2008). Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* 5, 10.

Johanson, C.E., Jones, H.C., Stopa, E.G., Ayala, C., Duncan, J.A., and McMillan, P.N. (2002). Enhanced expression of the Na-K-2 Cl cotransporter at different regions of the blood-CSF barrier in the perinatal H-Tx rat. *Eur J Pediatr Surg* 12 Suppl 1, S47–49.

Joly-Amado, A., Denis, R.G.P., Castel, J., Lacombe, A., Cansell, C., Rouch, C., Kassis, N., Dairou, J., Cani, P.D., Ventura-Clapier, R., et al. (2012). Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning. *EMBO J.* 31, 4276–4288.

Jourdon, A., Gresset, A., Spassky, N., Charnay, P., Topilko, P., and Santos, R. (2016). Prss56, a novel marker of adult neurogenesis in the mouse brain. *Brain Struct Funct* 221, 4411–4427.

Jung CM, Melanson EL, Frydendall EJ, Perreault L, Eckel RH, Wright KP. Energy expenditure during sleep, sleep deprivation and sleep following sleep deprivation in adult humans. *J Physiol* 2011;589(Pt 1): 235–244.

Kahn, B.B., and Flier, J.S. (2000). Obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 473–481.

Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, J.L., Friedman, J.M., and Charron, M.J. (1997). Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 389, 374–377.

- Kanoski, S.E., Zhao, S., Guarnieri, D.J., DiLeone, R.J., Yan, J., De Jonghe, B.C., Bence, K.K., Hayes, M.R., and Grill, H.J. (2012). Endogenous leptin receptor signaling in the medial nucleus tractus solitarius affects meal size and potentiates intestinal satiation signals. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 303, E496-503.
- Karsenty, G. (2006). Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab.* 4, 341–348.
- Kasai, H., Takahashi, N., and Tokumaru, H. (2012). Distinct initial SNARE configurations underlying the diversity of exocytosis. *Physiol Rev* 92, 1915-1964.
- Katsuura, G., Asakawa, A., and Inui, A. (2002). Roles of pancreatic polypeptide in regulation of food intake. *Peptides* 23, 323–329.
- Kaushik, S., Arias, E., Kwon, H., Lopez, N.M., Athonvarangkul, D., Sahu, S., Schwartz, G.J., Pessin, J.E., and Singh, R. (2012). Loss of autophagy in hypothalamic POMC neurons impairs lipolysis. *EMBO Rep.* 13, 258–265.
- Keep, R.F., and Jones, H.C. (1990). A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat. *Developmental Brain Research* 56, 47–53.
- Keir, G., and Thompson, E.J. (1986). Proteins as parameters in the discrimination between different blood-CSF barriers. *Journal of the Neurological Sciences* 75, 245–253.
- Kershaw, N.J., Murphy, J.M., Liau, N.P.D., Varghese, L.N., Laktyushin, A., Whitlock, E.L., Lucet, I.S., Nicola, N.A., and Babon, J.J. (2013a). SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 469–476.
- Kershaw, N.J., Murphy, J.M., Lucet, I.S., Nicola, N.A., and Babon, J.J. (2013b). Regulation of Janus kinases by SOCS proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 41, 1042–1047.
- Kim, B. (2008). Thyroid hormone as a determinant of energy expenditure and the basal metabolic rate. *Thyroid* 18, 141–144.
- Kim, B.-J., Ryu, S.-W., and Song, B.-J. (2006). JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 281, 21256–21265.
- Kim, K.W., Donato, J., Berglund, E.D., Choi, Y.-H., Kohno, D., Elias, C.F., Depinho, R.A., and Elmquist, J.K. (2012). FOXO1 in the ventromedial hypothalamus regulates energy balance. *J. Clin. Invest.* 122, 2578–2589.
- Kim, K.W., Zhao, L., Donato, J., Kohno, D., Xu, Y., Elias, C.F., Lee, C., Parker, K.L., and Elmquist, J.K. (2011). Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 10673–10678.
- Kim, M.-S., Pak, Y.K., Jang, P.-G., Namkoong, C., Choi, Y.-S., Won, J.-C., Kim, K.-S., Kim, S.-W., Kim, H.-S., Park, J.-Y., et al. (2006). Role of hypothalamic Foxo1 in the regulation of food intake and energy homeostasis. *Nat. Neurosci.* 9, 901–906.
- Kim, M.S., Rossi, M., Abbott, C.R., AlAhmed, S.H., Smith, D.M., and Bloom, S.R. (2002). Sustained orexigenic effect of Agouti related protein may be not mediated by the melanocortin 4 receptor. *Peptides* 23, 1069–1076.

- Kim, M.S., Small, C.J., Stanley, S.A., Morgan, D.G., Seal, L.J., Kong, W.M., Edwards, C.M., Abusnana, S., Sunter, D., Ghatei, M.A., et al. (2000). The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J. Clin. Invest.* **105**, 1005–1011.
- Kissileff, H.R., Pi-Sunyer, F.X., Thornton, J., and Smith, G.P. (1981). C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**, 154–160.
- Kittner, H., Franke, H., Harsch, J.I., El-Ashmawy, I.M., Seidel, B., Krügel, U., and Illes, P. (2006). Enhanced food intake after stimulation of hypothalamic P2Y1 receptors in rats: modulation of feeding behaviour by extracellular nucleotides. *Eur. J. Neurosci.* **24**, 2049–2056.
- Kleinert, M., Kotzbeck, P., Altendorfer-Kroath, T., Birngruber, T., Tschöp, M.H., and Clemmensen, C. (2018). Time-resolved hypothalamic open flow micro-perfusion reveals normal leptin transport across the blood-brain barrier in leptin resistant mice. *Molecular Metabolism* **13**, 77–82.
- Klenchin, V.A., and Martin, T.F. (2000). Priming in exocytosis: attaining fusion-competence after vesicle docking. *Biochimie* **82**, 399–407.
- Klieverik, L.P., Janssen, S.F., van Riel, A., Foppen, E., Bisschop, P.H., Serlie, M.J., Boelen, A., Ackermans, M.T., Sauerwein, H.P., Fliers, E., et al. (2009). Thyroid hormone modulates glucose production via a sympathetic pathway from the hypothalamic paraventricular nucleus to the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 5966–5971.
- Kojima, H., Fujimiya, M., Matsumura, K., Nakahara, T., Hara, M., and Chan, L. (2004). Extrapancreatic insulin-producing cells in multiple organs in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 2458–2463.
- Kokoeva, M.V., Yin, H., and Flieger, J.S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* **310**, 679–683.
- Kong, W.M., Martin, N.M., Smith, K.L., Gardiner, J.V., Connoley, I.P., Stephens, D.A., Dhillo, W.S., Ghatei, M.A., Small, C.J., and Bloom, S.R. (2004). Triiodothyronine stimulates food intake via the hypothalamic ventromedial nucleus independent of changes in energy expenditure. *Endocrinology* **145**, 5252–5258.
- Koopman, A.C.M., Taziaux, M., and Bakker, J. (2017). Age-related changes in the morphology of tanycytes in the human female infundibular nucleus/median eminence. *J. Neuroendocrinol.* **29**.
- Krashes, M.J., Shah, B.P., Koda, S., and Lowell, B.B. (2013). Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metab.* **18**, 588–595.
- Krashes, M.J., Shah, B.P., Madara, J.C., Olson, D.P., Strochlic, D.E., Garfield, A.S., Vong, L., Pei, H., Watabe-Uchida, M., Uchida, N., et al. (2014). An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature* **507**, 238–242.
- Kreier, F., and Buijs, R.M. (2007). Evidence for parasympathetic innervation of white adipose tissue, clearing up some vagaries. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R548–549; author reply R550–552, discussion R553–554.
- Krisch, B., Leonhardt, H., and Buchheim, W. (1978). The functional and structural border between the CSF- and blood-milieu in the circumventricular organs (organum vasculosum laminae terminalis, subfornical organ, area postrema) of the rat. *Cell Tissue Res.* **195**, 485–497.
- Kusumakshi, S., Voigt, A., Hubner, S., Hermans-Borgmeyer, I., Ortalli, A., Pyrski, M., Dorr, J., Zufall, F., Flockerzi, V., Meyerhof, W., et al. (2015). A Binary Genetic Approach to Characterize TRPM5 Cells in Mice. *Chem Senses* **40**, 413–425.

- Kuzawa, C.W., and Adair, L.S. (2003). Lipid profiles in adolescent Filipinos: relation to birth weight and maternal energy status during pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 77, 960–966.
- Ia Fleur, S.E., Kalsbeek, A., Wortel, J., and Buijs, R.M. (2000). Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. *Brain Res.* 871, 50–56.
- Lagaraine, C., Skipor, J., Szczepkowska, A., Dufourny, L., and Thiery, J.-C. (2011). Tight junction proteins vary in the choroid plexus of ewes according to photoperiod. *Brain Res.* 1393, 44–51.
- Laharrague, P., Larrouy, D., Fontanilles, A.M., Truel, N., Campfield, A., Tenenbaum, R., Galitzky, J., Corberand, J.X., Pénicaud, L., and Casteilla, L. (1998). High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture. *FASEB J.* 12, 747–752.
- Lam, B.Y.H., Cimino, I., Polex-Wolf, J., Nicole Kohnke, S., Rimmington, D., Iyemere, V., Heeley, N., Cossetti, C., Schulte, R., Saraiva, L.R., et al. (2017). Heterogeneity of hypothalamic pro-opiomelanocortin-expressing neurons revealed by single-cell RNA sequencing. *Mol Metab* 6, 383–392.
- Lam, T.K.T., Gutierrez-Juarez, R., Pocai, A., Bhanot, S., Tso, P., Schwartz, G.J., and Rossetti, L. (2007). Brain glucose metabolism controls the hepatic secretion of triglyceride-rich lipoproteins. *Nat. Med.* 13, 171–180.
- Langlet, F., Levin, B.E., Luquet, S., Mazzone, M., Messina, A., Dunn-Meynell, A.A., Balland, E., Lacombe, A., Mazur, D., Carmeliet, P., et al. (2013a). Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in Response to Fasting. *Cell Metab* 17, 607–617.
- Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., and Dehouck, B. (2013). Tanocyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 521, 3389–3405.
- Laque, A., Zhang, Y., Gettys, S., Nguyen, T.-A., Bui, K., Morrison, C.D., and Münzberg, H. (2013). Leptin receptor neurons in the mouse hypothalamus are colocalized with the neuropeptide galanin and mediate anorexigenic leptin action. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304, E999–1011.
- Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J.-P., and Besnard, P. (2005). CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J. Clin. Invest.* 115, 3177–3184.
- Lazutkaite, G., Soldà, A., Lossow, K., Meyerhof, W., and Dale, N. (2017). Amino acid sensing in hypothalamic tanocytes via umami taste receptors. *Mol Metab* 6, 1480–1492.
- Le Foll, C., Irani, B.G., Magnan, C., Dunn-Meynell, A.A., and Levin, B.E. (2009). Characteristics and mechanisms of hypothalamic neuronal fatty acid sensing. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R655–664.
- Leckstrom, A., Lew, P.S., Poritsanos, N.J., and Mizuno, T.M. (2011). Central melanocortin receptor agonist reduces hepatic lipogenic gene expression in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sci.* 88, 664–669.
- Lee, D.A., Bedont, J.L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., Takiar, V., Charubhumi, V., Balordi, F., Takebayashi, H., et al. (2012). Tanocytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat. Neurosci.* 15, 700–702.
- Lee, G.-H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I., and Friedman, J.M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379, 632–635.

- Lee, J., and Ozcan, U. (2014). Unfolded protein response signaling and metabolic diseases. *J. Biol. Chem.* 289, 1203–1211.
- Lee, K. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes & Development* 16, 452–466.
- Lee, S.J., Verma, S., Simonds, S.E., Kirigiti, M.A., Kievit, P., Lindsley, S.R., Loche, A., Smith, M.S., Cowley, M.A., and Grove, K.L. (2013). Leptin stimulates neuropeptide Y and cocaine amphetamine-regulated transcript coexpressing neuronal activity in the dorsomedial hypothalamus in diet-induced obese mice. *J. Neurosci.* 33, 15306–15317.
- Leininger, G.M., Jo, Y.-H., Leshan, R.L., Louis, G.W., Yang, H., Barrera, J.G., Wilson, H., Opland, D.M., Faouzi, M.A., Gong, Y., et al. (2009). Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab.* 10, 89–98.
- Leon, D.A., Lithell, H.O., Vägerö, D., Koupilová, I., Mohsen, R., Berglund, L., Lithell, U.B., and McKeigue, P.M. (1998). Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15 000 Swedish men and women born 1915–29. *BMJ* 317, 241–245.
- Leshan, R.L., Greenwald-Yarnell, M., Patterson, C.M., Gonzalez, I.E., and Myers, M.G. (2012). Leptin action through hypothalamic nitric oxide synthase-1-expressing neurons controls energy balance. *Nat. Med.* 18, 820–823.
- Lewandowsky, M. (1909). Zur lehre der cerebrospinalflüssigkeit. *Z. Klin. Med.* 40, 480–494.
- Li, J., Tang, Y., and Cai, D. (2012). IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat. Cell Biol.* 14, 999–1012.
- Li, J., Tang, Y., Purkayastha, S., Yan, J., and Cai, D. (2014). Control of obesity and glucose intolerance via building neural stem cells in the hypothalamus. *Mol Metab* 3, 313–324.
- Li, T., and Chiang, J.Y.L. (2013). Nuclear receptors in bile acid metabolism. *Drug Metab. Rev.* 45, 145–155.
- Li, X.-L., Aou, S., Oomura, Y., Hori, N., Fukunaga, K., and Hori, T. (2002). Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 113, 607–615.
- Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C.J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., et al. (2008). Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 183, 409–417.
- Lindberg, D., Chen, P., and Li, C. (2013). Conditional viral tracing reveals that steroidogenic factor 1-positive neurons of the dorsomedial subdivision of the ventromedial hypothalamus project to autonomic centers of the hypothalamus and hindbrain. *J. Comp. Neurol.* 521, 3167–3190.
- Liu, T., Kong, D., Shah, B.P., Ye, C., Koda, S., Saunders, A., Ding, J.B., Yang, Z., Sabatini, B.L., and Lowell, B.B. (2012). Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron* 73, 511–522.
- Liu, Z., Cheng, Y., Luan, Y., Zhong, W., Lai, H., Wang, H., Yu, H., Yang, Y., Feng, N., Yuan, F., et al. (2018). Short-term tamoxifen treatment has long-term effects on metabolism in high-fat diet-fed mice with involvement of Nmnat2 in POMC neurons. *FEBS Lett* 592, 3305–3316.

- Loffreda, S., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Karp, C.L., Brengman, M.L., Wang, D.J., Klein, A.S., Bulkley, G.B., Bao, C., Noble, P.W., et al. (1998). Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J.* 12, 57–65.
- Loh, K., Fukushima, A., Zhang, X., Galic, S., Briggs, D., Enriori, P.J., Simonds, S., Wiede, F., Reichenbach, A., Hauser, C., et al. (2011). Elevated hypothalamic TCPTP in obesity contributes to cellular leptin resistance. *Cell Metab.* 14, 684–699.
- Loos, R.J.F., Lindgren, C.M., Li, S., Wheeler, E., Zhao, J.H., Prokopenko, I., Inouye, M., Freathy, R.M., Attwood, A.P., Beckmann, J.S., et al. (2008). Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat. Genet.* 40, 768–775.
- Lorke, D.E., Kalasz, H., Petroianu, G.A., and Tekes, K. (2008). Entry of oximes into the brain: a review. *Curr. Med. Chem.* 15, 743–753.
- Ma, M.-S., Brouwer, N., Wesseling, E., Raj, D., van der Want, J., Boddeke, E., Balasubramaniyan, V., and Copray, S. (2015). Multipotent stem cell factor UGS148 is a marker for tanycytes in the adult hypothalamus. *Mol. Cell. Neurosci.* 65, 21–30.
- Madden, C.J., and Morrison, S.F. (2009). Neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus inhibit sympathetic outflow to brown adipose tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R831-843.
- Maffei, M., Stoffel, M., Barone, M., Moon, B., Dammerman, M., Ravussin, E., Bogardus, C., Ludwig, D.S., Flier, J.S., and Talley, M. (1996). Absence of mutations in the human OB gene in obese/diabetic subjects. *Diabetes* 45, 679–682.
- Magni, P., Liuzzi, A., Ruscica, M., Dozio, E., Ferrario, S., Bussi, I., Minocci, A., Castagna, A., Motta, M., and Savia, G. (2005). Free and bound plasma leptin in normal weight and obese men and women: relationship with body composition, resting energy expenditure, insulin-sensitivity, lipid profile and macronutrient preference. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 62, 189–196.
- Maharaj, A.S.R., Walshe, T.E., Saint-Geniez, M., Venkatesha, S., Maldonado, A.E., Himes, N.C., Matharu, K.S., Karumanchi, S.A., and D'Amore, P.A. (2008). VEGF and TGF-beta are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *J. Exp. Med.* 205, 491–501.
- Mancuso, P., Canetti, C., Gottschalk, A., Tithof, P.K., and Peters-Golden, M. (2004). Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA2 (cPLA2gamma) protein expression. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287, L497-502.
- Maniam J, Morris MJ (2012): The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology* 63:97–110.
- Mannari, T., Morita, S., Furube, E., Tominaga, M., and Miyata, S. (2013). Astrocytic TRPV1 ion channels detect blood-borne signals in the sensory circumventricular organs of adult mouse brains: Astrocytic TRPV1 Expression in Sensory CVOs. *Glia* 61, 957–971.
- Mantzoros, C.S., and Flier, J.S. (2000). Editorial: leptin as a therapeutic agent—trials and tribulations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4000–4002.
- Mantzoros, C.S., Frederich, R.C., Flier, J.S., Qu, D., Susulic, V.S., Lowell, B.B., and Maratos-Flier, E. (1996). Activation of 3 Adrenergic Receptors Suppresses Leptin Expression and Mediates a Leptin-Independent Inhibition of Food Intake in Mice. *Diabetes* 45, 909–914.
- Marks, J.L., Porte, D., Stahl, W.L., and Baskin, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by *in situ* hybridization. *Endocrinology* 127, 3234–3236.

Markwald RR, Melanson EL, Smith MR et al. Impact of insufficient sleep on total daily energy expenditure, food intake, and weight gain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:5695–5700.

Martin, B., Pearson, M., Brenneman, R., Golden, E., Keselman, A., Iyun, T., Carlson, O.D., Egan, J.M., Becker, K.G., Wood, W., et al. (2008). Conserved and differential effects of dietary energy intake on the hippocampal transcriptomes of females and males. *PLoS ONE* 3, e2398.

Martínez de Morentin, P.B., Varela, L., Fernø, J., Nogueiras, R., Diéguez, C., and López, M. (2010). Hypothalamic lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 350–361.

Martínez-Sánchez, N., Seoane-Collazo, P., Contreras, C., Varela, L., Villarroya, J., Rial-Pensado, E., Buqué, X., Aurrekoetxea, I., Delgado, T.C., Vázquez-Martínez, R., et al. (2017). Hypothalamic AMPK-ER Stress-JNK1 Axis Mediates the Central Actions of Thyroid Hormones on Energy Balance. *Cell Metab.* 26, 212–229.e12.

Masuda, K., Koizumi, A., Nakajima, K., Tanaka, T., Abe, K., Misaka, T., and Ishiguro, M. (2012). Characterization of the modes of binding between human sweet taste receptor and low-molecular-weight sweet compounds. *PLoS ONE* 7, e35380.

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

Mayer, J. (1953). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. *N. Engl. J. Med.* 249, 13–16.

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

McEwen BS (2007): Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiol Rev* 87:873–904.

Mercer, A.J., Hentges, S.T., Meshul, C.K., and Low, M.J. (2013). Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. *Front Neurosci* 7, 19.

Merrill, G.F., Kurth, E.J., Hardie, D.G., and Winder, W.W. (1997). AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 273, E1107–E1112.

Mesaros, A., Koralov, S.B., Rother, E., Wunderlich, F.T., Ernst, M.B., Barsh, G.S., Rajewsky, K., and Brüning, J.C. (2008). Activation of Stat3 signaling in AgRP neurons promotes locomotor activity. *Cell Metab.* 7, 236–248.

Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M.L., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K., et al. (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J. Neurosci.* 29, 359–370.

Millán, C., Martínez, F., Cortés-Campos, C., Lizama, I., Yañez, M.J., Llanos, P., Reinicke, K., Rodríguez, F., Peruzzo, B., Nualart, F., et al. (2010). Glial glucokinase expression in adult and postnatal development of the hypothalamic region. *ASN Neuro* 2, e00035.

Minamoto, S., Ikegami, K., Ueno, K., Narasaki, M., Naka, T., Yamamoto, H., Matsumoto, T., Saito, H., Hosoe, S., and Kishimoto, T. (1997). Cloning and functional analysis of new members of STAT induced STAT inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 79–83.

- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Foufelle, F., Ferré, P., Birnbaum, M.J., et al. (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 428, 569–574.
- Minokoshi, Y., Haque, M.S., and Shimazu, T. (1999). Microinjection of leptin into the ventromedial hypothalamus increases glucose uptake in peripheral tissues in rats. *Diabetes* 48, 287–291.
- Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O.D., Fryer, L.G.D., Müller, C., Carling, D., and Kahn, B.B. (2002). Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415, 339–343.
- Minokoshi, Y., Okano, Y., and Shimazu, T. (1994). Regulatory mechanism of the ventromedial hypothalamus in enhancing glucose uptake in skeletal muscles. *Brain Res.* 649, 343–347.
- Miranda-Angulo, A.L., Byerly, M.S., Mesa, J., Wang, H., and Blackshaw, S. (2014). Rax regulates hypothalamic tanycyte differentiation and barrier function in mice. *J. Comp. Neurol.* 522, 876–899.
- Mise, H., Yura, S., Itoh, H., Nuamah, M.A., Takemura, M., Sagawa, N., and Fujii, S. (2007). The Relationship between Maternal Plasma Leptin Levels and Fetal Growth Restriction. *Endocrine Journal* 54, 945–951.
- Miyata, S., and Hatton, G.I. (2002). Activity-related, dynamic neuron-glial interactions in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Microscopy Research and Technique* 56, 143–157.
- Mohr, A., Chatain, N., Domoszlai, T., Rinis, N., Sommerauer, M., Vogt, M., and Müller-Newen, G. (2012). Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 524–532.
- Mollgård, K., and Saunders, N.R. (1975). Complex tight junctions of epithelial and of endothelial cells in early foetal brain. *J. Neurocytol.* 4, 453–468.
- Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A., et al. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387, 903–908.
- Montecucco, C., and Schiavo, G. (1994). Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.* 13, 1–8.
- Moon, H.-S., Dalamaga, M., Kim, S.-Y., Polyzos, S.A., Hamnvik, O.-P., Magkos, F., Paruthi, J., and Mantzoros, C.S. (2013). Leptin's Role in Lipodystrophic and Nonlipodystrophic Insulin-Resistant and Diabetic Individuals. *Endocrine Reviews* 34, 377–412.
- Moraes, J.C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D.E., Roman, E.A., Pauli, J.R., Romanatto, T., Carvalheira, J.B., Oliveira, A.L.R., Saad, M.J., et al. (2009). High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS ONE* 4, e5045.
- Morimoto, A., Tatsumi, Y., Deura, K., Mizuno, S., Ohno, Y., Miyamatsu, N., and Watanabe, S. (2013). Impact of impaired insulin secretion and insulin resistance on the incidence of type 2 diabetes mellitus in a Japanese population: the Saku study. *Diabetologia* 56, 1671–1679.
- Morita, S., Furube, E., Mannari, T., Okuda, H., Tatsumi, K., Wanaka, A., and Miyata, S. (2016). Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 363, 497–511.
- Morrison, S.F., Madden, C.J., and Tupone, D. (2014). Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab.* 19, 741–756.

- Morton, G.J., Blevins, J.E., Williams, D.L., Niswender, K.D., Gelling, R.W., Rhodes, C.J., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2005). Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *J. Clin. Invest.* 115, 703–710.
- Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., and Cone, R.D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 8, 1298–1308.
- Müller, T.D., Tschöp, M.H., and O’Rahilly, S. (2016). Metabolic Precision Medicines: Curing POMC Deficiency. *Cell Metab.* 24, 194–195.
- Muller-Fielitz, H., Stahr, M., Bernau, M., Richter, M., Abele, S., Krajka, V., Benzin, A., Wenzel, J., Kalies, K., Mittag, J., et al. (2017). Tanycytes control the hormonal output of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Nat Commun* 8, 484.
- Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., and Dehouck, B. (2010). Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 518, 943–962.
- Münzberg, H., Flier, J.S., and Bjørbaek, C. (2004). Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145, 4880–4889.
- Münzberg, H., Huo, L., Nillni, E.A., Hollenberg, A.N., and Bjørbaek, C. (2003). Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology* 144, 2121–2131.
- Murakami, T., Yamashita, T., Iida, M., Kuwajima, M., and Shima, K. (1997). A short form of leptin receptor performs signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 26–29.
- Mussa, B.M., Sartor, D.M., Rantzau, C., and Verberne, A.J.M. (2011). Effects of nitric oxide synthase blockade on dorsal vagal stimulation-induced pancreatic insulin secretion. *Brain Res.* 1394, 62–70.
- Muzumdar, R., Ma, X., Yang, X., Atzmon, G., Bernstein, J., Karkanias, G., and Barzilai, N. (2003). Physiologic effect of leptin on insulin secretion is mediated mainly through central mechanisms. *FASEB J* 17, 1130–1132.
- Myers, M.G., and Leibel, R.L. (2000). Lessons From Rodent Models of Obesity. In *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.
- Myers, M.G., Leibel, R.L., Seeley, R.J., and Schwartz, M.W. (2010). Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends Endocrinol. Metab.* 21, 643–651.
- Myers, M.G., Münzberg, H., Leininger, G.M., and Leshan, R.L. (2009). The Geometry of Leptin Action in the Brain: More Complicated Than a Simple ARC. *Cell Metabolism* 9, 117–123.
- Myers, M.P., Andersen, J.N., Cheng, A., Tremblay, M.L., Horvath, C.M., Parisien, J.P., Salmeen, A., Barford, D., and Tonks, N.K. (2001). TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* 276, 47771–47774.
- Nahon, J.-L. (2006). The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *C. R. Biol.* 329, 623–638; discussion 653–655.
- Nakano, Y., Furube, E., Morita, S., Wanaka, A., Nakashima, T., and Miyata, S. (2015). Astrocytic TLR4 expression and LPS-induced nuclear translocation of STAT3 in the sensory circumventricular organs of adult mouse brain. *Journal of Neuroimmunology* 278, 144–158.

- Nakashima, K., Narasaki, M., and Taga, T. (1997). Leptin receptor (OB-R) oligomerizes with itself but not with its closely related cytokine signal transducer gp130. *FEBS Lett.* 403, 79–82.
- Nedergaard, J., Bengtsson, T., and Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E444-452.
- Neel, J.V. (1962). Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *Am. J. Hum. Genet.* 14, 353–362.
- Neuhaus, J., Risau, W., and Wolburg, H. (1991). Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 633, 578–580.
- Niemann, H., Blasi, J., and Jahn, R. (1994). Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* 4, 179–185.
- Nilaweera, K., Herwig, A., Bolborea, M., Campbell, G., Mayer, C.D., Morgan, P.J., Ebling, F.J.P., and Barrett, P. (2011). Photoperiodic regulation of glycogen metabolism, glycolysis, and glutamine synthesis in tanycytes of the Siberian hamster suggests novel roles of tanycytes in hypothalamic function. *Glia* 59, 1695–1705.
- Niswender, K.D., Morton, G.J., Stearns, W.H., Rhodes, C.J., Myers, M.G., and Schwartz, M.W. (2001). Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 413, 794–795.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 161, 653–660.
- Niv-Spector, L., Gonon-Berger, D., Gourdou, I., Biener, E., Gussakovskiy, E.E., Benomar, Y., Ramanujan, K.V., Taouis, M., Herman, B., Callebaut, I., et al. (2005). Identification of the hydrophobic strand in the A-B loop of leptin as major binding site III: implications for large-scale preparation of potent recombinant human and ovine leptin antagonists. *Biochem J* 391, 221-230.
- Nogueiras, R., López, M., and Diéguez, C. (2010). Regulation of lipid metabolism by energy availability: a role for the central nervous system. *Obes Rev* 11, 185–201.
- Nogueiras, R., Wiedmer, P., Perez-Tilve, D., Veyrat-Durebex, C., Keogh, J.M., Sutton, G.M., Pfluger, P.T., Castaneda, T.R., Neschen, S., Hofmann, S.M., et al. (2007). The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 117, 3475–3488.
- Nonogaki, K. (2000). New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia* 43, 533–549.
- Nourhaghghi, N., Teichert-Kuliszewska, K., Davis, J., Stewart, D.J., and Nag, S. (2003). Altered expression of angiopoietins during blood-brain barrier breakdown and angiogenesis. *Lab. Invest.* 83, 1211–1222.
- Obici, S., Feng, Z., Tan, J., Liu, L., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2001). Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J Clin Invest* 108, 1079-1085.
- Oh-I, S., Shimizu, H., Sato, T., Uehara, Y., Okada, S., and Mori, M. (2005). Molecular mechanisms associated with leptin resistance: n-3 polyunsaturated fatty acids induce alterations in the tight junction of the brain. *Cell Metabolism* 1, 331–341.
- Ohn, J.H., Kwak, S.H., Cho, Y.M., Lim, S., Jang, H.C., Park, K.S., and Cho, N.H. (2016). 10-year trajectory of beta-cell function and insulin sensitivity in the development of type 2 diabetes: a community-based prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 4, 27-34.

- Okada, S., York, D.A., Bray, G.A., and Erlanson-Albertsson, C. (1991). Enterostatin (Val-Pro-Asp-Pro-Arg), the activation peptide of procolipase, selectively reduces fat intake. *Physiol. Behav.* 49, 1185–1189.
- Oken, E., and Gillman, M.W. (2003). Fetal origins of obesity. *Obes. Res.* 11, 496–506.
- Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135–138.
- Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H., and Wayner, M.J. (1969). Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 222, 282–284.
- Orellana, J.A., Sáez, P.J., Cortés-Campos, C., Elizondo, R.J., Shoji, K.F., Contreras-Duarte, S., Figueroa, V., Velarde, V., Jiang, J.X., Nualart, F., et al. (2012). Glucose increases intracellular free Ca(2+) in tanycytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia* 60, 53–68.
- Ottaway, N., Mahbod, P., Rivero, B., Norman, L.A., Gertler, A., D'Alessio, D.A., and Perez-Tilve, D. (2015). Diet-induced obese mice retain endogenous leptin action. *Cell Metab.* 21, 877–882.
- Ottonello, L., Gnerre, P., Bertolotto, M., Mancini, M., Dapino, P., Russo, R., Garibotto, G., Barreca, T., and Dallegrì, F. (2004). Leptin as a uremic toxin interferes with neutrophil chemotaxis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15, 2366–2372.
- Ozcan, L., Ergin, A.S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., Myers, M.G., and Ozcan, U. (2009). Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab.* 9, 35–51.
- Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.-H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Görgün, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457–461.
- Padilla, S.L., Qiu, J., Soden, M.E., Sanz, E., Nestor, C.C., Barker, F.D., Quintana, A., Zweifel, L.S., Rønneklev, O.K., Kelly, M.J., et al. (2016). Agouti-related peptide neural circuits mediate adaptive behaviors in the starved state. *Nat. Neurosci.* 19, 734–741.
- Pan, W.W., and Myers, M.G., Jr. (2018). Leptin and the maintenance of elevated body weight. *Nat Rev Neurosci* 19, 95–105.
- Papas, M.A., Alberg, A.J., Ewing, R., Helzlsouer, K.J., Gary, T.L., and Klassen, A.C. (2007). The Built Environment and Obesity. *Epidemiologic Reviews* 29, 129–143.
- Paranjape, S.A., Chan, O., Zhu, W., Horblitt, A.M., Grillo, C.A., Wilson, S., Reagan, L., and Sherwin, R.S. (2011). Chronic reduction of insulin receptors in the ventromedial hypothalamus produces glucose intolerance and islet dysfunction in the absence of weight gain. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E978–983.
- Paranjape, S.A., Chan, O., Zhu, W., Horblitt, A.M., McNay, E.C., Cresswell, J.A., Bogan, J.S., McCrimmon, R.J., and Sherwin, R.S. (2010). Influence of insulin in the ventromedial hypothalamus on pancreatic glucagon secretion in vivo. *Diabetes* 59, 1521–1527.
- Park, S., Ahn, I.S., and Kim, D.S. (2010). Central infusion of leptin improves insulin resistance and suppresses β-cell function, but not β-cell mass, primarily through the sympathetic nervous system in a type 2 diabetic rat model. *Life Sciences* 86, 854–862.
- Parry, W.H., Martorano, F., and Cotton, E.K. (1976). Management of life-threatening asthma with intravenous isoproterenol infusions. *Am. J. Dis. Child.* 130, 39–42.

Patel SR, Hu FB. Short sleep duration and weight gain: a systematic review. *Obesity* 2008; 16: 643–653.

Patterson, C.M., Leshan, R.L., Jones, J.C., and Myers, M.G. (2011). Molecular mapping of mouse brain regions innervated by leptin receptor-expressing cells. *Brain Research* 1378, 18–28.

Pedroso, J.A.B., Buonfiglio, D.C., Cardinali, L.I., Furigo, I.C., Ramos-Lobo, A.M., Tirapegui, J., Elias, C.F., and Donato, J. (2014). Inactivation of SOCS3 in leptin receptor-expressing cells protects mice from diet-induced insulin resistance but does not prevent obesity. *Mol Metab* 3, 608–618.

Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K., and Edenofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4489-4494.

Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K., and Edenofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4489-4494.

Pellegrino, G., Trubert, C., Terrien, J., Pifferi, F., Leroy, D., Loyens, A., Migaud, M., Baroncini, M., Maurage, C.-A., Fontaine, C., et al. (2018). A comparative study of the neural stem cell niche in the adult hypothalamus of human, mouse, rat and gray mouse lemur (*Microcebus murinus*). *J. Comp. Neurol.* 526, 1419–1443.

Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., and Collins, F. (1995). Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 269, 540-543.

Peress, N.S., and Tompkins, D. (1981). Effect of molecular charge on choroid-plexus permeability: Tracer studies with cationized ferritins. *Cell Tissue Res.* 219, 425–431.

Perkins, M.N., Rothwell, N.J., Stock, M.J., and Stone, T.W. (1981). Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. *Nature* 289, 401–402.

Perry, R.J., Samuel, V.T., Petersen, K.F., and Shulman, G.I. (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 510, 84–91.

Petrov, T., Howarth, A.G., Krukoff, T.L., and Stevenson, B.R. (1994). Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 21, 235–246.

Piper, M.L., Unger, E.K., Myers, M.G., and Xu, A.W. (2008). Specific physiological roles for signal transducer and activator of transcription 3 in leptin receptor-expressing neurons. *Mol. Endocrinol.* 22, 751–759.

Plum, F. (1988). The physiology and pathophysiology of the cerebrospinal fluid by Hugh Davson, Keasley Welch, and Malcolm B. Segal New York. Livingstone, 1987 1013 pp. illustrated, \$198.00. *Annals of Neurology* 24, 106–106.

Plum, L., Rother, E., Münzberg, H., Wunderlich, F.T., Morgan, D.A., Hampel, B., Shanabrough, M., Janoschek, R., Könner, A.C., Alber, J., et al. (2007). Enhanced leptin-stimulated PI3k activation in the CNS promotes white adipose tissue transdifferentiation. *Cell Metab.* 6, 431–445.

Posey, K.A., Clegg, D.J., Printz, R.L., Byun, J., Morton, G.J., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., Baskin, D.G., Heinecke, J.W., Woods, S.C., et al. (2009). Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E1003-1012.

- Powis, J.E., Bains, J.S., and Ferguson, A.V. (1998). Leptin depolarizes rat hypothalamic paraventricular nucleus neurons. *Am. J. Physiol.* 274, R1468-1472.
- Praetorius, J., and Damkier, H.H. (2017). Transport across the choroid plexus epithelium. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 312, C673-C686.
- Prentki, M., and Nolan, C.J. (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116, 1802-1812.
- Prevot, V., Cornea, A., Mungenast, A., Smiley, G., and Ojeda, S.R. (2003). Activation of erbB-1 signaling in tanycytes of the median eminence stimulates transforming growth factor beta1 release via prostaglandin E2 production and induces cell plasticity. *JNeurosci* 23, 10622-10632.
- Prevot, V., Dehouck, B., Poulain, P., Beauvillain, J.-C., Buée-Scherrer, V., and Bouret, S. (2007). Neuronal-glial-endothelial interactions and cell plasticity in the postnatal hypothalamus: implications for the neuroendocrine control of reproduction. *Psychoneuroendocrinology* 32 Suppl 1, S46-51.
- Prevot, V., Dehouck, B., Sharif, A., Ciofi, P., Giacobini, P., and Clasadonte, J. (2018). The Versatile Tanyocyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr Rev* 39, 333-368.
- Prevot, V., Langlet, F., and Dehouck, B. (2013). Flipping the tanyocyte switch: how circulating signals gain direct access to the metabolic brain. *Aging (Albany NY)* 5, 332-334.
- Qiu, J., Zhang, C., Borgquist, A., Nestor, C.C., Smith, A.W., Bosch, M.A., Ku, S., Wagner, E.J., Rønneklev, O.K., and Kelly, M.J. (2014). Insulin Excites Anorexigenic Proopiomelanocortin Neurons via Activation of Canonical Transient Receptor Potential Channels. *Cell Metabolism* 19, 682-693.
- Quintela, T., Sousa, C., Patriarca, F.M., Gonçalves, I., and Santos, C.R.A. (2015). Gender associated circadian oscillations of the clock genes in rat choroid plexus. *Brain Struct Funct* 220, 1251-1262.
- Rabhi, N., Denechaud, P.-D., Gromada, X., Hannou, S.A., Zhang, H., Rashid, T., Salas, E., Durand, E., Sand, O., Bonnefond, A., et al. (2016). KAT2B Is Required for Pancreatic Beta Cell Adaptation to Metabolic Stress by Controlling the Unfolded Protein Response. *Cell Reports* 15, 1051-1061.
- Racioppi, L., and Means, A.R. (2012). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology. *J. Biol. Chem.* 287, 31658-31665.
- Rahmouni, K., Sigmund, C.D., Haynes, W.G., and Mark, A.L. (2009). Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes* 58, 536-542.
- Ramnanan, C.J., Edgerton, D.S., Kraft, G., and Cherrington, A.D. (2011). Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes Obes Metab* 13 Suppl 1, 118-125.
- Rapoport, S.I., and Pettigrew, K.D. (1979). A heterogenous, pore-vesicle membrane model for protein transfer from blood to cerebrospinal fluid at the choroid plexus. *Microvasc. Res.* 18, 105-119.
- Raposinho, P.D., White, R.B., and Aubert, M.L. (2003). The melanocortin agonist Melanotan-II reduces the orexigenic and adipogenic effects of neuropeptide Y (NPY) but does not affect the NPY-driven suppressive effects on the gonadotropic and somatotropic axes in the male rat. *J. Neuroendocrinol.* 15, 173-181.
- Rasmussen, D.D., Boldt, B.M., Wilkinson, C.W., Yellon, S.M., and Matsumoto, A.M. (1999). Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. *Endocrinology* 140, 1009-1012.

- Redecker, P. (1989). Immunogold electron microscopic localization of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in neurohypophyseal pituicytes and tanyocytes of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Histochemistry* 91, 333–337.
- Reese, T.S., and Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34, 207–217.
- Reiber, H. (1994). Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)—a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *J. Neurol. Sci.* 122, 189–203.
- Ren, D., Li, M., Duan, C., and Rui, L. (2005). Identification of SH2-B as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice. *Cell Metab.* 2, 95–104.
- Rezai-Zadeh, K., Yu, S., Jiang, Y., Laque, A., Schwartzenburg, C., Morrison, C.D., Derbenev, A.V., Zsombok, A., and Münzberg, H. (2014). Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. *Mol Metab.* 3, 681–693.
- Ricquier, D., Casteilla, L., and Bouillaud, F. (1991). Molecular studies of the uncoupling protein. *FASEB J.* 5, 2237–2242.
- Rinaman, L., and Miselis, R.R. (1987). The organization of vagal innervation of rat pancreas using cholera toxin-horseradish peroxidase conjugate. *J. Auton. Nerv. Syst.* 21, 109–125.
- Ritter, R.C. (2004). Gastrointestinal mechanisms of satiation for food. *Physiol. Behav.* 81, 249–273.
- Roberts, L.M., Black, D.S., Raman, C., Woodford, K., Zhou, M., Haggerty, J.E., Yan, A.T., Cwirla, S.E., and Grindstaff, K.K. (2008). Subcellular localization of transporters along the rat blood–brain barrier and blood–cerebral-spinal fluid barrier by *in vivo* biotinylation. *Neuroscience* 155, 423–438.
- Roberts, L.M., Woodford, K., Zhou, M., Black, D.S., Haggerty, J.E., Tate, E.H., Grindstaff, K.K., Mengesha, W., Raman, C., and Zerangue, N. (2008). Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLCO1C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology* 149, 6251–6261.
- Robins, S.C., Stewart, I., McNay, D.E., Taylor, V., Giachino, C., Goetz, M., Ninkovic, J., Briancon, N., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., et al. (2013).  $\alpha$ -Tanyocytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat Commun* 4, 2049.
- Rodriguez-Diaz, R., and Caicedo, A. (2014). Neural control of the endocrine pancreas. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 745–756.
- Roman, E.A.F.R., Reis, D., Romanatto, T., Maimoni, D., Ferreira, E.A., Santos, G.A., Torsoni, A.S., Velloso, L.A., and Torsoni, M.A. (2010). Central leptin action improves skeletal muscle AKT, AMPK, and PGC1 alpha activation by hypothalamic PI3K-dependent mechanism. *Mol. Cell. Endocrinol.* 314, 62–69.
- Rosengren, A.H., Jokubka, R., Tojjar, D., Granhall, C., Hansson, O., Li, D.Q., Nagaraj, V., Reinbothe, T.M., Tuncel, J., Eliasson, L., et al. (2010). Overexpression of alpha2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes. *Science* 327, 217–220.
- Rosenthal, R., Günzel, D., Krug, S.M., Schulzke, J.-D., Fromm, M., and Yu, A.S.L. (2017). Claudin-2-mediated cation and water transport share a common pore. *Acta Physiol (Oxf)* 219, 521–536.
- Rossi, J., Balthasar, N., Olson, D., Scott, M., Berglund, E., Lee, C.E., Choi, M.J., Lauzon, D., Lowell, B.B., and Elmquist, J.K. (2011). Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab.* 13, 195–204.

- Routh, V.H. (2002). Glucose-sensing neurons: are they physiologically relevant? *Physiol. Behav.* **76**, 403–413.
- Ruan, H.-B., Dietrich, M.O., Liu, Z.-W., Zimmer, M.R., Li, M.-D., Singh, J.P., Zhang, K., Yin, R., Wu, J., Horvath, T.L., et al. (2014). O-GlcNAc transferase enables AgRP neurons to suppress browning of white fat. *Cell* **159**, 306–317.
- Ruffin, M., and Nicolaidis, S. (1999). Electrical stimulation of the ventromedial hypothalamus enhances both fat utilization and metabolic rate that precede and parallel the inhibition of feeding behavior. *Brain Res.* **846**, 23–29.
- Ruggiano, A., Foresti, O., and Carvalho, P. (2014). Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J. Cell Biol.* **204**, 869–879.
- Rutkowski, D.T., Arnold, S.M., Miller, C.N., Wu, J., Li, J., Gunnison, K.M., Mori, K., Sadighi Akha, A.A., Raden, D., and Kaufman, R.J. (2006). Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* **4**, e374.
- Saaltink, D.-J., Håvik, B., Verissimo, C.S., Lucassen, P.J., and Vreugdenhil, E. (2012). Doublecortin and doublecortin-like are expressed in overlapping and non-overlapping neuronal cell population: implications for neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* **520**, 2805–2823.
- Salvatierra, J., Lee, D.A., Zibetti, C., Duran-Moreno, M., Yoo, S., Newman, E.A., Wang, H., Bedont, J.L., de Melo, J., Miranda-Angulo, A.L., et al. (2014). The LIM homeodomain factor Lhx2 is required for hypothalamic tanyocyte specification and differentiation. *J. Neurosci.* **34**, 16809–16820.
- Sánchez, E., Vargas, M.A., Singru, P.S., Pascual, I., Romero, F., Fekete, C., Charli, J.-L., and Lechan, R.M. (2009). Tanyocyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology* **150**, 2283–2291.
- Sanchez-Margalef, V., and Martin-Romero, C. (2001). Human leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells: activation of the JAK-STAT pathway. *Cell. Immunol.* **211**, 30–36.
- Sánchez-Margalef, V., Martín-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Najib, S., and Gonzalez-Yanes, C. (2003). Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin. Exp. Immunol.* **133**, 11–19.
- Sanders, N.M., Dunn-Meynell, A.A., and Levin, B.E. (2004). Third ventricular alloxan reversibly impairs glucose counterregulatory responses. *Diabetes* **53**, 1230–1236.
- Sarruf, D.A., Yu, F., Nguyen, H.T., Williams, D.L., Printz, R.L., Niswender, K.D., and Schwartz, M.W. (2009). Expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in key neuronal subsets regulating glucose metabolism and energy homeostasis. *Endocrinology* **150**, 707–712.
- Schaeffer, M., Langlet, F., Lafont, C., Molino, F., Hodson, D.J., Roux, T., Lamarque, L., Verdié, P., Bourrier, E., Dehouck, B., et al. (2013). Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 1512–1517.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R., and Montecucco, C. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359**, 832–835.
- Schoeller, D.A. (1998). Balancing energy expenditure and body weight. *The American Journal of Clinical Nutrition* **68**, 956S–961S.
- Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Bukowski, T.R., Kuijper, J.L., Foster, D., Lasser, G., Prunkard, D.E., Porte, D., Jr., Woods, S.C., Seeley, R.J., et al. (1996). Specificity of leptin action on elevated blood

glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45, 531–535.

Schwartz, M.W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E.J., and Porte, D. (1996). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med.* 2, 589–593.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661–671.

Scott, M.M., Lachey, J.L., Sternson, S.M., Lee, C.E., Elias, C.F., Friedman, J.M., and Elmquist, J.K. (2009). Leptin targets in the mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology* 514, 518–532.

Serot, J.-M., Zmudka, J., and Jouanny, P. (2012). A Possible Role for CSF Turnover and Choroid Plexus in the Pathogenesis of Late Onset Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 30, 17–26.

Shah, B.P., Vong, L., Olson, D.P., Koda, S., Krashes, M.J., Ye, C., Yang, Z., Fuller, P.M., Elmquist, J.K., and Lowell, B.B. (2014). MC4R-expressing glutamatergic neurons in the paraventricular hypothalamus regulate feeding and are synaptically connected to the parabrachial nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 13193–13198.

Shanley, L.J., Irving, A.J., and Harvey, J. (2001). Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity. *J. Neurosci.* 21, RC186.

Shen, J., Tanida, M., Yao, J.-F., Niijima, A., and Nagai, K. (2008). Biphasic effects of orexin-A on autonomic nerve activity and lipolysis. *Neurosci. Lett.* 444, 166–171.

Shepro, D., and Morel, N.M. (1993). Pericyte physiology. *FASEB J.* 7, 1031–1038.

Shi, H., and Bartness, T.J. (2001). Neurochemical phenotype of sympathetic nervous system outflow from brain to white fat. *Brain Res. Bull.* 54, 375–385.

Shi, X., Wang, X., Li, Q., Su, M., Chew, E., Wong, E.T., Lacza, Z., Radda, G.K., Tergaonkar, V., and Han, W. (2013). Nuclear factor κB (NF-κB) suppresses food intake and energy expenditure in mice by directly activating the Pomp promoter. *Diabetologia* 56, 925–936.

Shi, Y.-C., Lau, J., Lin, Z., Zhang, H., Zhai, L., Sperk, G., Heilbronn, R., Mietzsch, M., Weger, S., Huang, X.-F., et al. (2013). Arcuate NPY controls sympathetic output and BAT function via a relay of tyrosine hydroxylase neurons in the PVN. *Cell Metab.* 17, 236–248.

Shimazu, T. (1979). Nervous control of peripheral metabolism. *Acta Physiol Pol* 30, 1–18.

Shimazu, T., and Fujimoto, T. (1971). Regulation of glycogen metabolism in liver by the autonomic nervous system. IV. Neural control of glycogen biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 252, 18–27.

Shimazu, T., and Ogasawara, S. (1975). Effects of hypothalamic stimulation on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver. *Am. J. Physiol.* 228, 1787–1793.

Shimazu, T., Sudo, M., Minokoshi, Y., and Takahashi, A. (1991). Role of the hypothalamus in insulin-independent glucose uptake in peripheral tissues. *Brain Res. Bull.* 27, 501–504.

Shiuchi, T., Haque, M.S., Okamoto, S., Inoue, T., Kageyama, H., Lee, S., Toda, C., Suzuki, A., Bachman, E.S., Kim, Y.-B., et al. (2009). Hypothalamic orexin stimulates feeding-associated glucose utilization in skeletal muscle via sympathetic nervous system. *Cell Metab.* 10, 466–480.

Sidibe, A., Mullier, A., Chen, P., Baroncini, M., Boutin, J.A., Delagrange, P., Prevot, V., and Jockers, R. (2010). Expression of the orphan GPR50 protein in rodent and human dorsomedial hypothalamus, tanycytes and median eminence. *J. Pineal Res.* 48, 263–269.

- Silva, J.E. (1995). Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 5, 481–492.
- Sims, D.E. (1986). The pericyte--a review. *Tissue Cell* 18, 153–174.
- Sinha, M.K., Opentanova, I., Ohannesian, J.P., Kolaczynski, J.W., Heiman, M.L., Hale, J., Becker, G.W., Bowsher, R.R., Stephens, T.W., and Caro, J.F. (1996). Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting. *J. Clin. Invest.* 98, 1277–1282.
- Sisó, S., Jeffrey, M., and González, L. (2010). Sensory circumventricular organs in health and disease. *Acta Neuropathologica* 120, 689–705.
- Slezak, M., Grosche, A., Niemiec, A., Tanimoto, N., Pannicke, T., Munch, T.A., Crocker, B., Isope, P., Hartig, W., Beck, S.C., et al. (2012). Relevance of exocytotic glutamate release from retinal glia. *Neuron* 74, 504–516.
- Sohn, J.W., Harris, L.E., Berglund, E.D., Liu, T., Vong, L., Lowell, B.B., Balthasar, N., Williams, K.W., and Elmquist, J.K. (2013). Melanocortin 4 receptors reciprocally regulate sympathetic and parasympathetic preganglionic neurons. *Cell* 152, 612–619.
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318–324.
- Song, C.K., Jackson, R.M., Harris, R.B.S., Richard, D., and Bartness, T.J. (2005). Melanocortin-4 receptor mRNA is expressed in sympathetic nervous system outflow neurons to white adipose tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1467–1476.
- Spector, R., and Johanson, C. (2006). Micronutrient and urate transport in choroid plexus and kidney: implications for drug therapy. *Pharm. Res.* 23, 2515–2524.
- Spiegel K, Tasali E, Penev P, Van Cauter E. Brief communication: sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Ann Intern Med* 2004; 141: 846–850.
- Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M., Murray, L.J., Rayner, J.R., Jenkins, B.J., Gonda, T.J., Alexander, W.S., Metcalf, D., Nicola, N.A., et al. (1997). A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387, 917–921.
- Ste Marie, L., Miura, G.I., Marsh, D.J., Yagaloff, K., and Palmiter, R.D. (2000). A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 12339–12344.
- Steculorum, S.M., Ruud, J., Karakasilioti, I., Backes, H., Engström Ruud, L., Timper, K., Hess, M.E., Tsiaousidou, E., Mauer, J., Vogt, M.C., et al. (2016). AgRP Neurons Control Systemic Insulin Sensitivity via Myostatin Expression in Brown Adipose Tissue. *Cell* 165, 125–138.
- Steil, G.M., Trivedi, N., Jonas, J.C., Hasenkamp, W.M., Sharma, A., Bonner-Weir, S., and Weir, G.C. (2001). Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E788–796.
- Steyn, F.J., Ngo, S.T., Chen, V.P., Bailey-Downs, L.C., Xie, T.Y., Ghadami, M., Brimijoin, S., Freeman, W.M., Rubinstein, M., Low, M.J., et al. (2018). 17 $\alpha$ -estradiol acts through hypothalamic pro-opiomelanocortin expressing neurons to reduce feeding behavior. *Aging Cell* 17.
- Strazielle, N., and Ghersi-Egea, J.-F. (2016). Potential Pathways for CNS Drug Delivery Across the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier. *Curr. Pharm. Des.* 22, 5463–5476.

Student (1908). The probable error of a mean. *Biometrika* 6, 1-25.

Su, Z., Alhadef, A.L., and Betley, J.N. (2017). Nutritive, Post-ingestive Signals Are the Primary Regulators of AgRP Neuron Activity. *Cell Rep* 21, 2724–2736.

Sudo, M., Minokoshi, Y., and Shimazu, T. (1991). Ventromedial hypothalamic stimulation enhances peripheral glucose uptake in anesthetized rats. *Am. J. Physiol.* 261, E298-303.

Sukumaran, S., Xue, B., Jusko, W.J., Dubois, D.C., and Almon, R.R. (2010). Circadian variations in gene expression in rat abdominal adipose tissue and relationship to physiology. *Physiol Genomics* 42A, 141-152.

Swart, I., Jahng, J.W., Overton, J.M., and Houpt, T.A. (2002). Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283, R1020-1026.

Swinburn, B.A., Kraak, V.I., Allender, S., Atkins, V.J., Baker, P.I., Bogard, J.R., Brinsden, H., Calvillo, A., De Schutter, O., Devarajan, R., et al. (2019). The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *Lancet* 393, 791-846.

Szabo, O., and Szabo, A.J. (1975). Studies on the nature and mode of action of the insulin-sensitive glucoregulator receptor in the central nervous system. *Diabetes* 24, 328–336.

Szmydynger-Chodobska, J., Chodobska, A., and Johanson, C.E. (1994). Postnatal developmental changes in blood flow to choroid plexuses and cerebral cortex of the rat. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 266, R1488-R1492.

Taddei, A., Giampietro, C., Conti, A., Orsenigo, F., Breviario, F., Pirazzoli, V., Potente, M., Daly, C., Dimmeler, S., and Dejana, E. (2008). Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat. Cell Biol.* 10, 923–934.

Takeda, S., Elefteriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K.L., Armstrong, D., Ducy, P., and Karsenty, G. (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111, 305–317.

Tang, F., Lane, S., Korsak, A., Paton, J.F.R., Gourine, A.V., Kasparov, S., and Teschemacher, A.G. (2014). Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain. *Nat Commun* 5, 3284.

Tena-Sempere, M. (2008). Ghrelin as a pleiotrophic modulator of gonadal function and reproduction. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 4, 666–674.

Thaler, J.P., Guyenet, S.J., Dorfman, M.D., Wisse, B.E., and Schwartz, M.W. (2013). Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis? *Diabetes* 62, 2629–2634.

Thomzig, A., Laube, G., Prüss, H., and Veh, R.W. (2005). Pore-forming subunits of K-ATP channels, Kir6.1 and Kir6.2, display prominent differences in regional and cellular distribution in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 484, 313–330.

Thorens, B. (2014). Neural regulation of pancreatic islet cell mass and function. *Diabetes Obes Metab* 16 Suppl 1, 87–95.

Tian, Z., Sun, R., Wei, H., and Gao, B. (2002). Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298, 297–302.

Toledano-Katchalski, H., Kraut, J., Sines, T., Granot-Attas, S., Shohat, G., Gil-Henn, H., Yung, Y., and Elson, A. (2003). Protein tyrosine phosphatase epsilon inhibits signaling by mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cancer Res.* 1, 541–550.

Tolle, V., and Low, M.J. (2008). In vivo evidence for inverse agonism of Agouti-related peptide in the central nervous system of proopiomelanocortin-deficient mice. *Diabetes* 57, 86–94.

Tong, Q., Ye, C., McCrimmon, R.J., Dhillon, H., Choi, B., Kramer, M.D., Yu, J., Yang, Z., Christiansen, L.M., Lee, C.E., et al. (2007). Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metab.* 5, 383–393.

Torres SJ, Nowson CA (2007): Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23:887–894.

Trayhurn, P., Hoggard, N., Mercer, J.G., and Rayner, D.V. (1999). Leptin: fundamental aspects. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23 Suppl 1, 22–28.

Tschop, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908–913.

Tsuneki, H., Tokai, E., Nakamura, Y., Takahashi, K., Fujita, M., Asaoka, T., Kon, K., Anzawa, Y., Wada, T., Takasaki, I., et al. (2015). Hypothalamic orexin prevents hepatic insulin resistance via daily bidirectional regulation of autonomic nervous system in mice. *Diabetes* 64, 459–470.

Tuomi, T., Santoro, N., Caprio, S., Cai, M., Weng, J., and Groop, L. (2014). The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet* 383, 1084–1094.

Ueno, M., Akitani, I., Hosokawa, M., Kotani, H., Kanenishi, K., and Sakamoto, H. (2000). Blood-brain barrier permeability in the periventricular areas of the normal mouse brain. *Acta Neuropathologica* 99, 385–392.

Ulken, V., Püschel, G.P., and Jungermann, K. (1991). Increase in glucose and lactate output and perfusion resistance by stimulation of hepatic nerves in isolated perfused rat liver: role of alpha 1-, alpha 2-, beta 1- and beta 2-receptors. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 372, 401–409.

Uranga, R.M., Millán, C., Barahona, M.J., Recabal, A., Salgado, M., Martínez, F., Ordenes, P., Elizondo-Vega, R., Sepúlveda, F., Uribe, E., et al. (2017). Adenovirus-mediated suppression of hypothalamic glucokinase affects feeding behavior. *Sci Rep* 7, 3697.

van Baak, M.A. (2001). The peripheral sympathetic nervous system in human obesity. *Obes Rev* 2, 3–14.

van de Wall, E., Leshan, R., Xu, A.W., Balthasar, N., Coppari, R., Liu, S.M., Jo, Y.H., MacKenzie, R.G., Allison, D.B., Dun, N.J., et al. (2008). Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* 149, 1773–1785.

van den Hoek, A.M., van Heijningen, C., Schröder-van der Elst, J.P., Ouwens, D.M., Havekes, L.M., Romijn, J.A., Kalsbeek, A., and Pijl, H. (2008). Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y induces hepatic insulin resistance via sympathetic innervation. *Diabetes* 57, 2304–2310.

van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M.A.F.L., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., and Teule, G.J.J. (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N. Engl. J. Med.* 360, 1500–1508.

Vanhaesebrouck, B., Stephens, L., and Hawkins, P. (2012). PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 195–203.

Vaughan, C.H., Zarebidaki, E., Ehlen, J.C., and Bartness, T.J. (2014). Analysis and measurement of the sympathetic and sensory innervation of white and brown adipose tissue. *Meth. Enzymol.* 537, 199–225.

- Vauthier, V., Derviaux, C., Douayry, N., Roux, T., Trinquet, E., Jockers, R., and Dam, J. (2013). Design and validation of a homogeneous time-resolved fluorescence-based leptin receptor binding assay. *Anal Biochem* 436, 1-9.
- Vauthier, V., Roujeau, C., Chen, P., Sarkis, C., Migrenne, S., Hosoi, T., Ozawa, K., Rouille, Y., Foretz, M., Mallet, J., et al. (2017). Endospanin1 affects oppositely body weight regulation and glucose homeostasis by differentially regulating central leptin signaling. *Mol Metab* 6, 159-172.
- Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S., and Lowell, B.B. (2011). Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons. *Neuron* 71, 142–154.
- Wakai, S., and Hirokawa, N. (1981). Development of blood-cerebrospinal fluid barrier to horseradish peroxidase in the avian choroidal epithelium. *Cell Tissue Res.* 214, 271–278.
- Walter, P., and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334, 1081–1086.
- Wang, D., He, X., Zhao, Z., Feng, Q., Lin, R., Sun, Y., Ding, T., Xu, F., Luo, M., and Zhan, C. (2015). Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Front Neuroanat* 9, 40.
- Wang, M.-Y., Yan, T.Z., Newgard, C.B., and Unger, R.H. (1996). A novel leptin receptor isoform in rat. *FEBS Letters* 392, 87–90.
- Wang, Y., Ziogas, D.C., Biddinger, S., and Kokkotou, E. (2010). You deserve what you eat: lessons learned from the study of the melanin-concentrating hormone (MCH)-deficient mice. *Gut* 59, 1625–1634.
- Watanabe, E., Hiyama, T.Y., Shimizu, H., Kodama, R., Hayashi, N., Miyata, S., Yanagawa, Y., Obata, K., and Noda, M. (2006). Sodium-level-sensitive sodium channel  $\text{Na}_x$  is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290, R568–R576.
- Watanobe, H. (2002). Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion in vivo in rats. *J. Physiol. (Lond.)* 545, 255–268.
- Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2004). Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3, S16-21.
- Whish, S., Dziegielewska, K.M., Mālik, K., Noor, N.M., Liddelow, S.A., Habgood, M.D., Richardson, S.J., and Saunders, N.R. (2015). The inner CSF–“brain barrier”: developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions. *Frontiers in Neuroscience* 9.
- White, C.L., Whittington, A., Barnes, M.J., Wang, Z., Bray, G.A., and Morrison, C.D. (2009). HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 296, E291-299.
- White, D.W., and Tartaglia, L.A. (1999). Evidence for ligand-independent homo-oligomerization of leptin receptor (OB-R) isoforms: a proposed mechanism permitting productive long-form signaling in the presence of excess short-form expression. *J. Cell. Biochem.* 73, 278–288.
- Williams, K.W., Liu, T., Kong, X., Fukuda, M., Deng, Y., Berglund, E.D., Deng, Z., Gao, Y., Liu, T., Sohn, J.-W., et al. (2014). Xbp1s in Pomc neurons connects ER stress with energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab.* 20, 471–482.
- Wolburg, H., and Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* 38, 323–337.

- Wolburg, H., and Paulus, W. (2010). Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 75–88.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E.M., Ocalan, M., Farrell, C., and Risau, W. (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J. Cell Sci.* **107**, 1347.
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., and Fallier-Becker, P. (2009). Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* **335**, 75–96.
- Won, J.C., Jang, P.-G., Namkoong, C., Koh, E.H., Kim, S.K., Park, J.-Y., Lee, K.-U., and Kim, M.-S. (2009). Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity (Silver Spring)* **17**, 1861–1865.
- Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M.J., Liao, Y., Thiagarajan, M., O'Donnell, J., Christensen, D.J., Nicholson, C., Iliff, J.J., et al. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science* **342**, 373–377.
- Xu, J., Bernstein, A.M., Wong, A., Lu, X.-H., Khoja, S., Yang, X.W., Davies, D.L., Micevych, P., Sofroniew, M.V., and Khakh, B.S. (2016). P2X4 Receptor Reporter Mice: Sparse Brain Expression and Feeding-Related Presynaptic Facilitation in the Arcuate Nucleus. *J. Neurosci.* **36**, 8902–8920.
- Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M., and Ide, C. (2005). Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp. Neurol.* **192**, 251–264.
- Yadav, V.K., Oury, F., Suda, N., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Confavreux, C., Klemenhagen, K.C., Tanaka, K.F., Gingrich, J.A., Guo, X.E., et al. (2009). A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure. *Cell* **138**, 976–989.
- Yajnik, C.S. (2004). Early life origins of insulin resistance and type 2 diabetes in India and other Asian countries. *J. Nutr.* **134**, 205–210.
- Yamauchi, T., Iwai, M., Kobayashi, N., and Shimazu, T. (1998). Noradrenaline and ATP decrease the secretion of triglyceride and apoprotein B from perfused rat liver. *Pflugers Arch.* **435**, 368–374.
- Yang, L., Qi, Y., and Yang, Y. (2015). Astrocytes control food intake by inhibiting AGRP neuron activity via adenosine A1 receptors. *Cell Rep* **11**, 798–807.
- Yeo, G.S., Farooqi, I.S., Aminian, S., Halsall, D.J., Stanhope, R.G., and O'Rahilly, S. (1998). A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat. Genet.* **20**, 111–112.
- Yi, C.-X., la Fleur, S.E., Fliers, E., and Kalsbeek, A. (2010). The role of the autonomic nervous liver innervation in the control of energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1802**, 416–431.
- Yi, C.-X., Serlie, M.J., Ackermans, M.T., Foppen, E., Buijs, R.M., Sauerwein, H.P., Fliers, E., and Kalsbeek, A. (2009). A major role for perifornical orexin neurons in the control of glucose metabolism in rats. *Diabetes* **58**, 1998–2005.
- Yoo, S., Cha, D., Kim, D.W., Hoang, T.V., and Blackshaw, S. (2019). Tanyocyte-Independent Control of Hypothalamic Leptin Signaling. *Front Neurosci* **13**, 240.
- Yoon, K.H., Lee, J.H., Kim, J.W., Cho, J.H., Choi, Y.H., Ko, S.H., Zimmet, P., and Son, H.Y. (2006). Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. *Lancet* **368**, 1681–1688.
- Yuan, X., Caron, A., Wu, H., and Gautron, L. (2018). Leptin Receptor Expression in Mouse Intracranial Perivascular Cells. *Front Neuroanat* **12**, 4.

- Yulyaningsih, E., Rudenko, I.A., Valdearcos, M., Dahlen, E., Vagena, E., Chan, A., Alvarez-Buylla, A., Vaisse, C., Koliwad, S.K., and Xu, A.W. (2017). Acute Lesioning and Rapid Repair of Hypothalamic Neurons outside the Blood-Brain Barrier. *Cell Rep* 19, 2257-2271.
- Zabolotny, J.M., Kim, Y.-B., Welsh, L.A., Kershaw, E.E., Neel, B.G., and Kahn, B.B. (2008). Protein-tirosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J. Biol. Chem.* 283, 14230–14241.
- Zarjevski, N., Cusin, I., Vettor, R., Rohner-Jeanrenaud, F., and Jeanrenaud, B. (1993). Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133, 1753–1758.
- Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, A.G., Wu, Z., Hellewell, P.G., Weetman, A.P., and Ross, R.J.M. (2004). Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF-alpha. *J. Immunol.* 172, 1809–1814.
- Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, G., Metcalfe, R.A., Bidlingmaier, M., Wu, Z., Ajami, A., Weetman, A.P., Strasburger, C.J., and Ross, R.J. (2001). High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J. Immunol.* 167, 4593–4599.
- Zeevi, N., Pachter, J., McCullough, L.D., Wolfson, L., and Kuchel, G.A. (2010). The blood-brain barrier: geriatric relevance of a critical brain-body interface. *J Am Geriatr Soc* 58, 1749–1757.
- Zhang, F., Basinski, M.B., Beals, J.M., Briggs, S.L., Churgay, L.M., Clawson, D.K., DiMarchi, R.D., Furman, T.C., Hale, J.E., Hsiung, H.M., et al. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387, 206–209.
- Zhang, R., Dhillon, H., Yin, H., Yoshimura, A., Lowell, B.B., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. (2008). Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. *Endocrinology* 149, 5654–5661.
- Zhang, W., Sunanaga, J., Takahashi, Y., Mori, T., Sakurai, T., Kanmura, Y., and Kuwaki, T. (2010). Orexin neurons are indispensable for stress-induced thermogenesis in mice. *J. Physiol. (Lond.)* 588, 4117–4129.
- Zhang, X., Dong, F., Ren, J., Driscoll, M.J., and Culver, B. (2005). High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Exp. Neurol.* 191, 318–325.
- Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., and Cai, D. (2008). Hypothalamic IKK $\beta$ /NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135, 61–73.
- Zhang, Y., Hoon, M.A., Chandrashekar, J., Mueller, K.L., Cook, B., Wu, D., Zuker, C.S., and Ryba, N.J.P. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112, 293–301.
- Zhang, Y., Kilroy, G.E., Henagan, T.M., Prpic-Uhing, V., Richards, W.G., Bannon, A.W., Mynatt, R.L., and Gettys, T.W. (2005). Targeted deletion of melanocortin receptor subtypes 3 and 4, but not CART, alters nutrient partitioning and compromises behavioral and metabolic responses to leptin. *FASEB J.* 19, 1482–1491.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.
- Zhao, Y., Sun, R., You, L., Gao, C., and Tian, Z. (2003). Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 247–252.

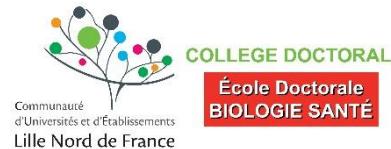
Zhou, Y., Gerrard, D.L., Wang, J., Li, T., Yang, Y., Fritz, A.J., Rajendran, M., Fu, X., Schiff, R., Lin, S., et al. (2019). Temporal dynamic reorganization of 3D chromatin architecture in hormone-induced breast cancer and endocrine resistance. *Nat Commun* 10, 1522.



## Résumé

**Titre :** Les tanyocytes véhiculent la leptine dans le cerveau métabolique : mécanismes moléculaires et rôle dans la physiopathologie de la résistance hormonale et l'obésité/diabète

**Mots clés :** Leptine, Hypothalamus, Tanyocyte, Obésité, Diabète



Le contrôle de la balance énergétique, permettant le maintien de la masse corporelle nécessite un dialogue continu entre la périphérie et l'hypothalamus dans le cerveau. L'accès des hormones périphériques à cette structure cérébrale est essentielle au bon fonctionnement des circuits neuronaux qui régule l'homéostasie énergétique. Toutefois, peu d'éléments concernant sur les mécanismes de transport de ces signaux métaboliques à l'hypothalamus sont actuellement connus. L'éminence médiane, une structure hypothalamique formant le plancher du 3<sup>e</sup> ventricule, contient des cellules épendymogliales hautement spécialisées appelées tanyocytes. Il a été démontré que les tanyocytes transportent les signaux métaboliques tels que la leptine jusqu'au liquide céphalorachidien par un mécanisme de transcytose. Identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans ce transport est essentiel à notre compréhension au phénomène de résistance centrale aux hormones, observé chez les patients obèses et aux patients atteints d'un diabète de type 2. Au cours de ma thèse, après l'infusion d'une protéine de fusion recombinante (TAT-Cre) dans le 3<sup>e</sup> ventricule d'un modèle de souris floxées pour le gène codant pour les récepteurs à la leptine (LepR(loxP/loxP)), nous avons étudié le rôle des LepR dans les tanyocytes dans le contrôle centrale de l'homéostasie énergétique chez la souris. Nos résultats montrent que la perturbation de l'expression des LepR sélectivement dans les tanyocytes entraîne une augmentation de la masse corporelle, de l'adiposité, de la cholestérolémie, de la triglycéridémie et une diminution de la concentration sérique en noradrénaline. Ceci est associé avec une augmentation de la prise alimentaire, une diminution de la sensibilité périphérique à la leptine sans affecter la sensibilité centrale ainsi qu'un développement progressif d'intolérance au glucose. L'activité du pancréas et du tissu adipeux de notre modèle est également affecté. En parallèle, nous avons étudié les mécanismes sous-jacents à l'action anorexigénique des endozépines. Nos résultats que les endozépines activent la voie de signalisation ERK, nécessaire au transport de la leptine dans le cerveau, au sein de tanyocytes en culture et que ces molécules ont besoin de l'expression tanyctaire des LepR pour permettre la phosphorylation de STAT3 dans l'hypothalamus. Enfin, nous avons analyser l'effet de l'expression de la neurotoxine botulique de sérotype B (BoNTB) dans les tanyocytes sur le contrôle de l'homéostasie énergétique, grâce à l'infusion de TAT-Cre dans le « e ventricule du modèle BoNT/B(loxP-STOP-loxP). La BoNTB inactive, grâce à un clivage protéolytique, les synaptobrévines 1-3 et altère l'exocytose associé à ces protéines. Nos résultats montrent la perturbation de l'activité de ces protéines dans les tanyocytes affecte la prise alimentaire, la sensibilité à la leptine et la tolérance au glucose, comme dans le précédent modèle animal. Toutefois, nous avons constaté des différences concernant l'activité du pancréas et du tissu adipeux. L'ensemble de ces données démontre pour la première fois, le rôle clé des tanyocytes hypothalamiques dans la régulation du métabolisme énergétique *in vivo*, ainsi que l'implication de l'expression des LepR dans les tanyocytes dans l'activité de la leptine et des endozépines dans le cerveau métabolique.