

**UNIVERSITÉ DE LILLE – DROIT ET SANTÉ
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ DE LILLE**



THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

DISCIPLINE : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

SPECIALITE : Sciences Biologiques (Pharmacie)

**ROLE DU RECEPTEUR FARNESOID X DANS LE
CONTROLE CENTRAL DE L'HOMÉOSTASIE
ENERGETIQUE**

Thèse soutenue publiquement le 17 mai 2022

Benjamin DECKMYN

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur Bart STAELS

Président du jury

Monsieur le Docteur Gilles MITHIEUX

Rapporteur

Monsieur le Professeur Claude KNAUF

Rapporteur

Madame le Docteur Bénédicte DEHOUCK

Examineur

Madame le Professeur Agnès CHARPENTIER

Examineur

Madame le Docteur Kadiombo BANTUBUNGI

Directrice de Thèse

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier :

Le Dr Kadiombo Bantubungi-Blum pour l'encadrement de cette thèse. Je te remercie de m'avoir proposé ce travail et de m'avoir accordé ta confiance tout au long de celui-ci. Je te suis très reconnaissant pour le temps conséquent que tu m'as accordé. Ce projet de thèse a pu être mené à terme grâce à tes compétences et ton professionnalisme et m'a apporté énormément de connaissances sur des thèmes jusqu'alors peu ou méconnus par moi-même : la neurophysiologie et l'expérimentation animale par exemple. Je soulignerai aussi tes qualités pédagogiques, m'ayant servi bien sûr dans la façon de présenter notre projet mais aussi dans ma fonction d'enseignant au sein de l'Institut Catholique de Lille.

Je tiens également à remercier le Professeur Bart Staels de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance et de ma respectueuse considération. Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail de recherche au sein de votre unité et de m'avoir suivi et conseillé tout au long de la thèse.

Les membres du jury : Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être membre de mon jury de thèse. Que vous trouviez ici l'expression de mes sincères remerciements pour votre disponibilité, vos conseils et connaissances apportés.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail: Emilie Nicolas, Emilie Dorchies, Emilie Caron, Salah Eddine Amini, Julie Charton, Jean-Sébastien Annicotte, Sophie Lestavel, Anne Tailleux, Olivier Briand, Sandrine Caron Houde, Réjane Paumelle Lestrelin, Christophe Magnan, Pierre Gosset. L'équipe du plateau de Spectrométrie de Masse, GRITA de la faculté de pharmacie de Lille pour leur collaboration, leur sérieux et les connaissances apportées. L'équipe du BioImaging Center: Meryem Tardivel et Antonino Bongiovanni, pour leur formation sur les microscopes utilisés et leur expertise sur nos données. Thomas Dziwosz, Sarah Ducastel, Salah-Eddine Amini, Emilie Nicolas, Céline Gheeraert, Maheul Ploton, Hélène Dehondt, Véronique Touche, Emmanuelle Vallez...

A mes collègues...Les Pr Gérard Forzy et Dr Vincent Chieux, pour m'avoir accordé leur confiance quant à l'élaboration de ce beau projet. Vous m'avez mis sur la voie du statut hospitalo-universitaire en sortant de mon internat et je ne regrette en aucun cas ce choix. Je m'épanoui totalement à la fois sur ma partie clinique et sur ma partie d'enseignement. Je remercie également mes collègues biologistes du laboratoire qui m'ont soutenu et suppléé lors de mes absences pour que je puisse mener à bien ce travail. Merci au Pr Pierre Gosset pour son aide sur la partie histologie.

Au Groupe hospitalier de l'Institut catholique de Lille. Je tiens à remercier le Groupe hospitalier de l'Institut catholique de Lille qui m'a soutenu en me proposant un mi-temps afin d'effectuer ce travail de recherche.

A mes parents et ma famille, pour votre écoute, votre disponibilité et pour m'avoir toujours donné les moyens de réussir, je tiens à vous exprimer mon éternelle reconnaissance.

A ma femme Claudie et mes enfants. Claudie, merci pour ta patience et ton soutien pendant mes études. Merci d'être à mes côtés. Au-delà de la réussite professionnelle, ma vie de famille et notre réussite personnelle est bien plus chère à mes yeux. Ce travail, je l'ai fait pour nous tous.

A mes amis et connaissances...

RESUME

L'homéostasie énergétique, définie comme un équilibre dynamique entre les apports alimentaires et les dépenses énergétiques, participe via une communication entre les organes périphériques et le système nerveux central (SNC) au maintien du poids corporel au cours de notre vie. L'obésité, le diabète de type 2 ou autres désordres métaboliques, sont entre autres causés par une homéostasie énergétique déséquilibrée, résultat d'une communication périphérie-SNC perturbée ou interrompue. Alors que la contribution du SNC dans la régulation de l'homéostasie énergétique et dans les processus menant à son déséquilibre est aujourd'hui bien documentée, de nouveaux mécanismes de cette contribution ont émergé ces dernières années. Parmi ces derniers, les acides biliaires et leurs récepteurs ont été étudiés. En effet, il est bien connu qu'une altération (qualitative que quantitative) du pool d'acides biliaires est associée au développement de l'obésité ou du diabète de type 2, mettant en avant que les acides biliaires agissent tels des molécules de signalisation (via la fixation à leurs récepteurs) et non plus seulement comme des détergents des lipides alimentaires. Au cours de ce travail, nous nous sommes particulièrement intéressés au récepteur aux acides biliaires, FXR. Ce dernier appartient à la superfamille des facteurs de transcription activés par des ligands, les récepteurs nucléaires. FXR est impliqué dans la régulation hépatique du métabolisme des acides biliaires et des métabolismes glucidiques et lipidiques. Plusieurs études réalisées dans le laboratoire d'accueil ont démontré des actions complémentaires de FXR au niveau du tissu adipeux, de l'intestin ou du pancréas, démontrant de ce fait le rôle majeur de FXR dans le contrôle du métabolisme périphérique. De plus, des études menées dans le modèle murin d'inactivation de FXR démontrent une modification du poids corporel, suggérant fortement que FXR est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

Les observations faites concernant les acides biliaires dans les désordres métaboliques, la contribution bien documentée du SNC dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et la mise en évidence récente de l'expression de FXR au sein du SNC (par nous et d'autres équipes) ont apporté de nouveaux arguments quant au rôle du récepteur FXR dans les mécanismes de régulation centrale de l'homéostasie énergétique et a fait l'objet de ce travail de thèse.

Au cours de ce projet, nous précisons l'expression du récepteur FXR dans différents noyaux hypothalamiques impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique ainsi que la présence de ses ligands naturels, les acides biliaires. Ces données nous ont conduit à étudier l'impact de l'activation pharmacologique du récepteur FXR cérébral et nous ont permis de

démontrer que cette dernière modifie l'homéostasie énergétique. En effet, l'administration intracérébrale d'agonistes du récepteur FXR affecte la fonction du tissu adipeux brun en diminuant l'expression de l'enzyme limitante de synthèse des catécholamines, la tyrosine hydroxylase réduisant par conséquent, le tonus sympathique. Le mécanisme sous-jacent à cette diminution du tonus sympathique est une altération de la signalisation hypothalamique PKA-CREB par les agonistes du récepteurs FXR. L'utilisation d'un modèle murin d'inactivation de FXR a permis de démontrer que l'ensemble de ces données étaient dépendantes du récepteur FXR.

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce travail de thèse met en lumière une fonction encore jamais découverte du récepteur FXR et le présente comme un nouvel acteur du contrôle central de l'homéostasie énergétique. De plus, ces résultats identifient de nouvelles perspectives d'études des acides biliaires dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique et dans les mécanismes physiopathologiques, impliquant le SNC, de l'obésité ou du diabète de type 2, apportant les preuves de concept du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots clé : FXR, cerveau, hypothalamus, homéostasie énergétique, tissu adipeux brun, acide biliaire

ABSTRACT

Energy homeostasis, defined as a dynamic balance between food intake and energy expenditure, participates via communication between peripheral organs and the central nervous system (CNS) in the maintenance of body weight throughout our lives. Obesity, type 2 diabetes and other metabolic disorders are caused, among other things, by an unbalanced energy homeostasis, the result of a disrupted or interrupted peripheral-CNS communication. While the contribution of the CNS in the regulation of energy homeostasis and in the processes leading to its imbalance is now well documented, new mechanisms of this contribution have emerged in recent years. Among these, bile acids and their receptors have been studied. Indeed, it is well known that an alteration (qualitative as well as quantitative) of the bile acid pool is associated with the development of obesity or type 2 diabetes, highlighting that bile acids act as signaling molecules (via binding to their receptors) and not only as detergents of dietary lipids. In this work, we were particularly interested in the bile acid receptor, FXR. This receptor belongs to the superfamily of ligand-activated transcription factors, the nuclear receptors. FXR is involved in the hepatic regulation of bile acid metabolism and of carbohydrate and lipid metabolism. Several studies carried out in the host laboratory have demonstrated complementary actions of FXR at the level of adipose tissue, the intestine or the pancreas, thus demonstrating the major role of FXR in the control of peripheral metabolism. Furthermore, studies conducted in the FXR invalidation mouse model demonstrate a modification of body weight, strongly suggesting that FXR is involved in the control of energy homeostasis.

The observations made concerning bile acids in metabolic disorders, the well-documented contribution of the CNS in the control of energy homeostasis and the recent demonstration of FXR expression within the CNS (by us and other teams) have provided new arguments for the role of the FXR receptor in the central regulation of energy homeostasis and was the subject of this thesis work.

During this project, we specify the expression of the FXR receptor in different hypothalamic nuclei involved in the control of energy homeostasis as well as the presence of its natural ligands, the bile acids. These data led us to study the impact of pharmacological activation of the brain FXR receptor and allowed us to demonstrate that this activation modifies energy homeostasis. Indeed, intracerebral administration of FXR receptor agonists affects the function of brown adipose tissue by decreasing the expression of the limiting enzyme of catecholamine synthesis, tyrosine hydroxylase, thereby reducing sympathetic tone. The

mechanism underlying this decrease in sympathetic tone is an alteration of hypothalamic PKA-CREB signaling by FXR agonists. The use of a mouse model of FXR invalidation demonstrated that all these data were FXR receptor dependent.

All the results obtained during this thesis highlight a function of the FXR receptor never before discovered and present it as a new player in the central control of energy homeostasis. Moreover, these results identify new perspectives for the study of bile acids in the central control of energy homeostasis and in the pathophysiological mechanisms, involving the CNS, of obesity or type 2 diabetes, providing proof of concept for the development of new therapeutic strategies.

Keywords: FXR, brain, hypothalamus, energy homeostasis, brown adipose tissue, bile acids

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	15
INTRODUCTION.....	16
Partie A. Le contrôle central de l'homéostasie énergétique.....	16
1. Définition de l'homéostasie énergétique.....	16
1.1 Prise alimentaire.....	17
1.2 Métabolisme basal.....	18
1.3 Activité physique.....	19
1.4 Thermogénèse	20
2. Contrôle central de l'homéostasie énergétique	21
2.1 Les types de régulation et structures associées	21
2.1.1 Régulation sensorielle	21
2.1.2 Régulation hédonique et anatomie associée.....	22
2.1.3 Régulation homéostatique et anatomie associée	24
2.1.3.1 Le noyau arqué.....	24
2.1.3.2 Le noyau paraventriculaire.....	26
2.1.3.3 Les noyaux ventromédians, dorsomédians et l'aire hypothalamique latérale	27
2.1.3.4 Le système mélanocortine.....	28
2.2 Informations recueillies par le SNC depuis la périphérie le renseignant sur l'état énergétique de l'organisme	30
2.2.1 Signaux de satiété.....	30
2.2.1.1 La cholécystokinine (CCK).....	30
2.2.1.2 L'Apo A-IV	31
2.2.1.3 Le Peptide YY.....	31
2.2.1.4 Le Glucagon-like peptide-1 (GLP-1).....	32
2.2.2 Signaux d'adiposité	33
2.2.2.1 La leptine.....	34
2.2.2.2 L'insuline	34
2.2.3 Autres signaux provenant des systèmes adipeux, digestifs ou neuronaux ..	36
2.2.3.1 L'adiponectine.....	36
2.2.3.2 La ghréline.....	37
2.2.3.3 Les orexines.....	37
2.2.4 Signaux associés aux nutriments.....	38
2.3 Système nerveux autonome (SNA)	39
2.3.1 Le système nerveux sympathique : mise à profit dans la thermogénèse adaptative	40
Partie B. Le récepteur aux acides biliaires, FXR	44
1. Les récepteurs nucléaires	44
2. Le récepteur nucléaire Farnesoid X receptor (FXR).....	46
2.1 Fonctions métaboliques de FXR : un senseur métabolique en périphérie	47
3. Les acides biliaires : ligands naturels de FXR	48
4. Les acides biliaires et leurs récepteurs : un potentiel thérapeutique prometteur.....	51
4.1 La chirurgie bariatrique.....	53
4.2 Les résines hypocholestérolémiantes	53

4.3 Les agonistes de TGR5	54
4.4 Les agonistes de FXR.....	55
OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	58
MATERIELS ET METHODES	59
RESULTATS.....	69
1. Etude de l'expression hypothalamique de FXR.....	69
2. Etude de l'activation pharmacologique aigue de FXR cérébral.....	75
2.1 Analyse effet/dose en traitement aigu	75
2.2 Activabilité pharmacologique de FXR et activation neuronale	77
3. L'administration ICV chronique de GW4064 induit l'activation de FXR au niveau de l'hypothalamus et modifie l'homéostasie énergétique	79
4. L'administration ICV chronique de GW4064 modifie les fonctionnalités du TAB, le tonus sympathique et la thermogénèse.....	83
5. L'administration ICV chronique de GW4064 altère la signalisation PKA-CREB et l'expression de la TH dans l'hypothalamus	89
6. FXR est le récepteur impliqué dans les effets du GW4064 sur le tissu adipeux brun	91
6.1 Utilisation d'un modèle de souris globalement invalidées pour FXR (FXR KO) .	92
6.2 Utilisation du Tropicorex, autre agoniste synthétique spécifique de FXR.....	94
7. Projet connexe	101
7.1 Etude qualitative et quantitative du pool cérébral d'acides biliaires chez la souris	101
7.2 L'administration ICV chronique de GW4064 modifie les concentrations d'acides biliaires.....	107
DISCUSSION.....	109
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	122
ANNEXES.....	126
1. Article publié.....	126
2. Publications et communications en lien avec le sujet	126
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	128

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV : adeno-associated virus
AB : acide biliaire
ACTH : adrénocorticotrophine
AgRP : agouti related protein
ApoB : apolipoprotéine B
ARC = ARH : noyau arqué
BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BSEP : bile salt export pump
CA : acide cholique
CART : cocaïneamphétamine regulated transcript
CCK : cholécystokinine
CDCA : acide chénodésoxycholique
CPT1 : carnitine palmitoyltransferase 1
CREB : c-AMP Response Element-Binding protein
CRH : corticotropin-releasing hormone
CYP : cytochrome P
DAPI : di aminido phenyl indol
DBD : domaine de liaison à l'ADN
DCA : acide désoxycholique
DIO : diet induced-obese
DIO2 : Iodothyronine Deiodinase 2
DMH : noyau dorsomédian
DMSO : dimethyl sulfoxide
DMV : noyau dorsal du nerf vague
E2 : 17 β -estradiol
EC50 : 50 % effective concentration
EE : energy expenditure
EM : éminence médiane
EOPS : exempt d'organismes pathogènes spécifiques
FGF : fibroblast growth factor
FI : food intake

FOXA2 : forkhead box A2 transcription factor
FOXO : facteur de transcription Forkhead-O
FXR : farnesoid X receptor
GABA : acide gamma-aminobutyrique
GFP : green fluorescent protein
GLP-1 : glucagon-like peptide-1
GLP-1R : récepteur au GLP-1
GLUT : glucose transporter
GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 beta
HCA : acide hyocholique
HDCA : acide hyodéoxycholique
HNF4 α : hepatocyte nuclear factor-4 alpha
HUD/C : neuronal RNA binding protein Hu
IC50 : half-maximal inhibitory concentration
ICV : intracérébroventriculaire
IML : noyau intermédiaire-latéral
IP : intrapéritonéal
IR : récepteur à l'insuline
IRS : insulin receptor substrat
LBD : domaine de liaison du ligand
LCA : acide lithocholique
LC-MS/MS : liquid chromatography with tandem mass spectrometry
LDL : low density lipoprotein
LHA : zone hypothalamique latérale
MCA : acide muricholique
MCH : melanin-concentrating hormone
MCR : récepteurs aux mélanocortines
MSH : melanocyte-stimulating hormone
MTTP : microsomal triglyceride transfer protein
NAFLD: nonalcoholic fatty liver disease
NASH : nonalcoholic steatohepatitis
NPY : neuropeptide Y
NTCP : sodium taurocholate cotransporting polypeptide

NTS : noyaux du tractus solitaire
OST β : organic solute transporter beta
PDK1 : phosphoinositide kinase 1
PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase
PGC1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K : phosphatidylinositol-3-OH-kinase
PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKA : protéine kinase A
PKAR2 : cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit
POA : zone préoptique
POMC : pro-opiomelanocortine
PPAR α : peroxisome proliferator-activated receptor alpha
PSNS : système nerveux parasympathique
PTEN : phosphatase and TENsinhomolog
PVN : noyau paraventriculaire
PXR : pregnane X receptor
PYY : peptide YY
qPCR : quantitative polymerase chain reaction
RER : respiratory exchange ratio
RPa : raphe pallidus
RT : rétro-transcription
RXR : retinoic X receptor
RYGB : roux-en-Y gastric bypass
SHIP2 : SH2 domain containing inositol 5-phosphatase 2
SHP : small heterodimer partner
SNA : système nerveux autonome
SNC : système nerveux central
SNS : système nerveux sympathique
SREBP-1c : sterol regulatory binding protein-1c
TAB : tissu adipeux brun
TAE : tissu adipeux épидидymal
TGR5 : takeda G protein-coupled receptor 5

TH : tyrosine hydroxylase

TRH : thyrotropin-releasing hormone

UCP1 : uncoupling protein 1

UDCA : acide ursodésoxycholique

VCO₂ : consommation de dioxyde de carbone par 24 heures

VDR : vitamin D receptor

VEGF : vascular endothelial growth factor

VLDL : very-low-density lipoprotein

VMH : noyau ventromédian

VO₂ : consommation d'oxygène par 24 heures

VTA : aire tegmentale ventrale

3V : troisième ventricule cérébral

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1	Représentation de l'équilibre de la balance énergétique
Figure 2	Modèle de facteurs centraux et périphériques induits par l'exercice et susceptibles de modifier les voies impliquées dans l'homéostasie énergétique (C: catabolique, A: anabolique, d'après Patterson et al, 2008)
Figure 3	Régulation homéostatique et hédonique de l'homéostasie énergétique
Figure 4	Les neuropeptides du noyau arqué
Figure 5	Les populations neuronales du noyau paraventriculaire (d'après Ferguson et al 2008)
Figure 6	Contrôle central de l'homéostasie énergétique par le système mélanocortine
Figure 7	Signalisation de l'insuline dans les neurones POMC et NPY de l'hypothalamus
Figure 8	Contrôle de l'homéostasie énergétique par le SNA (d'après Seoane-Collazo et al, 2015)
Figure 9	Le tissu adipeux brun est activé par le système nerveux sympathique
Figure 10	Histologie des tissus adipeux blancs et tissus adipeux bruns chez l'humain et la souris (d'après Porter et al 2016)
Figure 11	Mise en évidence du tissu adipeux brun chez l'humain, (d'après Porter et al 2016, images obtenues par tomographie par émission de positons)
Figure 12	Fonctionnement d'une mitochondrie en présence d'UCP1 (d'après Ricquier et al 2011)
Figure 13	Mécanisme général des effets génomiques médiés par FXR
Figure 14	FXR : senseur métabolique en périphérie
Figure 15	Les acides biliaires dans l'axe foie-intestin-cerveau (d'après Ferrell et al, 2021)
Figure 16	Mécanisme d'action des résines hypocholestérolémiantes
Figure 17	Evolution de la maladie stéatose (d'après Cohen et al Science 2011)
Figure 18	Expression hypothalamique de FXR par qPCR
Figure 19	Expression hypothalamique de FXR par hybridation in situ
Figure 20	Expression de FXR au sein du noyau arqué par technique RNAscope
Figure 21	Expression hypothalamique de FXR par Western Blot
Figure 22	Expression de FXR par hybridation in situ et immunohistofluorescence au niveau du noyau arqué (ARC) et de l'éminence médiane (EM)
Figure 23	Expression neuronale de FXR par les neurones hypothalamiques
Figure 24	Expression de FXR, NPY et α MSH dans le noyau arqué par immunohistofluorescence
Figure 25	Expression de FXR au niveau du PVN par immunohistofluorescence
Figure 26	Expression de FXR et de α MSH au niveau du PVN
Figure 27	Etude de l'administration centrale de GW4064 sur l'homéostasie énergétique, en cage métabolique
Figure 28	(A) Immunohistofluorescence C-Fos (vert) et (B) expression génique de BSEP, au niveau du noyau arqué (ARC) / éminence médiane (EM), 2h30 après administration en ICV du véhicule DMSO ou de l'agoniste FXR GW4064
Figure 29	Immunohistofluorescence C-Fos (vert) et (B) expression génique de BSEP, au niveau du noyau paraventriculaire (PVN), 2h30 après administration en ICV du véhicule DMSO ou d'agoniste de FXR GW4064
Figure 30	Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur l'expression de gènes cibles de FXR dans l'ARC et le PVN
Figure 31	Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur les paramètres mesurés en cages métaboliques
Figure 32	Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur l'efficacité de prise alimentaire (food efficiency) et le delta de prise de poids
Figure 33	Effets d'un traitement central et chronique de GW4064 sur les expressions géniques et protéiques du tissu adipeux brun (TAB)
Figure 34	Effets d'un traitement central et chronique de GW4064 sur l'histologie du tissu adipeux brun (TAB)
Figure 35	Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur l'expression de gènes cibles de FXR dans le foie
Figure 36	Régulation de l'expression d'UCP1 par le système nerveux sympathique dans le TAB
Figure 37	Effets d'un traitement central et chronique de GW4064 sur le système nerveux sympathique
Figure 38	Effets d'un test de thermogénèse adaptative (8 heures) sur les synthèses de UCP1 et de la TH dans le TAB ainsi que sur la température rectale, à la suite d'un traitement chronique et central de GW4064
Figure 39	Effets d'un traitement central et chronique de GW4064, lors d'un test de thermogénèse adaptative, sur les expressions de gènes régulant les fonctions métaboliques du TAB
Figure 40	Effets d'un traitement chronique et central de GW4064 sur l'expression hypothalamique de la Tyrosine hydroxylase (TH)
Figure 41	Effets d'un traitement chronique et central de GW4064 sur la signalisation PKA-CREB hypothalamique
Figure 42	Effets d'un traitement chronique et central de GW4064 sur l'expression hypothalamique de gènes cibles du facteur de transcription CREB
Figure 43	Comparaison de l'expression hypothalamique des gènes cibles de FXR à la suite d'un traitement chronique et central de GW4064 entre des souris Wild Type et des souris FXR-KO
Figure 44	Comparaison de l'expression d'UCP1 et de la TH dans le TAB à la suite d'un traitement chronique et central de GW4064 entre des souris Wild Type et des souris FXR-KO
Figure 45	Expressions hypothalamiques de la TH, NPY et PGC1 α à la suite d'un traitement chronique et central de GW4064, entre des souris Wild Type et des souris FXR-KO
Figure 46	Expression de l'ARNm de Shp et Bsep dans le noyau arqué à la suite de l'administration centrale et chronique de Tropicador (D3)
Figure 47	Etude de l'administration centrale et chronique de Tropicador sur l'homéostasie énergétique en cage métabolique
Figure 48	Effets d'un traitement central et chronique de Tropicador sur l'expression d'UCP1 dans le tissu adipeux brun (TAB)
Figure 49	Effets d'un traitement central et chronique de Tropicador (D3) sur l'histologie du tissu adipeux brun (TAB)
Figure 50	Etude de l'administration centrale et chronique de Tropicador sur l'homéostasie énergétique lors d'une augmentation de dose
Figure 51	Effets d'une augmentation de dose de Tropicador sur les dépenses énergétiques et les fonctionnalités du TAB
Figure 52	Protocole d'extraction des acides biliaires à partir de cerveau murin. Adapté du protocole de Zhang et Klaassen (Zhang et Klaassen, 2010)
Figure 53	Comparaison des rendements d'extraction des acides biliaires, lors de l'ajout du standard interne avant ou après extraction
Figure 54	Composition en AB du cerveau murin
Figure 55	Composition en AB plasma murin
Figure 56	Composition en AB du plasma humain
Figure 57	Etude de la variation inter-individus pour la composition en AB du cerveau murin
Figure 58	Composition en AB de l'hypothalamus murin
Figure 59	Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur la composition en AB du cerveau murin
Figure 60	Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur la composition en AB du plasma et du cerveau murin
Figure 61	Expression de l'ARNm de FXR dans le noyau arqué dans le cadre du développement du modèle FXR-KO spécifique
Figure 62	Expression de l'ARNm de FXR dans le striatum dans le cadre du développement du modèle FXR-KO spécifique
Figure 63	Suivi des paramètres de l'homéostasie énergétique chez des souris FXR flox/flox préalablement injectées au niveau de l'hypothalamus avec TAAV CRE
Tableau 1	Description des différentes espèces d'acides biliaires
Tableau 2	Modulateurs de l'activité des récepteurs aux acides biliaires, (d'après Porez et al)
Tableau 3	Amorces utilisées en technique Sybr green et Taqman
Tableau 4	Détail des anticorps utilisés en western Blot et immunohistochimie

INTRODUCTION

Partie A. Le contrôle central de l'homéostasie énergétique

1. Définition de l'homéostasie énergétique

L'homéostasie énergétique est définie comme étant l'équilibre entre deux composantes que sont la prise alimentaire et les dépenses énergétiques, décomposées en trois entités, le métabolisme basal, l'activité physique et la thermogénèse (1). Cet équilibre peut être sujet à des variations dans un sens ou l'autre au cours de la vie d'un individu, notamment en relation avec les conditions environnementales, mais grâce à un système de régulation très fin (que nous développerons plus tard), l'homéostasie énergétique oscillera toujours autour de constantes normales permettant *in fine* de stabiliser le poids corporel d'un individu (figure 1).

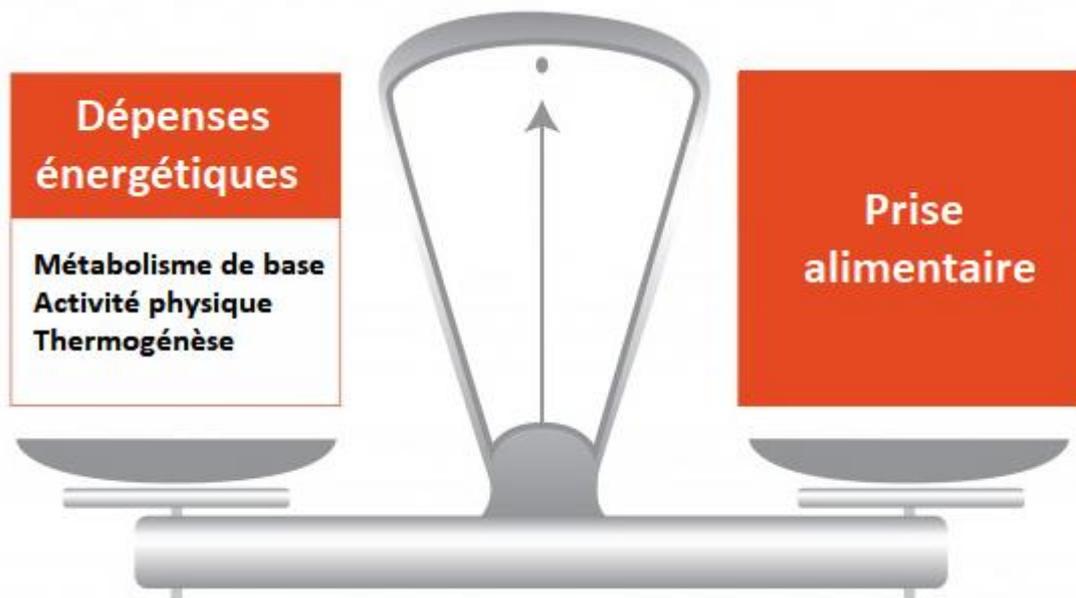


Figure 1 : Représentation de l'équilibre de la balance énergétique. L'homéostasie énergétique est régie par l'équilibre entre les apports énergétiques (prise alimentaire) et les dépenses énergétiques (trois entités : métabolisme de base, activité physique et thermogénèse). L'obésité résulte d'un déséquilibre chronique de l'apport énergétique, dépassant la dépense énergétique avec stockage de cet excès d'énergie sous forme de triglycérides.

1.1 Prise alimentaire

La prise alimentaire est un comportement à caractère périodique soumis à une variation circadienne, alternant entre période active de consommation de nourriture, de période de satiété et de jeûne. En effet, trois phases de la prise alimentaire peuvent être distinguées : tout d'abord une sensation de faim avant le repas, qui incite et qui motive l'individu à rechercher des aliments et à initier une prise alimentaire, c'est ce que l'on appelle la phase de pré-ingestion. Elle déclenche donc la deuxième phase consistant à l'ingestion alimentaire puis au rassasiement de la personne : phase prandiale. Enfin, une phase post-prandiale et un état de satiété.

La prise alimentaire a pour finalité d'apporter à l'organisme des substrats énergétiques nécessaires à sa survie, notamment d'assurer la bonne réalisation des réactions biochimiques internes, absolument vitales pour l'individu. Les nutriments ingérés peuvent être de différentes natures afin d'assurer le fonctionnement optimal des métabolismes *in vivo* : il s'agit de sucres, de protéines et de lipides, permettant d'assurer le bon déroulement des voies métaboliques telles que la glycolyse, la néoglucogénèse, le métabolisme du glycogène, la synthèse des acides gras, la bêta oxydation, le cycle de Krebs, le cycle de l'urée, la chaîne respiratoire.

Néanmoins, l'homme peut également consommer des substances organiques sans valeur énergétique propre, mais qui sont nécessaires à l'organisme ; l'homme ne pouvant les synthétiser en quantité suffisante : il s'agit par exemple des vitamines. L'absorption des nutriments n'a en réalité pas un rendement de 100%, étant donnée les pertes fécales et urinaires potentielles. On parle alors d'énergie métabolisable d'une prise alimentaire, correspondant à la quantité énergétique qui est réellement mise à disposition et délivrée aux cellules de l'organisme.

En parallèle de ces considérations quantitatives, il est important de noter que la prise alimentaire est soumise à de nombreux facteurs psychophysiologiques et environnementaux, complexifiant considérablement la prise alimentaire chez l'Homme. En effet, les habitudes culturelles, familiales, ou encore sociétales ainsi que les émotions ou la motivation influencent la prise alimentaire ou plus précisément le comportement alimentaire.

Le maintien de l'homéostasie énergétique dans une fourchette de valeur normale étant nécessaire à une bonne condition de santé, son déséquilibre pathologique peut conduire au développement de l'obésité et de toutes les complications du syndrome métabolique en cas d'hyperphagie, mais également au développement de la dénutrition et de la cachexie en cas

d'insuffisance de prise alimentaire. Dans des conditions telles que l'obésité et ses comorbidités, un excès de prise alimentaire modifie le bilan énergétique (2), se transformant en bilan énergétique positif et entraînant une augmentation de la masse grasse, des maladies coronariennes, du diabète de type II, de la stéatose hépatique non alcoolique et certains types de cancer) (3, 4). A l'opposé, certains cancers et maladies auto-immunes comme la polyarthrite rhumatoïde peuvent provoquer un bilan énergétique négatif et une cachexie, entraînant une réduction marquée du poids corporel, une fonte musculaire et une mortalité élevée (5–8).

1.2 Métabolisme basal

Le métabolisme basal représente la dépense énergétique d'un individu au repos, à température neutre, à jeun et au calme émotionnel (9). Correspondant à environ 60% de la dépense énergétique quotidienne, ce métabolisme représente en réalité la partie de l'énergie utilisée pour le maintien de l'homéostasie cellulaire de l'organisme, des réactions biochimiques et des fonctions organiques telles que les fonctions cardiaques, cérébrales, nerveuses.

La taille, le poids corporel, l'âge et le sexe sont des facteurs intervenant dans le calcul du métabolisme de base et sont inhérentes à l'individu. Cependant, un certain nombre de facteurs peuvent influencer à moyen ou long terme le métabolisme basal. Un exercice physique régulier va *in fine* entraîner des modifications de pourcentage de graisse corporelle, d'eau, de graisse viscérale, de masse musculaire, tout ceci aura des répercussions sur le métabolisme basal si on le réévalue. Une autre condition physiologique entraînant une modification du métabolisme de base est la grossesse. Au cours du développement de l'enfant, la femme va modifier son métabolisme de base de par la modification de la composition corporelle, la prise de poids et la préparation à la lactation.

Des conditions pathologiques peuvent également déréguler le métabolisme de base. Par exemple, l'hyperthyroïdie, caractérisée par une hypersécrétion non freinable d'hormone thyroïdienne par la glande thyroïde, entraîne de façon endogène et basale une augmentation du catabolisme du cholestérol et des triglycérides, une augmentation du catabolisme des protéines, une absorption accentuée du glucose ainsi qu'une hausse de la néoglucogénèse et de la glycogénolyse hépatique, modifiant ainsi le métabolisme basal. Les individus présentent donc un amaigrissement rapide, massif et constant malgré le fait d'avoir un appétit conservé.

Chez les sujets diabétiques et / ou en surpoids, le métabolisme basal est corrélé avec l'importance de leur déséquilibre glycémique ou leur pourcentage de graisse viscérale (10).

1.3 Activité physique

L'activité physique est la composante la plus variable de la dépense énergétique quotidienne et peut représenter 15 à 30 % de la dépense énergétique sur 24 heures. Cette activité correspond en fait à la mobilité d'un individu, selon les trois axes de l'espace comme ce qui peut être mesuré en cages métaboliques pour les souris, mais également à de la mobilité d'une partie du corps sans que l'individu se déplace réellement. Par conséquent, toute mobilisation du corps produit par la contraction des muscles et augmentant la dépense énergétique au-dessus de la dépense énergétique de repos rentre dans la constitution de l'activité physique : activités de la vie quotidienne, travail physique, activités sportives, mais également toute période de frissons et d'agitations.

Cette composante de l'homéostasie énergétique est vraiment efficace, comme le montrent certaines études chez des sujets obèses ayant entamé un régime, baissé leur poids corporel et l'ayant maintenu. Cette observation est à la base des préconisations des médecins traitant les malades cardiovasculaires et liées au syndrome métabolique ; l'instauration et le suivi des règles hygiéno-diététiques dont le sport a autant d'importance voire plus que l'instauration et l'observance d'un traitement médicamenteux.

Certaines études montrent qu'au cours de l'exercice (figure 2), des informations sont générées et intégrées par le cerveau, comme l'interleukine-6, les acides gras et la chaleur, et le cerveau délivre en retour une réponse biologique faisant intervenir les systèmes neuropeptidiques centraux impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique (11).

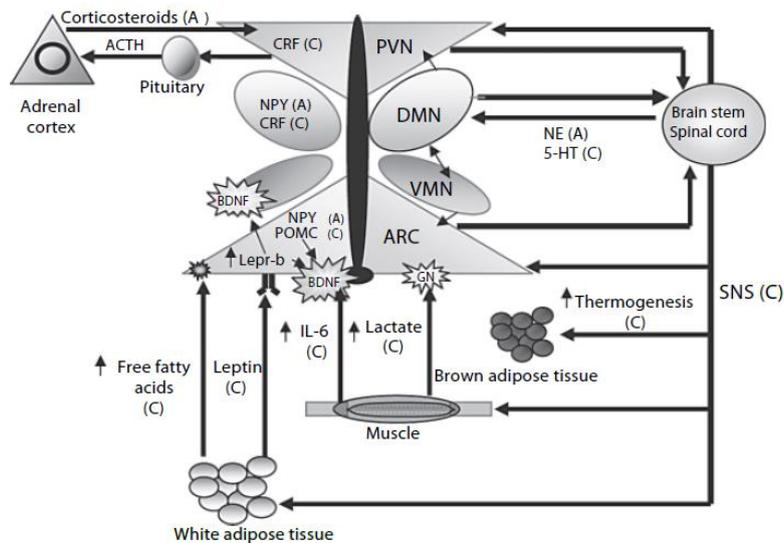


Figure 2 : Modèle de facteurs centraux et périphériques induits par l'exercice et susceptibles de modifier les voies impliquées dans l'homéostasie énergétique (C: catabolique, A: anabolique, d'après Patterson et al, 2008). Une sur-expression des récepteurs de la leptine dans le noyau arqué peut entraîner une augmentation de la sensibilité centrale à la leptine. Les acides gras libres au niveau de l'hypothalamus peuvent être interprétés comme un excès de réserves énergétiques. L'interleukine-6 (IL-6), la leptine et la melanocyte-stimulating hormone libérée des neurones à pro-opiomelanocortine (POMC) peuvent augmenter l'expression du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF). Le lactate peut agir sur les neurones spécialisés dans la détection du glucose (GN) et diminuer la prise alimentaire. ARC : noyaux arqué ; VMH : noyau ventromédian ; ACTH = adrénocorticotrophine; CRF : facteur de libération de la corticotrophine ; NPY : neuropeptide Y ; PVN : noyau paraventriculaire ; DMN = noyau dorsomédian ; NE = norépinéphrine ; 5-HT : sérotonine (5-hydroxytryptamine) ; SNS : système nerveux sympathique

1.4 Thermogénèse

La thermogénèse ou production de chaleur est un moyen supplémentaire pour l'organisme de dépenser de l'énergie en adéquation avec l'environnement (maintien de la température corporelle lorsque la température ambiante baisse, le développement de la fièvre en réponse à une infection virale ou bactérienne, hyperthermie lors d'une intoxication médicamenteuse ou d'un stress psychologique (12)). La thermogénèse est influencée principalement par deux grands axes : la température ambiante et l'apport alimentaire. Premièrement, lors de l'exposition de l'individu à une chute de température environnementale, une production de chaleur permet le maintien de la température. Cette production comprend la chaleur produite par le frisson thermique musculaire mais également une thermogénèse sans frisson. La prise alimentaire quant à elle déclenche une thermogénèse induite par l'alimentation, composée d'une partie obligatoire et d'une partie facultative. La partie obligatoire correspond au processus de digestion de l'aliment et à sa prise en charge métabolique. La partie facultative correspond à la prise en charge de la quantité d'aliments excédentaire, en dehors de la zone obligatoire, le but étant de dissiper cet apport calorique sous forme de chaleur et *in fine*

réguler le poids corporel. La thermogénèse sans frisson induite par une chute de température et la thermogénèse induite par l'alimentation présentent des similitudes : une régulation par le système nerveux autonome, notamment par l'intermédiaire du système sympathique, et un organe effecteur de thermogène, le tissu adipeux brun. La thermogénèse liée au tissu adipeux brun (TAB), sera détaillée de manière plus précise et plus tard dans ce manuscrit.

2. Contrôle central de l'homéostasie énergétique

2.1 Les types de régulation et structures associées

Comme cité précédemment, l'homéostasie énergétique consiste en un état d'équilibre entre les dépenses et les apports énergétiques, nécessitant un système de régulation très perfectionné. Grâce à l'interconnexion du système nerveux central (SNC) avec les organes périphériques via des voies neuroendocrines et autonomes, le SNC recueille de manière constante des informations le renseignant sur l'état énergétique de l'organisme depuis la périphérie et fournit en retour des réponses biologiques adaptées (13, 14). Le contrôle central de l'homéostasie énergétique est régulé de différentes façons mettant en jeu différents réseaux anatomiques collectant eux-mêmes différentes informations. Nous pouvons citer la régulation sensorielle répondant à des informations sensorielles, la régulation hédonique répondant à des critères qualitatifs et la régulation homéostatique hypothalamique répondant à des critères quantitatifs, dont nous nous sommes particulièrement intéressés au cours de ce travail.

2.1.1 Régulation sensorielle

Les informations sensorielles telles que la vision, le goût ou l'odorat peuvent impacter l'homéostasie énergétique. En effet, nos sens influencent notre comportement alimentaire tant au niveau de notre sensation de faim ou de satiété mais également dans notre capacité à les sélectionner selon des critères énergétiques ou de plaisir potentiel. Les mécanismes par lesquels le système olfactif influence le métabolisme sont encore en voie d'étude, mais ceci étant, un certain nombre de données expérimentales démontrent que des structures impliquées dans l'intégration des informations sensorielles convergent vers la LHA, ce noyau étant lui-même en connexion avec l'ARC, expliquant l'influence de nos sens sur notre prise alimentaire ainsi que sur notre comportement vis-à-vis de la nourriture (15, 16). Au niveau

gustatif, des récepteurs couplés aux protéines G et des canaux ioniques, au niveau oral ou du tractus gastrointestinal, permettent de déclencher des cascades de signalisation, dont les seconds messagers chimiques ou hormonaux sont capables d'activer des neurones sensoriels afférents ou déclencher la synthèse de neuropeptides communiquant avec le cerveau (17). De plus, certaines études rapportent des perturbations sensorielles (perception du goût ou de l'odorat) induites par des désordres métaboliques autant chez la souris que chez l'homme. De manière intéressante, Riera et al (18) ont développé deux modèles de souris ayant soit une capacité olfactive franchement diminuée, ou à l'inverse des souris ayant ce sens sur-développé. Ces auteurs rapportent que les souris dont le système olfactif est défaillant résistent au développement de l'obésité lors d'une alimentation riche en graisses, diminuent leur prise alimentaire et augmentent leurs dépenses énergétiques. A l'inverse, les souris ayant une capacité olfactive accrue prennent plus de poids sans changement évident de consommation alimentaire. A l'échelle humaine, une récente étude réalisée chez l'homme (19) établit également un lien entre les capacités d'olfaction et le développement de syndromes métaboliques tels que l'obésité. Selon cette étude, l'obésité diminuerait le sens de l'odorat et entraînerait *in fine* des choix alimentaires riches en énergie ou en graisse (aliments à haute densité énergétique) (20). Une étude associant le diabète et la fonction olfactive rapporte que, par rapport aux non-diabétiques, les diabétiques sous insuline ont une prévalence plus élevée de phantosmie, d'hyposmie sévère et d'anosmie. De plus, parmi les diabétiques, il existe une tendance significative et accentuée à l'hyposmie et à l'anosmie chez les sujets sous traitement lourd (21). De manière surprenante, les patients pouvant bénéficier d'une chirurgie bariatrique présentent également des modifications de l'odorat et du goût après l'intervention (22).

2.1.2 Régulation hédonique et anatomie associée

L'homéostasie énergétique peut être également régulée par des informations en lien avec la motivation, les processus mnésiques ou encore les émotions. Cette régulation siège dans le système méso-corticolimbique dopaminergique (figure 3), comprenant l'aire tegmentale ventrale (VTA), cortex préfrontal médian, striatum, noyau accubens, amygdale et hippocampe (23). Ce réseau anatomique, connu sous le nom de système de récompense, joue un rôle majeur dans tous les comportements addictifs (consommation de drogue, d'alcool, pratique sportive ou jeux). En effet, un grand nombre de substances addictives (telles que la cocaïne, nicotine etc) vont induire une augmentation de la concentration en dopamine dans la fente synaptique par divers mécanismes, les neurones dopaminergiques originaires de l'aire

tegmentale ventrale projetant vers des neurones du noyau accumbens (24). Par exemple, la cocaïne inhibe la recapture de la dopamine, de catécholamines et de la sérotonine. D'autres composés endogènes comme les endocannabinoïdes participent également à la régulation hédonique de la prise alimentaire. L'exposition à des aliments palatables stimule le tonus endocannabinoïdien, induisant une libération de dopamine dans les zones limbiques pré-citées (25). *In fine*, les concentrations en neuromédiateurs augmentent dans la synapse, d'où une hyperstimulation du neurone post-synaptique, qui sera responsable de la sensation de plaisir, de « récompense ». Cette régulation est donc liée à la capacité d'un individu à prédire, évaluer et apprécier la palatabilité d'un aliment.

Il est important de noter que cette régulation hédonique est étroitement liée à la régulation sensorielle tant d'un point de vue anatomique que fonctionnel. La présentation d'un aliment, son odeur, son goût, sa palatabilité ou encore sa valeur nutritionnelle (notamment sa teneur en sucre ou graisse) sont autant d'éléments pouvant déclencher une décharge de dopamine, stimulant donc le système de récompense.

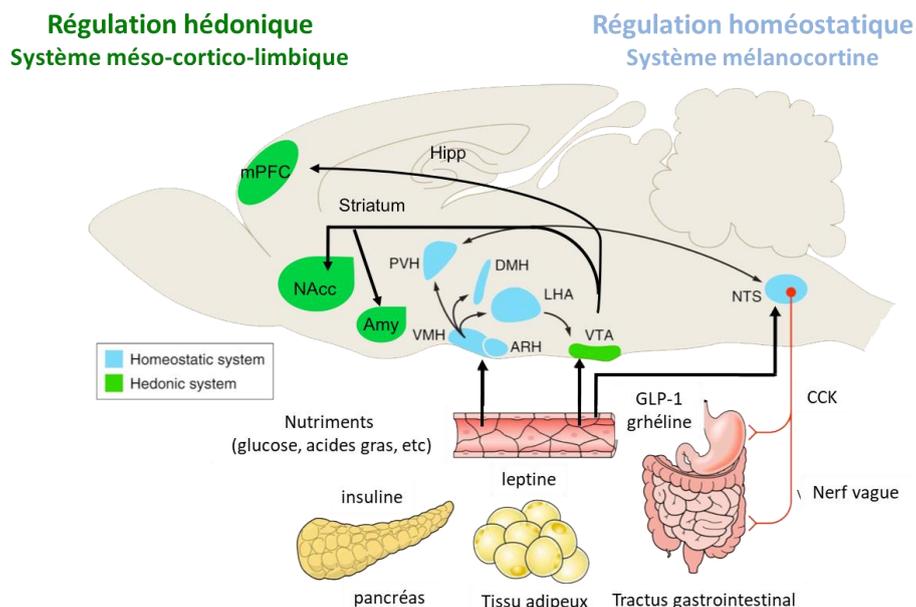


Figure 3 : Régulation homéostatique et hédonique de l'homéostasie énergétique, d'après Bouret et al, 2015. Le cerveau participe au contrôle de l'homéostasie énergétique de deux manières différentes : d'une part, la régulation hédonique suite à des informations qualitatives ou hédoniques telles que la palatabilité des aliments et d'autre part, la régulation homéostatique suite à des informations quantitatives telles que la leptinémie, l'insulinémie ou la vidange gastrique par exemple. Les deux régulations sont soutenues par des réseaux neuronaux spécifiques qui sont interconnectés entre eux et avec la périphérie. Le réseau neuronal de la régulation homéostatique est représenté en bleu, le réseau neuronal de la régulation hédonique est représenté en vert. PVH: noyau paraventriculaire ; LHA: aire hypothalamique latérale ; DMH: noyau dorsomédian ; VMH: noyau ventromédian ; ARH: noyau arqué ; NTS : noyau du tractus solitaire ; VTA : aire tegmentale ventrale ; AMY : amygdale ; NAcc : noyau accumbens, mPFC : cortex préfrontal

2.1.3 Régulation homéostatique et anatomie associée

La régulation homéostatique de l'homéostasie énergétique répond à des signaux quantitatifs (en opposition aux critères qualitatifs de la régulation sensorielle et hédonique) que nous développerons dans la suite du manuscrit. La régulation homéostatique (23) se réalise au travers du réseau anatomique nommé système mélanocortine (figure 3). Ce système hypothalamique complexe de régulation de la prise alimentaire se compose de différents noyaux de l'hypothalamus (PVN, VMH, ARC) reliés les uns avec les autres, détaillés plus tard dans ce manuscrit. Les informations recueillies par l'hypothalamus depuis la périphérie vont être détectées et intégrées par une série de différents noyaux de l'hypothalamus (figure 3). On distingue le noyau hypothalamique de premier ordre, le noyau arqué (ARC), le premier à détecter ces informations nutritionnelles, et les noyaux hypothalamiques de 2nd ordre, relayant ces informations dans le but d'une mise en place d'une réponse biologique adaptée. Les noyaux hypothalamiques de 2nd ordre sont représentés par ceux du noyau hypothalamique paraventriculaire : PVN, du noyau hypothalamique ventromédian : VMH, du noyau hypothalamique dorsomédian : DMH, de l'aire hypothalamique latérale LHA. Tous ces noyaux constituent un réseau énergétique. Ce réseau intégrant des signaux périphériques est composé de populations neuronales exprimant des neurotransmetteurs spécifiques. Leurs fonctionnalités, interactions mutuelles et leurs physiologies respectives conditionnent le bon contrôle de l'homéostasie énergétique.

2.1.3.1 Le noyau arqué

L'ARC, noyau de premier ordre, est une structure clé du contrôle de l'homéostasie énergétique et ce, pour plusieurs raisons. La première raison est sa localisation, dans la région de l'hypothalamus médiobasal, à proximité du 3^{ème} ventricule et de l'éminence médiane (EM) où l'interface SNC-périphérie est privilégiée, donc accessible aux messages circulants comme la leptine, l'insuline et la ghréline ne pouvant franchir la barrière hémato-encéphalique. Mis à part sa localisation avantageuse pour l'accès aux signaux périphériques, les différents types de capillaires irriguant son micro-environnement expliquent aussi la faculté avec laquelle ce noyau permet de réguler de manière dynamique l'accès et la circulation des signaux périphériques vers le cerveau. L'ARC est placé à proximité de l'EM, structure dite circumventriculaire. Cette dernière possède des vaisseaux fenêtrés, poreux, permettant un accès aisé, sans transporteur sélectif, de molécules vers le système nerveux central. Par contre,

l'ARC possède une irrigation moins perméable que l'EM, due à la présence de jonctions serrées, non présentes au sein de l'EM. De manière intéressante, certaines études montrent que cette perméabilité relative de l'ARC est modulable, en fonction des conditions métaboliques de l'individu. Dans le but de restaurer un équilibre énergétique, certains facteurs de croissance, comme le VEGF, sont capables de modifier la structure vasculaire de l'ARC, permettant un accès accru des signaux périphériques vers le cerveau (26). La deuxièmement raison, son étroite collaboration avec le système mélanocortine (27), senseur des signaux d'adiposité et des nutriments, que nous décrirons plus tard dans ce manuscrit. Et troisièmement, la présence de deux populations neuronales, les neurones anorexigènes et les neurones orexigènes (figure 4) :

- Les neurones exprimant des neuropeptides anorexigènes réduisent la prise alimentaire et augmentent la dépense énergétique ; ces peptides correspondent à la cocaïneamphétamine regulated transcript (CART) et la pro-opiomelanocortine (POMC), cette dernière étant précurseur d'une autre classe de molécules appelées mélanocortines.
- Les neurones exprimant des neuropeptides orexigènes augmentant la prise alimentaire et inhibant les dépenses énergétiques (28), comme le neuropeptide Y (NPY) et l'agouti related protein (AgRP).

L'ARC reçoit des afférences d'autres noyaux hypothalamiques impliqués dans l'homéostasie énergétique, notamment la zone hypothalamique latérale (LHA), le noyau supra-chiasmatique et le PVN. Les neuropeptides et neurotransmetteurs contenus dans les terminaisons nerveuses innervant l'ARC incluent l'orexine, la sérotonine et la noradrénaline du tronc cérébral ainsi que l'acide gamma-aminobutyrique et le glutamate. Les cibles efférentes sont tout aussi diverses et comprennent des sorties vers l'éminence médiane (EM), d'autres noyaux hypothalamiques de second ordre mais également le noyau du tractus solitaire (NTS) et la LHA, qui fournissent des informations comportementales, neuroendocriniennes et autonomes afin d'assurer un équilibre homéostatique (29).

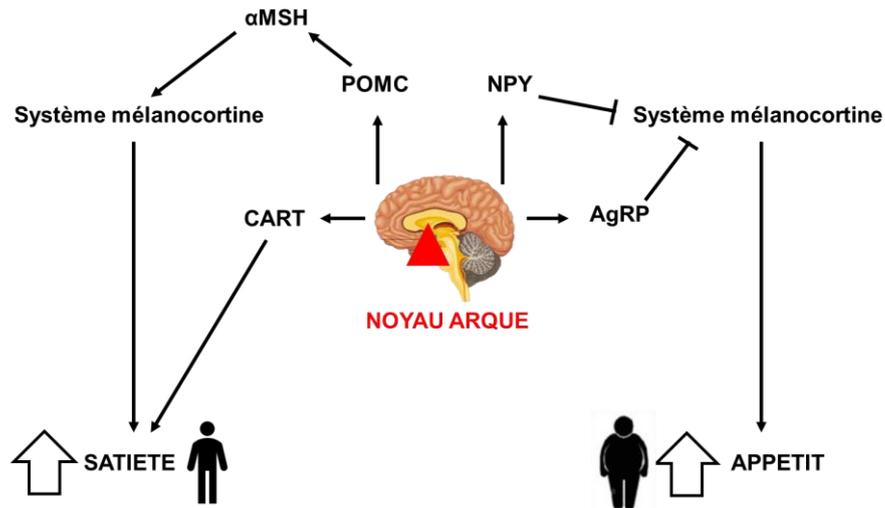


Figure 4: Les neuropeptides du noyau arqué (schéma personnel). Le noyau arqué est composé de neurones orexigènes produisant du NPY et de l'AgRP et de neurones anorexigènes, qui synthétisent du POMC et du CART. Les flèches pointées indiquent une activation ; les flèches bloquées indiquent une inhibition. ARC : noyau arqué ; AgRP : agouti related peptide ; CART : cocaine and amphetamine-regulated transcript ; NPY : neuropeptide Y ; POMC : proopiomélanocortine ; α MSH : α -mélano-cyte stimulating hormone

Les noyaux hypothalamiques de 2nd ordre reçoivent des projections neuronales provenant de l'ARC et participent à l'intégration et au relai des informations collectées, permettant la mise en place d'un comportement adapté.

2.1.3.2 Le noyau paraventriculaire

Le PVN est un noyau important pour le traitement des informations autonomes et neuroendocriniennes. Structurellement, le PVN est un noyau complexe et hétérogène. Ses neurones se répartissent en trois grandes catégories (figure 5). Premièrement, il contient des neurones magnocellulaires qui effectuent des prolongements vers le lobe postérieur de l'hypophyse et sécrètent soit de la vasopressine, soit de l'ocytocine dans la circulation générale. Deuxièmement, il contient des neurones parvocellulaires qui synthétisent et sécrètent des hormones telles que la corticotrophine (CRH), la thyrotropine (TRH) et la somatostatine (SS), pour les transporter vers le lobe antérieur de l'hypophyse afin d'influencer la synthèse et la libération des hormones des cellules endocrines (30).

Troisièmement, il contient des neurones parvocellulaires préautonomes qui envoient des projections vers le tronc cérébral inférieur et/ou la moelle épinière et qui sont impliqués dans la coordination des réponses sympathiques et parasympathiques. Le PVN reçoit des afférences des neurones POMC/CART et NPY/AgRP et est capable d'intégrer des signaux du

système mélanocortine (31). De plus, le PVN innerve le NTS, ce dernier intégrant des signaux de satiété (32). Enfin, il contient des neurones sensibles au glucose de type GE et GI pour remplir son rôle de senseur vis-à-vis du glucose (33). Il existe en effet des populations neuronales spécialisées et sensibles au glucose, dont la concentration extracellulaire en fait varier leur activité électrique. Ces neurones sont décrits comme « inhibés par le glucose » : GI ou « excités par le glucose » : GE. Lorsque les niveaux de glucose augmentent, le taux d'excitation des neurones GE augmente également mais l'activité des neurones GI est réduite. Pour conclure, le PVN est un noyau recevant des signaux de différents noyaux hypothalamiques et fait le lien avec des structures plus postérieures, comme le NTS et le tronc cérébral, avant de transiter vers le système nerveux autonome.

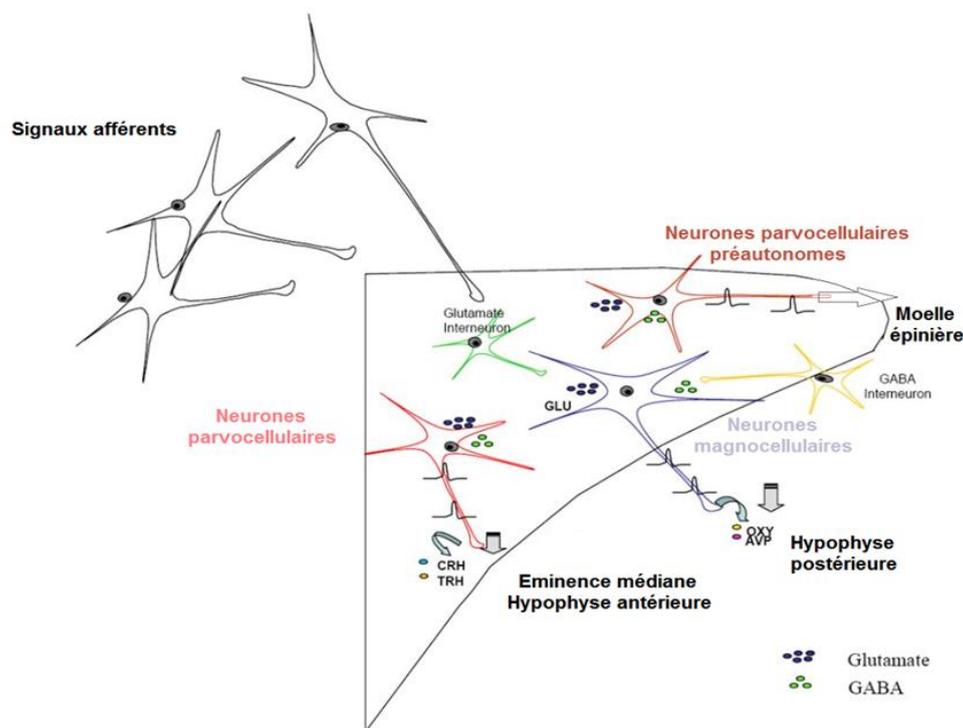


Figure 5 : Les populations neuronales du noyau paraventriculaire (d'après Ferguson et al 2008). Les neurones magnocellulaires synthétisent et libèrent la vasopressine (AVP) ou l'ocytocine (OXY). Les neurones préautonomiques parvocellulaires se projettent vers les centres de contrôle autonome de la moelle épinière. Les cellules neuroendocrines parvocellulaires synthétisent la CRH (corticotropin-releasing hormone) et la TRH (thyrotropin-releasing hormone), se projettent vers l'éminence médiane, où elles libèrent ces molécules dans la circulation portale hypophysaire.

2.1.3.3 Les noyaux ventromédians, dorsomédians et l'aire hypothalamique latérale

L'hypothalamus ventromédian (VMH) est un noyau hypothalamique situé au-dessus de l'ARC, impliqué dans la régulation du poids corporel et de l'homéostasie du glucose. Des lésions

provoquées sur le VMH induisent un syndrome métabolique de type hyperinsulinémie et obésité (34). Il est en effet pourvu de neurones sensibles au glucose. Le VMH reçoit des informations de l'ARC et les relaye vers différentes structures intra ou extra-hypothalamiques comme la substance grise périaqueducale ou le strie terminale (35–37). Le noyau dorsomédian (DMH) se trouve à proximité directe du noyau ventro-médian et établit des liaisons avec les noyaux hypothalamiques aux alentours impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Le DMH reçoit des informations de l'ARC, mais également des projections directes et indirectes du noyau suprachiasmatique. A leur tour, les neurones du DMH projettent vers des zones cérébrales régulant le métabolisme et la prise alimentaire, notamment l'ARC. Des lésions au sein de ce noyau perturbent les rythmes circadiens, notamment celui gérant les rythmes de prise alimentaire (38). L'aire hypothalamique latérale (LHA) abrite une population hétérogène de neurones. Ces populations comprennent à la fois des neurones GABA (acide gamma-aminobutyrique) et glutamatergiques, ainsi que des neurones exprimant des neuropeptides tels que l'hypocrétine, la mélanin-concentrating hormone (MCH), CART, neurotensine, le récepteur de la leptine, orexine, neurones sensibles au glucose etc. Ces neurones effectuent également des projections vers le NTS.

2.1.3.4 Le système mélanocortine

L'hypothalamus contient un système perfectionné de régulation de l'homéostasie énergétique nommé système mélanocortine (figure 6). Les cellules du système mélanocortine hypothalamique ont de puissantes capacités constitutives à déclencher des comportements hypophagiques ou hyperphagiques (39). Les mélanocortines désignent les alpha, bêta, gamma melanocyte-stimulating hormone (MSH) ainsi que l'ACTH (adrénocorticotrophine), et agissent comme agonistes sur les récepteurs aux mélanocortines nommés MCR. Les MCR, transmembranaires et couplés aux protéines G, diffèrent par leurs distributions tissulaires et les fonctions physiologiques médiées. MC1R est impliquée dans la pigmentation cutanée, MC2R joue un rôle dans l'axe hypothalamo-pituitaire-surrénal, MC3R et MC4R sont impliqués dans l'homéostasie énergétique et MC5R dans certaines fonctions exocrines. MC4R, couplée à une protéine Gs et une fois liée à son agoniste (alpha-MSH), permet l'activation de l'adénylate cyclase, permettant une synthèse de l'AMPc, ce qui active la Protéine Kinase A (PKA) qui exercera divers effets métaboliques (40). MC4R est largement exprimé dans le système nerveux central, dont le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus (41). La

délétion ciblée de MC4R dans un modèle murin se traduit chez les animaux par une obésité sévère, une hyperphagie et une réduction de la dépense énergétique (42). La réexpression de MC4R par technologie Cre-lox rétablissant un niveaux endogène dans le PVN et l'amygdale d'animaux MC4R-KO (43) a permis de normaliser leur consommation alimentaire, suggérant ainsi un rôle de MC4R dans ces régions dans la régulation du comportement alimentaire. Le PVN, riche en MC4R et fortement innervé par l'ARC, est un centre d'intégration clé pour les divers signaux qui ont un impact sur l'équilibre énergétique. La libération de peptides dérivés de la POMC par les neurones de l'ARC, stimulés par la leptine, entraîne l'activation de la signalisation MC4R dans le PVN (44, 45). De manière intéressante d'un point de vue biologique, un antagoniste endogène et un agoniste inverse de la signalisation MC4R (ainsi que MC3R) est également produit dans l'hypothalamus, l'agouti-related peptide (AgRP) (46, 47). La présence d'agonistes et d'antagonistes endogènes pour ce récepteur permet d'équilibrer délicatement la signalisation de MC4R dans le PVN. Les mutations de MC4R sont la forme la plus répandue d'obésité monogénique identifiée à ce jour, représentant jusqu'à 6% des patients souffrant d'obésité sévère.

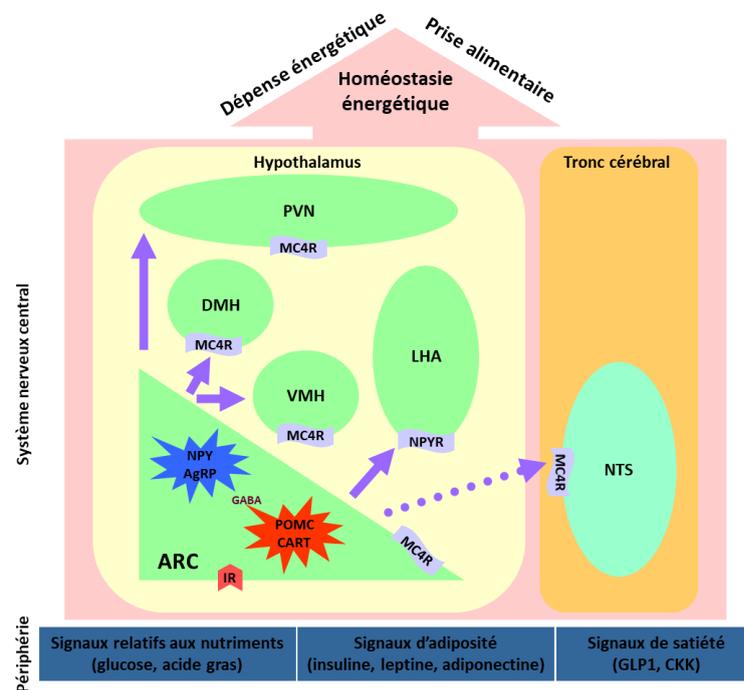


Figure 6 : Contrôle central de l'homéostasie énergétique par le système mélanocortine, d'après SE Amini, 2015. L'hypothalamus, impliqué dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique, est un centre qui va permettre la coordination du système mélanocortine. Le récepteur central des mélanocortines, MC4R, est exprimé dans les différents noyaux suivants : PVN : noyau paraventriculaire ; VMH : noyau ventromédian, LHA : aire hypothalamique latérale ; ARC : noyau arcué, DMH : noyau dorsomédian ; NTS : noyau du tractus solitaire

Le réseau homéostatique est donc constitué de multiples noyaux distincts responsables d'une multitude de fonctions de par leur sécrétion de molécules neuroendocrines, contrôlant de ce fait des processus comme le sommeil et l'éveil, la fatigue, la thermorégulation, la faim et la soif, ce qui souligne son caractère dans le maintien central de l'homéostasie énergétique.

2.2 Informations recueillies par le SNC depuis la périphérie le renseignant sur l'état énergétique de l'organisme

Dans le cadre de la régulation homéostatique et comme évoqué précédemment, le système mélanocortine va recueillir un certain nombre de signaux provenant de la périphérie, informant le SNC du statut énergétique et métabolique de l'organisme. Ces nombreux signaux décrits dans la littérature (48), sont de différents types. Nous détaillerons parmi l'ensemble des signaux les signaux de satiété : CCK, Apo A-IV, peptide YY, GLP-1 ; les signaux d'adiposité : leptine, insuline ; les signaux associés aux nutriments et les autres signaux provenant des systèmes adipeux, digestifs etc comme l'adiponectine, ghréline, orexines.

2.2.1 Signaux de satiété

La quantité de nourriture consommée pendant les repas doit être régulée pour l'obtention de l'homéostasie énergétique. Le principal déterminant de la taille des repas est l'apparition de la satiété, un état biologique induit par des stimuli neuro-humoraux. Contrairement à l'initiation d'un repas, qui peut être influencé par de nombreux facteurs : facteurs émotionnels, l'heure de la journée, la disponibilité et l'appétence des aliments, l'interruption des repas est généralement un processus plus contrôlé biologiquement. Les signaux inducteurs de satiété qui atteignent le SNC sont déclenchés par la stimulation mécanique (méchanorécepteurs sensibles à la distension gastrique) ou chimique de l'estomac et de l'intestin grêle pendant l'ingestion d'aliments.

2.2.1.1 La cholécystokinine (CCK)

La CCK est sécrétée par la partie proximale de l'intestin grêle en réponse aux nutriments alimentaires lipidiques. Lorsque des aliments contenant des graisses ou des protéines sont consommés et pénètrent dans le duodénum, la CCK est sécrétée par les cellules I du duodénum et du jéjunum. La CCK pénètre dans le sang et exerce une influence hormonale sur

la motilité intestinale, la contraction de la vésicule biliaire, la sécrétion d'enzymes pancréatiques, la vidange gastrique et la sécrétion d'acide gastrique (49). La CCK diffuse également localement pour fournir un stimulus paracrine aux récepteurs CCK-1 sur les branches voisines des nerfs sensoriels vagues (50). Grâce à ce mécanisme, un message, qui indique généralement que les graisses/protéines ingérées sont en cours de traitement et seront bientôt absorbées, est transmis au cerveau postérieur et relayé à l'hypothalamus où il est intégré dans l'information sur l'homéostasie énergétique. Dans le SNC, la CCK agit sur son récepteur CCK-R2 au niveau de l'aire hypothalamique latérale, du noyau dorsomédian, du noyau paraventriculaire et du noyau du tractus solitaire.

2.2.1.2 L'Apo A-IV

Parmi les autres facteurs de satiété libérés en réponse aux lipides, nous pouvons citer l'Apo A-IV, protéine sécrétée par l'intestin grêle en réponse à l'absorption des lipides et à la formation des chylomicrons. L'apolipoprotéine A-IV est synthétisée par les cellules de la muqueuse intestinale mais également synthétisée dans l'ARC (51). L'Apo A-IV semble fonctionner en interagissant avec le signal CCK (52).

2.2.1.3 Le Peptide YY

Également parmi ces facteurs, le Peptide YY est synthétisé et sécrété par les cellules L dans l'iléon distal et le côlon (53). Les récepteurs qui médient les effets du PYY, y compris la réduction de la consommation alimentaire, comprennent Y1, Y2, Y4 et Y5 (54). PYY possède une activité agoniste hautement sélective pour le récepteur Y2, et il réduit également la consommation alimentaire chez les humains et les animaux (55). PYY est impliqué dans la motilité du tractus gastrointestinal et est considéré comme un composant majeur du frein iléal, mécanisme de rétroaction inhibiteur qui régule le transit des nutriments dans le tractus gastro-intestinal (56). La sécrétion de PYY est stimulée par l'apport alimentaire et aussi par la présence de nutriments dans l'iléon lui-même (57, 58) ; les lipides semblent être un stimulus particulièrement efficace. Le peptide YY agit au niveau du SNC en stimulant la libération d' α -MSH et inhibant la production de NPY au niveau de l'ARC.

2.2.1.4 Le Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)

Bien que le CCK, l'Apo A-IV et le peptide YY soient libérés de préférence en réponse aux graisses alimentaires, d'autres hormones gastro-intestinales, comme l'incrétine Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) apparaissent plus fortement régulées par les glucides. Le GLP-1 est produit par l'iléon après les repas. Il est dérivé du proglucagon des cellules L intestinales qui sont les plus répandues dans l'iléon et le côlon. Cette hormone va exercer un effet nommé incrétine, phénomène par lequel le glucose administré par voie orale provoque des réponses insulino-sécrétoires plus élevées qu'une administration intraveineuse, malgré des niveaux de glycémie similaires, chez des individus sains. Cet effet médié par le GLP-1 est très important pour le maintien de l'homéostasie du glucose et est à la base d'une classe particulière de médicaments pour le traitement du diabète de type 2. Le GLP-1 a un large éventail d'actions sur le métabolisme du glucose (59). Il assure la médiation de ses diverses actions par un mécanisme endocrinien, en se liant directement aux principaux tissus cibles comme les cellules des îlots pancréatiques, sur son récepteur GLP-1 (GLP-1R). Ce récepteur est transmembranaire et couplé aux protéines G, associé à l'adénylate cyclase et aux protéines kinases de type A et C permettant une cascade de signalisation. Cette cascade va induire *in fine*, au niveau du pancréas, une inhibition des canaux potassiques ATP-dépendants suivie d'une dépolarisation membranaire des cellules du pancréas, une augmentation de la concentration calcique intracellulaire entraînant l'exocytose des granules contenant l'insuline. Cet effet positif sur la sécrétion d'insuline et donc sur la glycémie sera potentialisé par des effets complémentaires déclenchés par le GLP-1. Il inhibe fortement la sécrétion de glucagon et stimule la sécrétion pancréatique de somatostatine qui à son tour peut inhiber la sécrétion de glucagon par une interaction paracrine (60). GLP-1R est exprimé certes au niveau pancréatique mais est également largement distribué au niveau du cœur, reins, cerveau, tractus gastro-intestinal et l'estomac. En plus de son rôle dit « insulino-trope », il intervient également dans d'autres mécanismes physiologiques, par exemple dans le contrôle de la motilité gastrique, dans la formation des cellules Béta des îlots de Langerhans, dans la plasticité neuronale et dans la régulation des concentrations sanguines de glucagon. Comme le GLP-1 inhibe la motilité et les sécrétions gastro-intestinales, il est impliqué également comme un composant majeur du "frein iléal". Au sein du syndrome métabolique et de toutes ses comorbidités, certaines études montrent une déficience d'expression de GLP-1 chez les sujets diabétiques de type 2 ainsi que chez les sujets obèses. Au niveau central, le GLP-1 agit sur son récepteur GLP-1R dans l'ARC et le PVN et joue également un rôle important dans la régulation de la prise

alimentaire en agissant comme un signal de satiété. Les actions biologiques du GLP-1 ont beaucoup été étudiées de par l'administration exogène de cette hormone chez le rongeur et l'homme. On sait par exemple que l'administration de GLP-1 inhibe la vidange gastrique, processus médié par le nerf vague, cette action participant bien évidemment à celle sur la satiété décrite précédemment. Le GLP-1 augmente également la dépense énergétique et a des répercussions sur la thermogénèse postprandiale. C'est dans cette optique que des recherches sur GLP-1 ont été entreprises dans la prise en charge des sujets obèses : il a en effet été démontré que la chirurgie bariatrique augmentait les taux de GLP-1 et d'insuline en période post-prandiale (61). Sa synthèse intestinale peut également être contrôlée par des récepteurs nucléaires impliqués dans l'homéostasie énergétique, dont nous parlerons plus tard au cours de ce manuscrit : l'induction de sa production intestinale par les récepteurs PPAR β/δ ou sa répression par le récepteur FXR (62–64).

2.2.2 Signaux d'adiposité

L'insuline des cellules Béta du pancréas et la leptine des adipocytes blancs (ainsi que de l'estomac et d'autres tissus) sont chacune sécrétées en proportion directe de la graisse corporelle et de l'état nutritionnel. Ces deux hormones sont transportées à travers la barrière hémato-encéphalique ou via l'éminence médiane (65) et accèdent aux neurones de l'hypothalamus pour influencer l'homéostasie énergétique. Ainsi, les neurones sensibles à l'insuline et/ou à la leptine reçoivent un signal directement proportionnel à la quantité de graisse dans l'organisme. En conséquence, si de l'insuline ou de la leptine exogène est ajoutée localement dans le cerveau, l'individu réagit comme s'il y avait un excès de graisse dans le corps, c'est-à-dire que l'apport alimentaire est réduit et que le poids corporel diminue. De même, si le signal de la leptine ou de l'insuline est réduit localement dans le cerveau, l'individu réagit comme s'il n'y avait pas assez de graisse dans l'organisme, il mange plus et prend du poids. Ces hormones agissent via leurs récepteurs respectifs présents dans les régions du SNC impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel, notamment dans l'ARC (14, 66). Ces récepteurs sont exprimés à la fois dans les populations neuronales anorexigènes exprimant POMC/CART et orexigènes exprimant NPY/AgRP.

2.2.2.1 La leptine

La leptine est une adipokine produite par les adipocytes en fonction des réserves de graisse. Son action consiste à réduire l'apport énergétique et réguler le poids corporel en agissant au niveau de ses récepteurs hypothalamiques. La leptine, au niveau du noyau arqué, module l'activité des neurones orexigènes et anorexigènes. En effet, elle inhibe l'expression des neuropeptides orexigènes NPY et AgRP diminuant le relargage de NPY et AgRP, résultant en une augmentation du tonus du système mélanocortine (67) et active l'expression des neuropeptides anorexigènes POMC et CART entraînant le relargage de MSH, diminuant la prise alimentaire et augmentant la dépense énergétique via le système mélanocortine (68). L'expression des récepteurs de la leptine n'est pas limitée à l'hypothalamus, elle est plutôt ubiquitaire dans l'organisme et permet ainsi, en plus de développer une régulation de l'homéostasie énergétique de manière large, d'avoir des actions variées comme sur le métabolisme du glucose, le métabolisme des lipides avec une inhibition de la lipogenèse et une stimulation de la lipolyse, la reproduction, l'angiogenèse, les fonctions immunitaires, la digestion, la cicatrisation, le remodelage osseux et la fonction cardiovasculaire. Les concentrations sanguines de leptine sont augmentées chez les patients obèses et sont fortement corrélées à l'IMC et au pourcentage de graisse corporelle. Un phénotype particulier de souris présentant une altération de la signalisation à la leptine, nommé « ob/ob » pour les déficientes en leptine ou db/db pour les déficientes en récepteurs de leptine, se traduit par une incapacité à réduire la prise alimentaire et la prise de poids et entraîne une obésité, accompagnée du développement d'un diabète et d'une réduction de la dépense énergétique.

2.2.2.2 L'insuline

L'insuline est une hormone hypoglycémisante sécrétée par les cellules β pancréatiques. En plus de ses actions au niveau périphérique, en traversant la barrière hémato-encéphalique via un transport actif saturable, elle possède une activité au niveau du SNC en se liant sur ses récepteurs (IR) localisés au niveau hypothalamique (69) et joue un rôle important dans la régulation de l'homéostasie énergétique (70). A ce niveau, elle diminue la prise alimentaire : des injections intracérébroventriculaires (ICV) d'insuline induisent une diminution de la prise alimentaire chez le babouin et le rat (71). Elle régule également l'expression génique des neuropeptides POMC et NPY(72). Les études de souris déficientes

en récepteur central de l'insuline rapportent des phénotypes altérés de type insulino-résistance, hyperleptinémie, hypertriglycéridémie, hyperphagie et obésité (73).

D'un point de vue mécanistique (figure 7), la fixation de l'insuline à son récepteur (de type tyrosine kinase) induit la trans-autophosphorylation de résidus cytosoliques du récepteur (IR), induisant son activation. Cette activation conduit au recrutement et à la phosphorylation des protéines Insulin Receptor Substrat (IRS) qui, à leur tour, vont phosphoryler la sous-unité p85 de l'enzyme phosphatidylinositol-3-OH-kinase (PI3K), induisant sa translocation à la membrane. La PI3K génère du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) à partir de phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2). La transformation du PIP2 en PIP3 est contrebalancée par des phosphatases telles que Phosphatase and TENsinhomolog (PTEN) ou SH2 domain containing Inositol 5-Phosphatase 2 (SHIP2). Le PIP3 phosphoryle et active la protéine dépendante de la phosphoinositide kinase 1 (PDK1) qui, à son tour, active la kinase Akt (ou protéine kinase B, PKB). Par phosphorylation, Akt inhibe la Glycogen Synthase Kinase 3 Beta (GSK3 β) et induit l'exclusion nucléaire du facteur de transcription Forkhead-O, (FOXO) et donc son inactivation. Il en résulte une levée d'inhibition de la transcription de POMC dans les neurones anorexigènes et une inactivation de la transcription d'AgRP/NPY dans les neurones orexigènes. Par ailleurs, l'insuline diminue l'excitabilité des neurones POMC. L'accumulation de PIP3 induite par l'insuline active des canaux potassiques ATP dépendants (KATP), hyperpolarisant la membrane des neurones POMC, induisant alors leur inactivation (74).

Dans l'ensemble, ces régulations concourent à une réduction de la prise alimentaire et à une augmentation des dépenses énergétiques.

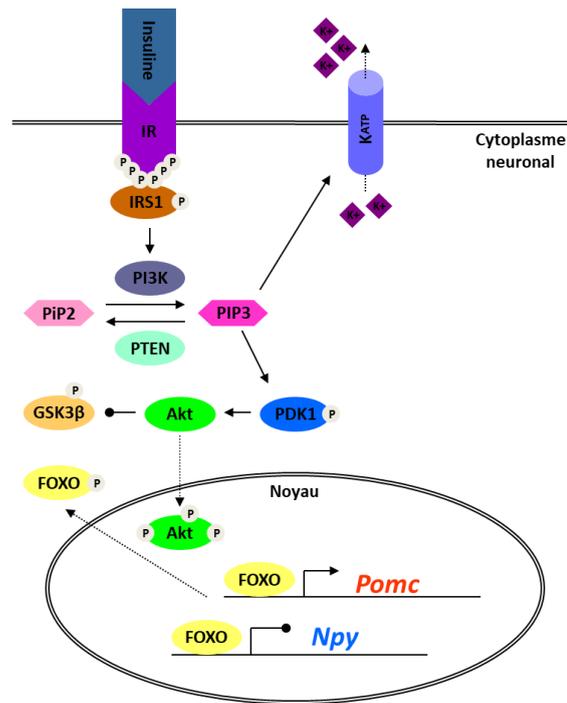


Figure 7 : Signalisation de l'insuline dans les neurones POMC et NPY de l'hypothalamus, d'après SE Amini, 2015. La fixation de l'insuline à son récepteur induit une cascade de signalisation, ayant pour finalité de contrôler la transcription de POMC dans les neurones anorexigènes et d'AgRP/NPY dans les neurones orexigènes. IRS : Insulin Receptor Substrat ; PI3K : phosphatidylinositol-3-OH-kinase ; PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate ; PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ; PTEN : Phosphatase and TENSinhomolog ; SHIP2 : SH2 domain containing Inositol 5-Phosphatase 2 ; PDK1 : phosphoinositide kinase 1 ; GSK3β : Glycogen Synthase Kinase 3 Beta ; FOXO : facteur de transcription Forkhead-O

2.2.3 Autres signaux provenant des systèmes adipeux, digestifs ou neuronaux

2.2.3.1 L'adiponectine

L'adiponectine est une adipokine exprimée dans le tissu adipeux et dans le sang circulant à concentration élevée, elle exerce ses rôles par l'intermédiaire de récepteurs AdipoR1, AdipoR2 et T-cadhérine. Plusieurs études montrent que les concentrations de cette hormone diminuent chez les sujets obèses et chez les sujets diabétiques. Parmi ses actions biologiques, nous pouvons citer ses effets sur le métabolisme du glucose, avec des effets hypoglycémiant et une amélioration de la sensibilité à l'insuline. Ses actions sur l'homéostasie énergétique sont parfois décrites de manière divergente.

2.2.3.2 La ghréline

La ghréline est un peptide sécrété par les cellules pariétales de l'estomac. Elle participe au contrôle entéro-hypothalamique de la signalisation de la prise alimentaire. Elle augmente la prise alimentaire et la masse grasse. Chez l'homme, il a été démontré que les concentrations plasmatiques de ghréline augmentent peu avant et diminuent rapidement après chaque repas, ce qui suggère un rôle dans l'initiation du repas (75). L'administration centrale ou périphérique chronique de ghréline augmente l'apport alimentaire et diminue la dépense énergétique, ce qui entraîne une prise de poids. Cet effet orexigène est médié par l'activation de neurones de NPY/AgRP (76–78).

2.2.3.3 Les orexines

Les orexines constituent une exception car parmi les signaux cités précédemment, elles ne sont pas issues du système gastro-intestinal. Deux formes d'orexine ont été décrites, l'orexine de type A, également appelée hypocrétine 1, et l'orexine de type B, également appelée hypocrétine 2, étant les ligands des récepteurs cérébraux OX1R et OX2R. Ces derniers présentent une diversité en termes de distribution cérébrale : ils sont présents dans le VMH, le PVN, les circuits mésolimbiques, l'hippocampe, le thalamus etc... Comme leur nom l'indique, les orexines stimulent la prise alimentaire, notamment via leur implication dans la régulation homéostatique de l'homéostasie énergétique, et donc les stimuli entraînant l'induction de leur expression comprennent un état de jeûne alimentaire, mais également une stimulation par les neurones hypothalamiques orexigènes ou les signaux gastro-intestinaux orexigènes (79). Etant donnée la diversité des récepteurs aux orexines dans des structures aussi bien hypothalamiques qu'extra-hypothalamiques, l'action des orexines intervient également dans la régulation hédonique de l'homéostasie énergétique, via des projections de leurs neurones vers les structures LHA et VTA (80). Ils sont également capables de stimuler l'activité locomotrice et donc l'activité physique de par leur interaction avec les systèmes dopaminergiques, sérotoninergiques et adrénergiques (81).

2.2.4 Signaux associés aux nutriments

Comme les signaux d'adiposité, les signaux associés aux nutriments tels que le glucose et les acides gras agissent en tant que molécules de signalisation afin d'apporter au SNC des informations relatives au statut nutritionnel et métabolique. Les mécanismes impliqués pour la détection de ces signaux par l'hypothalamus correspondent au métabolisme intracellulaire de ces molécules (82). Si nous prenons l'exemple du glucose, à l'image de ce qui se passe dans la cellule pancréatique, ce nutriment entre dans les neurones via un transporteur de type GLUT2, est phosphorylé par une glucokinase et suit le cycle de krebs. Ce dernier entraîne une élévation des taux d'ATP dans la cellule neuronale inhibant les canaux K_{ATP} , et modifiant les flux calciques, aboutissant à des modifications de la polarisation cellulaire (83). En fonction du taux de glucose extracellulaire, différentes populations neuronales pourront jouer leur rôle, notamment les neurones excités (GE) ou inhibés (GI) par le glucose, tous les deux exprimés au niveau de l'ARC. Lors d'une augmentation des concentrations extracellulaires de glucose, les neurones POMC/CART se dépolarisent et s'activent dans l'ARC, alors que les neurones AgRP sont inhibés. Les acides gras (84) sont également incorporés dans la cellule neuronale afin d'y être estérifiés et d'être engagés vers la synthèse lipidique ou l'oxydation après être incorporé dans la mitochondrie via le transporteur CPT1. L'oxydation des acides gras à longue chaîne est régulée par le malonyl-CoA, inhibiteur du transporteur CPT1. L'accumulation du malonyl-CoA dans l'hypothalamus est considérée comme un signal d'abondance nutritionnelle par les neurones régulant la prise alimentaire

Le contrôle de l'homéostasie énergétique par le SNC en réponse aux signaux périphériques précédemment décrits est obtenu grâce à une étroite interconnexion avec des voies neuroendocriniennes et autonomes. Les différents acteurs cérébraux, localisés notamment dans l'hypothalamus, reçoivent ces informations, se les relayent et délivrent en retour, à la périphérie, une réponse biologique adaptée. Ces processus sont assurés par un réseau hypothalamique énergétique contrôlant l'homéostasie énergétique et le tronc cérébral, reliant le réseau hypothalamique énergétique au système nerveux autonome (SNA).

2.3 Système nerveux autonome (SNA)

Le système nerveux autonome (SNA) innerve de nombreux organes périphériques et joue de ce fait un rôle important dans les réponses biologiques à apporter suite à un stimulus détecté par le système nerveux central (figure 8). Le SNA est composé d'une partie sympathique (SNS) et d'une partie parasympathique (PSNS). Le SNS est plutôt associé aux réponses cataboliques alors que le PSNS est plutôt associé aux réponses anaboliques. Parmi les organes périphériques jouant un rôle majeur dans l'homéostasie énergétique, il est bien décrit que le tissu adipeux est innervé par le système nerveux sympathique. Par ailleurs, le foie et le pancréas sont innervés par des nerfs splanchniques sympathiques et nerfs vagues parasympathiques. Enfin, les muscles squelettiques reçoivent des innervations à la fois sympathiques et parasympathiques. Les projections du système nerveux sympathique (SNS) vers les tissus périphériques impliquent le noyau intermédiaire-latéral (IML), alors que le système nerveux parasympathique (PSNS) implique le noyau dorsal du nerf vague (DMV). Le SNS permet par exemple de moduler la lipolyse du tissu adipeux blanc et son activité sécrétoire. Ces mécanismes de régulation de la lipolyse impliquent la LHA, le VMH et l'ARC. Egalement, l'homéostasie du glucose est régulée par le cerveau par le biais d'innervations sympathiques et parasympathiques vers le foie et le pancréas. Plusieurs noyaux hypothalamiques sont impliqués dans la régulation du métabolisme hépatique du glucose : la LHA, le VMH, l'ARC et le PVN. Le VMH, l'ARC entre autres contrôlent également la sécrétion pancréatique d'insuline et de glucagon (85). En pathologie, une suractivité du système nerveux sympathique peut être associée au développement du syndrome métabolique et de ses pathologies associées : trouble du métabolisme du glucose, insulino-résistance, hypertension artérielle, obésité (86–88).

Les messagers chimiques, appelés neurotransmetteurs et utilisés par le SNA, sont de différents types. Celui utilisé pour les relais pré-ganglionnaires, au niveau du système parasympathique ou sympathique, est l'acétylcholine. Elle agit sur des récepteurs nicotiques. Par contre, les neurotransmetteurs des neurones ganglionnaires (neurone ganglionnaire-effecteur) ne seront pas les mêmes si l'on se trouve au niveau du système parasympathique ou du système sympathique. En effet, dans le cas du système parasympathique, les neurones ganglionnaires libèrent aussi de l'acétylcholine, mais elle va agir cette fois-ci sur un autre type de récepteur qui sont les récepteurs muscariniques, situés au niveau de l'organe cible. Dans le

cadre de cette thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au système nerveux sympathique, étant donnée la composante catabolique du SNS intéressante dans la balance énergétique.

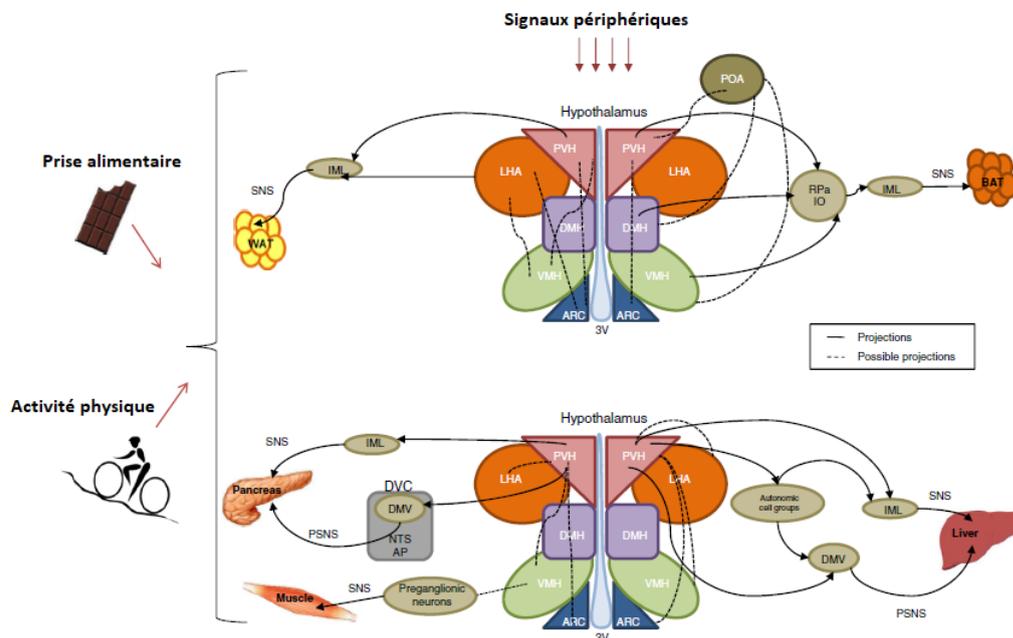


Figure 8: Contrôle de l'homéostasie énergétique par le SNA (d'après Seoane-Collazo et al, 2015). Les projections du système nerveux sympathique (SNS) vers les tissus périphériques impliquent le noyau intermédiaire latéral (IML), tandis que le système nerveux parasympathique (PSNS) relaie dans le noyau dorsal du nerf vague (DMV). Le SNS et le PSNS, via des projections émanant des différents noyaux hypothalamiques, contrôlent les grandes voies métaboliques telles que : la thermogénèse, la lipolyse du tissu adipeux blanc et son activité sécrétoire, l'homéostasie du glucose via des actions sur le foie, le pancréas et le muscle squelettique. POA : zone préoptique ; BAT : tissu adipeux brun ; VMH : noyau ventromédian ; DMH : noyau dorsomédian ; PVH : noyau paraventriculaire ; RPa : raphe pallidus ; TAE : tissu adipeux blanc ; LHA : aire hypothalamique latérale ; ARC : noyau arqué ; DMV : noyau dorsal du nerf vague ; AP : area postrema ; 3V : troisième ventricule

2.3.1 Le système nerveux sympathique : mise à profit dans la thermogénèse adaptative

Le système nerveux sympathique exerce ses effets sur les cellules et organes cibles essentiellement via des neurotransmetteurs appelés catécholamines (principalement la noradrénaline et l'adrénaline). Ces molécules de signalisation sont issues au départ d'acides aminés tels que la phénylalanine et la tyrosine, qui, après une succession d'étapes de transformations enzymatiques, aboutissent à la formation de noradrénaline et d'adrénaline. Parmi les étapes enzymatiques nécessaires, la tyrosine hydroxylase (TH) est considérée comme l'enzyme limitante nécessaire à la synthèse des catécholamines (89). Les neurones exprimant la TH sont localisés en partie dans le PVN et établissent des projections vers le tronc cérébral et la moelle épinière afin de contrôler le flux sympathique (90) vers des organes

périphériques. C'est le cas du tissu adipeux brun (TAB) dont nous allons prendre l'exemple afin d'illustrer le contrôle d'une grande fonction physiologique : la thermogénèse adaptative, par le système nerveux autonome (figure 9).

Dans l'hypothalamus, la zone préoptique (POA) est responsable de la régulation de la température et de la fièvre. Elle reçoit et intègre les informations relatives aux zones thermosensibles et module la thermogénèse du TAB stimulée par le SNS. Cependant, d'autres noyaux sont également impliqués dans la régulation de la thermogénèse sympathique comme le PVN, le VMH et le DMH, projetant des informations au raphe pallidus (RPa) pour moduler la réponse thermogénique du TAB via le SNS. Le TAB contient des fibres périphériques sympathiques exprimant la TH, permettant la sécrétion de catécholamines à ce niveau (91). Ces neurotransmetteurs se fixent sur leurs récepteurs dits « adrénergiques » ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$).

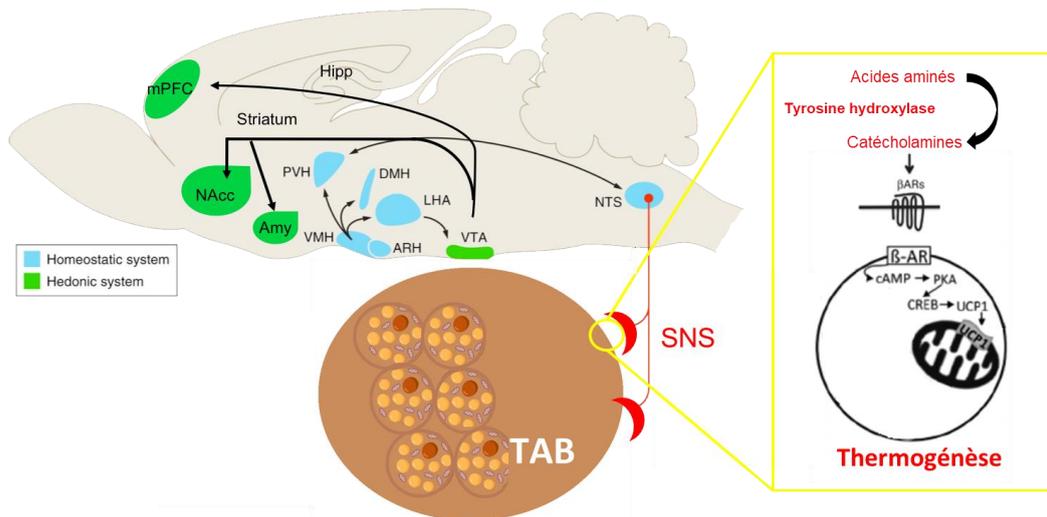


Figure 9 : Le tissu adipeux brun est activé par le système nerveux sympathique (schéma personnel, adapté de Bouret et al, 2015). La signalisation qui conduit à l'expression d'UCP1 dépend du système sympathique. L'activation des récepteurs adrénergiques est réalisée par les catécholamines. Ces dernières sont obtenues à partir d'acides aminés par une série de réactions enzymatiques, dont la tyrosine hydroxylase qui en est l'enzyme limitante de synthèse. SNS : système nerveux sympathique ; TAB : tissu adipeux brun ; PVH : noyau paraventriculaire ; LHA: aire hypothalamique latérale ; DMH: noyau dorsomédian ; VMH: noyau ventromédian ; ARH: noyau arqué ; NTS : noyau du tractus solitaire ; VTA : aire tegmentale ventrale ; AMY : amygdale ; NAcc : noyau accubens, mPFC : cortex préfrontal ; CREB : c-AMP Response Element-Binding protein ; UCP1 : uncoupling Protein 1

Pour ce qui est de la thermogénèse adaptative, cette forme de production de chaleur est utilisée par certains mammifères grâce au TAB, appelé également « graisse brune ». Ce type de tissu est retrouvé pendant toute la durée de vie d'un animal hibernant et certains petits mammifères (rongeurs) dans les régions interscapulaires, cervicales, thoraciques,

périoraortiques et périrénales. Chez les humains, on ne la trouve qu'en petites quantités chez les nouveau-nés, où il sert probablement à compenser les pertes de chaleur, de 37°C dans le compartiment utérin mais chutant brutalement lors de l'accouchement pour s'orienter vers la température ambiante de la salle de naissance. Néanmoins, certains auteurs ont démontré l'existence de tissu adipeux brun fonctionnel chez l'homme adulte (figure 11), principalement localisé à la base du cou et activé métaboliquement par le froid (92, 93). Les adipocytes bruns ont une histologie bien particulière qui les différencie des adipocytes blancs (figure 10), ils sont dits multiloculaires car ils possèdent un nombre important de petites gouttelettes lipidiques avec un noyau central. Ils sont très riches en mitochondries, en fer au niveau matrice mitochondriale et également très vascularisés, tous ces éléments participant à la couleur brune foncée caractéristique.

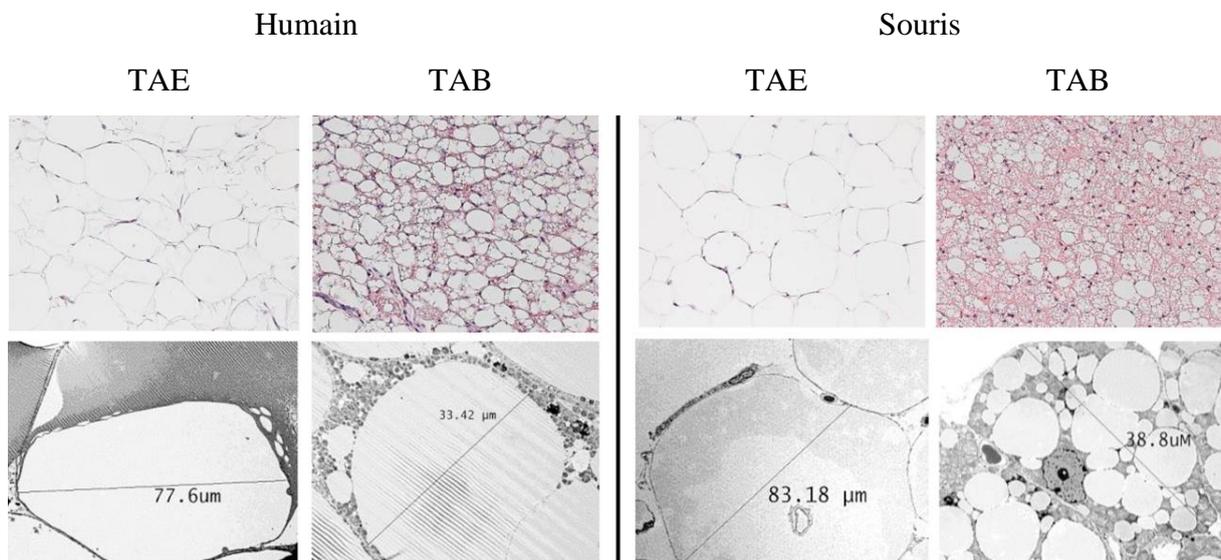


Figure 10: Histologie des tissus adipeux blancs et tissus adipeux bruns chez l'humain et la souris (d'après Porter et al 2016). Coupes représentatives de tissus adipeux provenant d'échantillons humains et de souris, montrant les différences de taille et de morphologie des cellules entre les adipocytes bruns (TAB) et blancs (TAE). La microscopie électronique permet d'apprécier l'abondance et la morphologie des mitochondries : rares dans le TAE mais abondantes dans le TAB.

Le TAB est innervé et stimulé par le système nerveux sympathique afin de produire de la chaleur en réponse au froid, mais également pour maintenir l'homéostasie énergétique : en effet le cerveau peut augmenter le tonus sympathique vers le TAB dans le but de brûler des quantités excessives de nutriments dans des conditions de satiété, mais il est également capable de diminuer ce tonus pour économiser de l'énergie en cas de jeûne.

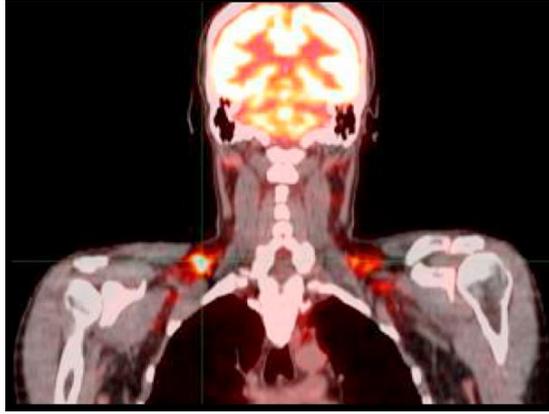


Figure 11 : Mise en évidence du tissu adipeux brun chez l'humain, (d'après Porter et al 2016, images obtenues par tomographie par émission de positons). La technique d'imagerie de tomographie par émission de positons montre que les humains ont des dépôts de tissus adipeux bruns symétriques

La chaleur produite est dissipée par des vaisseaux sanguins vers les régions vitales à conserver, le cerveau, le cœur et le rein. Pour son fonctionnement, le TAB utilise comme substrat les acides gras libérés par la lipolyse à partir de triglycérides. En plus de ce mécanisme, s'ajoute celui du découplage de la respiration mitochondriale. Le fonctionnement classique d'une respiration mitochondriale consiste au transfert d'électrons entre les complexes de la chaîne respiratoire, aboutissant à l'éjection de protons dans l'espace intermembranaire. Comme la membrane interne mitochondriale ne laisse que très peu passer les protons, ces derniers s'accumulent, créent un gradient électrochimique, ceci étant mis à profit par l'ATP synthase pour transformer cette énergie en molécule d'ATP. Les mécanismes moléculaires à la base de la thermogénèse sont contrôlés par le niveau de couplage entre les réactions chimiques fournissant de l'énergie et celles nécessitant un apport d'énergie, mais aussi par les activités des ATP-ases capables d'hydrolyser l'ATP, qui représente la forme de stockage et d'utilisation de l'énergie chimique. Lors de la respiration cellulaire, une quantité très importante d'énergie libre est libérée, et une grande partie de cette énergie est transformée en ATP par une enzyme : l'ATP-synthase mitochondriale, mécanisme nommé « phosphorylation oxydative ». En fonction de l'excès ou du déficit de couplage respiratoire, la production en ATP peut être extrêmement augmentée ou réduite, aboutissant respectivement au stockage excédentaire ou défavorisé d'énergie

Dans les TAB, les cellules expriment un canal à proton particulier, nommé protéine découplante (uncoupling protein) UCP1, dans la membrane interne (figure 12). Elle dissipe le gradient électrochimique cité précédemment au détriment de la production d'énergie sous

forme d'ATP : l'énergie sera libérée finalement sous forme de chaleur, on dit alors que la respiration mitochondriale est découplée de la synthèse d'ATP (94). Cette protéine est une cible potentielle de molécules favorisant l'oxydation des graisses, la thermogénèse et la dépense énergétique. Il a été démontré que l'augmentation de l'expression de la protéine UCP1 de manière génétique ou pharmacologique pouvait réduire l'obésité et améliorer la sensibilité à l'insuline (95).

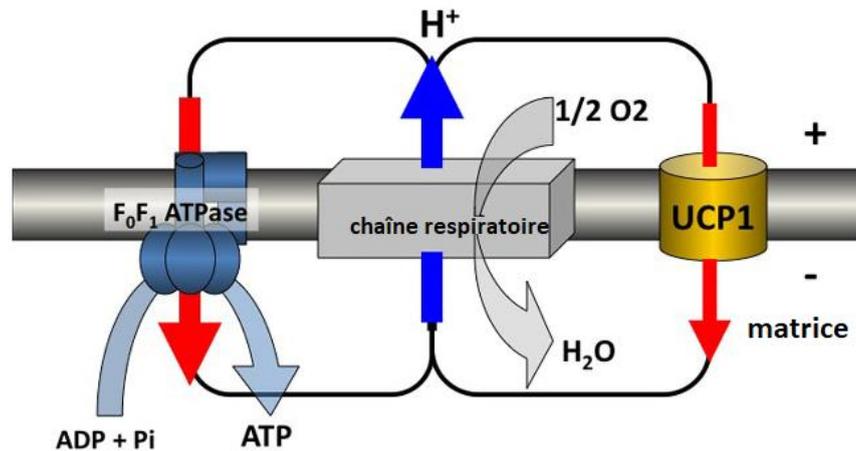


Figure 12 : Fonctionnement d'une mitochondrie en présence d'UCP1 (d'après Ricquier et al 2011). La protéine UCP1 est insérée dans la membrane interne de la mitochondrie à proximité des complexes de la chaîne respiratoire. UCP1 transporte passivement les protons et rend possible un cycle de protons à travers la membrane interne conduisant à une dépense énergétique accrue et une production de chaleur par ces cellules thermogéniques. UCP1 : uncoupling Protein 1

Partie B. Le récepteur aux acides biliaires, FXR

1. Les récepteurs nucléaires

La superfamille des récepteurs nucléaires est composée d'une cinquantaine d'espèces chez l'homme. Ces derniers correspondent à des facteurs de transcription activables par leur liaison à un ligand, ayant fréquemment des propriétés lipophiles marquées : acides gras, hormones, vitamines, acides biliaires...leur permettant de diffuser au travers de la membrane plasmique. En absence de ligand, le récepteur nucléaire est associé à des protéines de type hsp. La fixation d'un ligand dissocie ce complexe, permettant au récepteur activé de se lier à la région promotrice de gènes, soit pour augmenter, soit pour réprimer leur transcription en ARN messagers. Leur structure repose sur l'existence de 4 domaines fonctionnels : (1) un domaine de liaison du ligand (LBD), (2) un domaine de liaison à l'ADN (DBD), (3) un domaine

modulateur, (4) un domaine charnière. Les éléments de réponse présents au niveau du promoteur des gènes cibles sont ainsi reconnus par le récepteur nucléaire afin de déclencher l'activité transcriptionnelle. Cette interaction s'effectue via une dimérisation de deux récepteurs nucléaires se liant à l'élément de réponse, soit entre deux récepteurs nucléaires de la même espèce (homodimères), soit entre deux récepteurs nucléaires d'espèces différentes (hétérodimères), ou alors sans processus de dimérisation (fixation d'un monomère).

Les récepteurs nucléaires jouent un rôle fondamental dans divers processus biologiques comme le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, la mort cellulaire et le métabolisme. Par conséquent, une dérégulation du fonctionnement de ces récepteurs est souvent à l'origine de troubles biologiques majeurs. D'un point de vue métabolique, ces récepteurs sont impliqués dans des voies physiopathologiques associées au diabète de type 2, aux dyslipidémies et aux maladies cardiovasculaires, ceci ayant entraîné le développement de molécules pharmacologiques ayant pour cible ces récepteurs. Parmi eux, nous pouvons citer les récepteurs des hormones stéroïdes, les récepteurs des hormones thyroïdiennes, les récepteurs des rétinoïdes, le récepteur de la vitamine D.

Des études récentes ont démontré que les récepteurs nucléaires sont exprimés dans différentes régions du cerveau, notamment au sein du réseau énergétique décrit précédemment (96–98). A ce niveau, leur rôle dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique est encore assez peu connu. Néanmoins, des expérimentations d'administration centrale de ligands de récepteurs nucléaires ont pu mettre en évidence leur implication dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique.

Par exemple, l'injection centrale de 17β -estradiol (E2) a permis de diminuer la prise alimentaire et le poids corporel chez l'animal. De la même manière, l'administration centrale de glucocorticoïdes chez le rat a augmenté leur poids corporel et leur prise alimentaire, alors qu'une administration périphérique avait l'effet inverse. Également, l'administration centrale de vitamine D chez des rats soumis à un régime riche en graisse a diminué le poids corporel et la prise alimentaire (99). Enfin, l'administration centrale de ligands du récepteur PPAR α chez la souris a permis de réduire l'utilisation et le catabolisme du glucose par l'organisme, notamment le tissu adipeux. Chez des souris globalement invalidées pour PPAR α , les auteurs ont montré que ces capacités de catabolisme du glucose, l'expression de GLUT4, la masse

grasse et l'insulinosensibilité étaient augmentées (100). Une autre isoforme de PPAR s'est également montrée intéressante dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Certains auteurs ont montré que l'activation ou l'inhibition du récepteur PPAR- γ central, de manière pharmacologique ou génétique, entraîne une modification du bilan énergétique chez le rat (101).

2. Le récepteur nucléaire Farnesoid X receptor (FXR)

Le récepteur FXR fait partie de la super-famille des récepteurs nucléaires. Il existe trois classes de ligands de FXR: (1) les ligands naturels endogènes représentés par les acides biliaires (AB), (2) les ligands synthétiques et (3) les ligands semi-synthétiques dérivés de la structure des AB, décrits plus tard dans le manuscrit.

FXR est codé par deux gènes : FXR α (Nr1h4) et FXR β (Nr1h5), ce dernier étant un pseudogène chez l'Homme. FXR α possède deux promoteurs distincts et donne, après épissage, quatre isoformes (α 1, α 2, α 3, α 4) (102), exprimées au niveau du foie, du tissu adipeux, de l'intestin, du pancréas, des glandes surrénales et des reins (103). Suite à l'activation de FXR par un ligand, FXR exerce son activité transcriptionnelle via sa fixation, sous forme d'hétérodimère avec le récepteur nucléaire Retinoid X Receptor (RXR), à des éléments de réponse situés dans les promoteurs de ses gènes cibles (104), tels que SHP (Small Heterodimer Partner), un gène cible clé de FXR (figure 13).

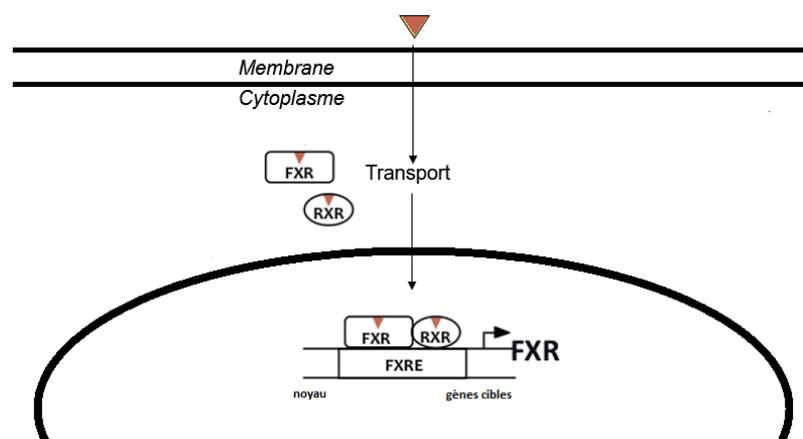


Figure 13 : Mécanisme général des effets génomiques médiés par FXR (schéma personnel). FXR est un facteur de transcription qui appartient à la famille des récepteurs nucléaires, activable par des ligands. Il contrôle la transcription de gènes cibles impliqués dans les métabolismes glucidiques, lipidiques et des acides biliaires

2.1 Fonctions métaboliques de FXR : un senseur métabolique en périphérie

La mise en évidence de l'implication de FXR dans la régulation du métabolisme périphérique découle d'une part, du phénotype observé des souris déficientes pour FXR (FXR^{-/-}) et d'autre part, de l'observation des conséquences d'un traitement pharmacologique par des ligands naturels ou synthétiques de FXR.

Les conséquences métaboliques de la déficience en FXR ou de son activation pharmacologique sont expliquées par le fait que FXR participe à différents aspects du métabolisme hépatique. Il active la transcription de gènes impliqués dans les voies biochimiques du métabolisme lipidique, par exemple ceux impliqués dans la clairance des lipoprotéines plasmatiques, ou en réprimant le facteur de transcription lipogénique SREBP-1c (105). Il participe également au métabolisme glucidique en modifiant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de glycogène et de la néoglucogénèse, tels que PEPCCK ou Glucose 6 phosphatase (103). Les études concernant l'activation de ce récepteur capable de réguler les métabolismes lipidiques et glucidiques ont généralement été réalisées dans des modèles animaux nourris. Récemment, une étude a montré que dans un modèle de jeûne alimentaire, FXR augmente l'expression des gènes de la néoglucogénèse par l'intermédiaire de la voie de signalisation PKA, et lève l'inhibition effectuée sur la voie de la néoglucogénèse par SHP, par l'intermédiaire du facteur de transcription FOXA2 (106). De plus, FXR inhibe la biosynthèse des acides biliaires et stimule leur sécrétion dans la bile, protégeant ainsi le foie d'un excès d'acides biliaires (107).

Les souris FXR^{-/-} présentent divers troubles métaboliques se traduisant par une intolérance au glucose, une diminution de la sensibilité à l'insuline, une hypertriglycéridémie et une hypercholestérolémie ainsi qu'un taux sérique d'AB élevé, comparativement à leurs contrôles de portée (souris FXR^{+/+}) (105). Le traitement pharmacologique par des ABs ou le GW4064 dans des modèles murins d'obésité génétique ou induite par une alimentation riche en graisse conduit à la diminution de l'hypertriglycéridémie, de l'hypercholestérolémie, des taux d'acides gras et de lipoprotéines (VLDL et LDL) ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une réduction de la glycémie (108, 109).

Il est à noter que FXR joue un rôle dans d'autres tissus périphériques (figure 14) tels que le tissu adipeux, les intestins ou le pancréas où FXR régule des mécanismes tels que différenciation adipocytaire, la sécrétion de GLP-1 et la sécrétion d'insuline respectivement (64, 110).

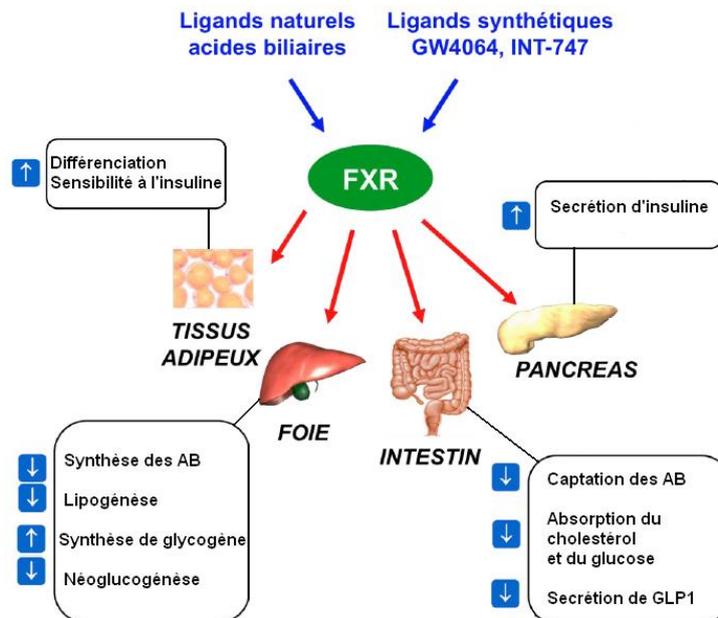


Figure 14 : FXR : senseur métabolique en périphérie (schéma personnel). FXR participe au métabolisme hépatique : il contrôle le métabolisme des acides biliaires (AB), le métabolisme des lipides et celui du glucose. Il existe des actions complémentaires dans le tissu adipeux, le pancréas et l'intestin, faisant de FXR un senseur métabolique en périphérie. Il peut être activé par différents ligands : les acides biliaires qui sont des ligands naturels mais aussi par des ligands synthétiques ou semi-synthétiques

3. Les acides biliaires : ligands naturels de FXR

Les AB représentent les ligands endogènes du récepteur nucléaire FXR. Ils sont synthétisés à partir du cholestérol au niveau hépatique et ont la particularité d'avoir un caractère amphipathique, possédant des propriétés détergentes en facilitant l'absorption des lipides et vitamines lipo-solubles par l'intestin. Les AB (tableau 1) subissent un cycle entéro-hépatique qui contribue premièrement à l'existence d'AB libres ou conjugués à une molécule de taurine ou de glycine et deuxièmement à l'obtention d'AB secondaires après transformation par la flore bactérienne digestive (104).

Acides biliaires primaires libres	
acide cholique	CA
acide chénodésoxycholique	CDCA
acide α -muricholique	α -MCA
acide β -muricholique	β -MCA
Acides biliaires primaires conjugués	
TCA, GCA, TCDCA, GCDCA...	
Acides biliaires secondaires libres	
acide ω -muricholique	ω -MCA
acide désoxycholique	DCA
acide ursodésoxycholique	UDCA
acide hyocholique	HCA
acide hyodéoxycholique	HDCA
Acides biliaires secondaires conjugués	
TDCA, GDCA, TLCA, GLCA...	

Tableau 1 : Description des différentes espèces d'acides biliaires. Les acides biliaires peuvent être libres ou conjugués à une molécule de taurine (T) ou de glycine (G). La transformation des acides biliaires primaires vers les secondaires est effectuée par la flore bactérienne digestive

Le pool systémique d'AB chez la souris est majoritairement composé de dérivés du α , β -MCA et CA, principalement sous formes libres, alors que chez l'humain les formes majoritaires sont dérivées du CDCA: 13% libres, 8% tauro-conjuguées, 79% glyco-conjuguées (105, 111). Tous les AB n'ont pas la même capacité à activer FXR : le CDCA est l'activateur le plus puissant (EC_{50} :50 μ M chez la souris) suivi du DCA et du LCA (112, 113). Le T β -MCA a des effets antagonistes vis à vis de FXR (114). Il est à noter que les AB peuvent se fixer également au récepteur membranaire couplé aux protéine G TGR5 mais également à d'autres récepteurs nucléaires tels que le récepteur Pregnane X Receptor (PXR), le récepteur à la vitamine D (VDR).

Les AB sont considérés comme des molécules de signalisation, ils sont produits par le foie et sécrétés en relation avec le repas, régulant de manière coordonnée le métabolisme via FXR (entre autres récepteurs). Au niveau hépatique, les effets des AB médiés par FXR sont intéressants et variés : (1) pour l'hépatocyte, une diminution de la synthèse des AB, une augmentation de leur conjugaison et sécrétion, une diminution de la lipogenèse et de la glycolyse, et une augmentation de la glycogénèse via FGF15/19 ; (2) pour la cellule stellaire, une diminution de la fibrose et (3) pour la cellule de Kupffer, une diminution de son

activation. Tout cela a pour but de modifier l'activité des récepteurs aux AB, l'homéostasie métabolique et d'assurer une hépato-protection contre des lésions (103).

Au niveau intestinal (entérocyte), la signalisation AB-FXR induit la production du facteur de croissance FGF19 (l'analogue humain du FGF15 murin), qui, en agissant sur le foie, effectue un rétrocontrôle négatif sur la synthèse des AB (115). De plus, les effets des AB médiés par FXR sont également intéressants et complémentaires à ceux observés pour le foie : une diminution de l'absorption des acides biliaires, une augmentation de l'absorption du glucose, un contrôle de l'intégrité intestinale.

Le cerveau exerce un contrôle neuronal, hormonal et circadien sur l'homéostasie des ABs et du microbiote (116). Les ABs sont bactéricides et peuvent contrôler la prolifération des bactéries intestinales en endommageant la membrane bactérienne. À leur tour, la composition en ABs est influencée par la biotransformation effectuée par les bactéries du microbiote intestinal. Les acides biliaires circulant peuvent rejoindre leurs récepteurs spécifiques au niveau cérébral. Certains ABs peuvent exacerber l'inflammation, la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et les maladies neurologiques, tandis que d'autres acides biliaires peuvent protéger contre ces processus. Les lipopolysaccharides et les acides gras à chaîne courte peuvent être libérés par des bactéries pathogènes intestinales, ce qui peut encore exacerber la neuroinflammation, la perméabilité de la BHE et les maladies neurologiques. La dérégulation du métabolisme des acides biliaires peut provoquer des maladies liées au foie, décrites plus tard au cours de ce manuscrit. Les échanges cerveau – acides biliaires – récepteurs aux acides biliaires – organes périphériques (figure 15) sont donc multidirectionnels, à l'image de ce qui a déjà décrit dans la régulation du métabolisme du glucose par exemple (117).

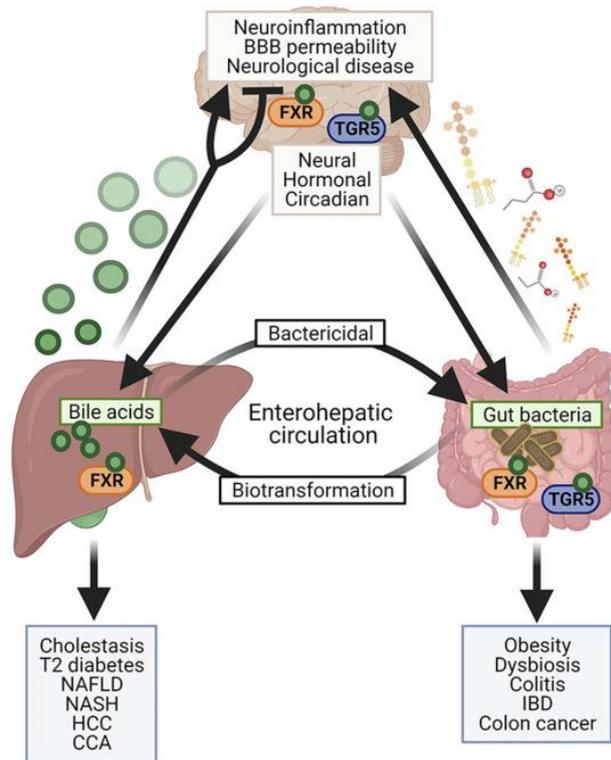


Figure 15 : Les acides biliaries dans l'axe foie-intestin-cerveau (d'après Ferrell et al, 2021). Les acides biliaries et le microbiote intestinal présentent des interactions mutuelles. Les acides biliaries peuvent dans certaines conditions rejoindre le système nerveux central et y activer leurs récepteurs. Certains acides biliaries peuvent exacerber l'inflammation, la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BBB) et les maladies neurologiques, au même titre que certains composés provenant des bactéries intestinales. La dérégulation du métabolisme des acides biliaries peut provoquer des maladies liées au foie, telles que la cholestase, le diabète de type 2, la stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), la stéatohépatite non alcoolique (NASH), le carcinome hépatocellulaire (HCC) et le cholangiocarcinome (CCA), ainsi que l'obésité, la colite, les maladies inflammatoires de l'intestin (IBD) et le cancer du côlon.

Au total, toutes ces données résument les effets pléiotropiques de la signalisation AB-FXR dans la régulation du métabolisme. Les AB exercent un rôle important dans le contrôle du métabolisme, de l'inflammation et de l'intégrité hépatique/intestinale.

4. Les acides biliaries et leurs récepteurs : un potentiel thérapeutique prometteur

Etant donnés les effets importants des ABs dans le contrôle du métabolisme, de l'inflammation et de l'intégrité hépatique/intestinale, les ABs et leurs récepteurs ont été investigués lors d'essais cliniques et en recherche pharmacologique (tableau 2).

	Compound	Chemical class (Alternative name)	EC ₅₀ (µM)	Provider	Clinical development phase	Biological effects	References
FXR agonists							
Natural	CDCA	Endogenous bile acids	10 - 20			↓Plasma TG, ↓HDL, ↑LDL	(36, 37, 55, 56, 103-106)
	DCA		100			↓HDL	
	LCA		3.8				
	CA		>1000				
	Procyanidin extract	Flavonoid from grape seed			Preclinical	↓Plasma TG in mice	(107, 108)
Cafestol	Diterpene from unfiltered coffee			Preclinical	↑Plasma cholesterol in mice	(109)	
Synthetic	INT-747	6-Ethyl-CDCA (Obeticholic acid)	0.1	Intercept Pharmaceuticals	Phase II, phase III for PBC planned	↓PBC; ↓insulin resistance and ↑liver function in T2D; ↓plasma TG, ↓HDL, ↑LDL	(110), EASL 2010, EASD 2009, Intercept press releases 2009/2011
	GW4064	Isoxazole	0.065	GlaxoSmithKline	Preclinical	↓Gallstones in mice; ↓plasma TG in rats and ob/ob mice; ↓insulin resistance in ob/ob and db/db mice	(29, 57, 114, 115)
	GSK8062	GW4064 analog	0.037	GlaxoSmithKline	Preclinical	↓Cholestasis in rats	(116)
	GSK2324	GW4064 analog (Quinoline)	0.05	GlaxoSmithKline	Preclinical	↓DI-weight gain and hyperglycemia in mice	(117)
	Compound 13 Compound 22	GW4064 analogs	0.03	Phenex	Preclinical	↓Plasma TG and hyperglycemia in db/db mice	(118)
	Px-102	Non-steroidal		Phenex	Phase I, phase II for MS / NASH planned	↓Plasma lipids, ↑hepatic insulin sensitivity, hepatoprotective in rodents	Phenex press release 2011
FXR-450	Tetrahydroazepino indole (WAY-362450) (XL335)	0.016	Wyeth (Pfizer) / Exelixis	Phase I	↓Plasma TG and TC in rodents; ↓atherosclerosis in male LDLR-KO mice; ↓NASH in MCD-fed mice	(59, 64, 119, 120)	
14cc	FXR-450 analog	0.052	Wyeth (Pfizer) / Exelixis	Preclinical	↓Plasma TG, VLDL, LDL in rhesus monkeys	(121)	
Fexaramine	Benzopyran	0.025		Preclinical		(122, 123)	
FXR antagonists							
Natural	Guggulsterone	Part of guggulipid, plant sterol from the guggul tree			Approved in India	↓Plasma TG, TC, LDL; ↑LDL, no change in TC, HDL, VLDL, TG; ↓FXR activation <i>in vitro</i> ; ↑BSEP expression in rodents	(125-127, 129, 130)
TGR5 agonists							
Natural	LCA	Endogenous bile acids	0.58			↓Cytokine production in macrophages <i>in vitro</i> ; ↑energy expenditure in mice	(13, 24, 96)
	DCA		1.25				
	CDCA		6.7				
	CA		13.6				
	Oleanolic acid	Triterpene from olive tree leaves	2.25		Preclinical	↓Insulin resistance in DIO mice; ↓colitis in mice	(97, 135)
	Betulnic acid	Triterpene	1		Preclinical		(136)
Synthetic	INT-777	6-Ethyl-23-methyl-CDCA (S-EMCA)	0.82	Intercept Pharmaceuticals	Preclinical	↑Energy expenditure, ↑GLP-1 release, ↓glucose intolerance in mice; ↓atherosclerosis in LDLR-KO mice; choleric in mice	(95, 98, 99, 137)
	Compound 32	Quinoline	0.28	Kalypsys	Preclinical	↑GLP-1 release, ↑OGTT in DIO mice	(138)
	Compound 6 Compound 7	3-Aryl-4-isoxazole-carboxamides	5 - 10	GlaxoSmithKline	Preclinical	↑GLP-1 release in dogs	(139)
	XL475			Exelixis out-licensed to Bristol-Myers Squibb	Preclinical	↑Glucose tolerance, ↓plasma and hepatic lipids, hepatic steatosis in rodents	Exelixis website
	6-Methyl-2-oxo-4-thiophen-2-yl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylic acid benzyl ester		0.036	Takeda	Preclinical		(167)
	BR27			Bayer AG	Preclinical	↓Cytokine production in mouse Kupffer cells	(140)
	Ciprofloxacin	Antibiotic			Preclinical	↓Colitis in mice	(135)
Dual FXR and TGR5 agonists							
	INT-767	6α-ethyl-3α,7α,23-trihydroxy-24-nor-5β-cholan-23-sulfate sodium salt	0.03 (FXR), 0.63 (TGR5)	Intercept Pharmaceuticals	Preclinical	↓Plasma TG, TC in db/db and STZ treated mice; ↓genetic cholangiopathy in mice	(141, 142)
BA sequestrants							
	Colesevelam	Polymer (Cholestigel®) (Welchol®)		Daichii Sankyo	Approved for dyslipidemia and diabetes	↓LDL, ↓small LDL, ↑TG; ↓hyperglycemia/HbA1c, ↑GLP-1/GIP in T2D	(148, 149, 153, 163)
	Colestimide	Polymer (Colestilan®)			Approved for dyslipidemia	↓LDL, ↓small LDL, ↑plasma TG; ↓ALT/AST in NAFLD; ↓hyperglycemia/HbA1c, ↑GLP-1 in T2D	(147, 151, 152, 162)
	Cholestyramine	Polymer (Questran®)			Approved for dyslipidemia	↓LDL, ↑plasma TG; ↓hyperglycemia in T2D; ↑GLP-1 in diabetic rats	(52, 145, 146, 154, 165)
	Colestipol	Polymer (Colestid®)			Approved for dyslipidemia	↓LDL, ↑plasma TG;	(52)

Tableau 2 : Modulateurs de l'activité des récepteurs aux acides biliaires, (d'après Porez et al)

4.1 La chirurgie bariatrique

Les ABs sont d'importants modulateurs moléculaires des effets bénéfiques de la chirurgie bariatrique (118). Les chirurgies à but de perte de poids telles que le «Roux-en-Y gastric bypass » (RYGB) et la «vertical sleeve gastrectomy » sont caractérisées par une augmentation des AB circulants et nécessitent un FXR (et un TGR5) fonctionnel pour leur métabolisme et la réussite de l'acte (119–121). En général, les effets observés sont impressionnants après la chirurgie : les diminutions de poids corporel et de la prise alimentaire sont telles qu'elles permettent secondairement des améliorations de l'homéostasie glucidique et donc une amélioration du diabète de type 2, mais également des améliorations du métabolisme lipidique hépatique se traduisant par une amélioration/rémission des maladies stéatosiques du foie.

4.2 Les résines hypocholestérolémiantes

L'homéostasie des ABs et l'activation de leurs récepteurs peuvent être modulées par des séquestrants d'ABs, représentés par des résines (figure 16): la cholestyramine et le Colesevelam. Elles complexent les ABs dans l'intestin, par une interaction avec le cœur hydrophobe des ABs, afin de favoriser l'excrétion fécale des ABs au détriment d'une recirculation par l'intermédiaire du cycle entéro-hépatique. Cette suppression du cycle entéro-hépatique des ABs va fortement diminuer la quantité d'ABs circulants et donc la quantité d'ABs arrivant au niveau du foie (122), ce qui induit l'activation de la 7alpha hydroxylase afin d'augmenter la synthèse des ABs par compensation. La synthèse des acides biliaires étant la voie de catabolisme du cholestérol, la transformation accrue de ce dernier lors de l'activation de la 7alpha hydroxylase accélère le catabolisme du cholestérol, d'où un effet hypocholestérolémiant. Les résines hypocholestérolémiantes ont donc la capacité de modifier la composition du pool d'ABs dans l'organisme : elles modifient le caractère physico-chimique de ce pool : augmentation de l'hydrophilie (123) mais elles modifient également son potentiel d'activation vis-à-vis des récepteurs aux acides biliaires (diminution de CDCA et de DCA, activateurs puissants sur FXR). L'effet hypocholestérolémiant des résines représente leur principale indication en clinique. La Haute Autorité de Santé précise que leur utilisation a pour but de diminuer les taux de cholestérol total et de LDL-cholestérol. Elles peuvent également être associées à d'autres thérapeutiques hypocholestérolémiantes comme les Statines ou l'Ezétimibe afin de renforcer l'effet hypocholestérolémiant.

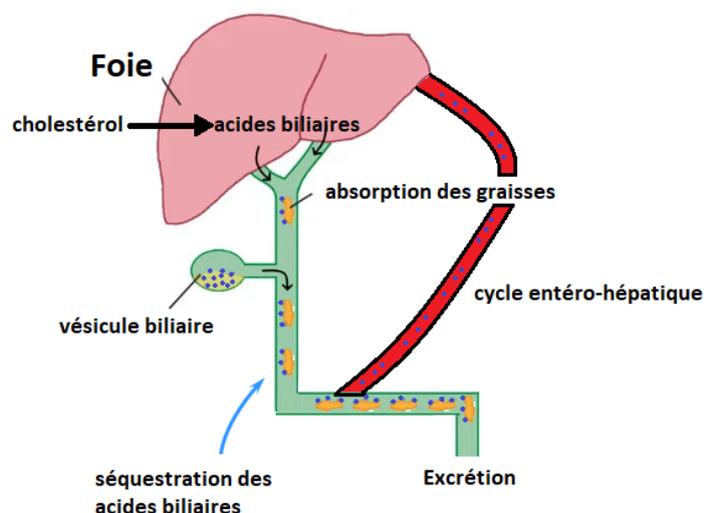


Figure 16: Mécanisme d'action des résines hypocholestérolémiantes (schéma personnel). Les acides biliaires sont en condition normale majoritairement réabsorbés et subissent un cycle entéro-hépatique ; une infime partie est éliminée au niveau fécal. Les résines hypocholestérolémiantes possèdent un effet intestinal par séquestration des acides biliaires, qui seront éliminés dans les selles. Cette séquestration supprime le cycle entéro-hépatique des acides biliaires, il en résulte une diminution de la concentration des acides biliaires au niveau du foie, activant la 7alpha hydroxylase et entraînant une accélération du catabolisme du cholestérol

4.3 Les agonistes de TGR5

L'activation du récepteur transmembranaire TGR5 présente des effets intéressants, potentiellement utilisables en clinique pour le diabète de type 2 ou l'obésité. Parmi ces effets, nous pouvons citer des propriétés anti-inflammatoires, TGR5 étant exprimé dans les monocytes et les macrophages (124). Il favorise d'autre part la sécrétion de GLP-1 dans les cellules intestinales de type L (125) mais aussi l'activation de la dépense énergétique dans le TAB (126). Parmi les différents agonistes développés, la molécule INT-777 a montré lors d'études précliniques une amélioration de l'homéostasie glucidique, une augmentation de la dépense énergétique et une diminution des phénomènes d'athérosclérose. Néanmoins, l'utilisation de ce genre de molécule s'accompagne d'effets indésirables, préjudiciables à l'observance au traitement, parmi lesquels le développement d'un prurit et l'augmentation du volume de la vésicule biliaire (127, 128).

4.4 Les agonistes de FXR

Les agonistes de FXR ont été étudiés fortement pour les maladies du foie, en effet FXR est impliqué dans le développement des maladies stéatosiques. La stéatose hépatique correspond à une accumulation de graisse dans le foie. Lorsque l'accumulation de graisse dans le foie se produit en dehors d'une consommation élevée d'alcool, on parle de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD). Cette maladie évolue en plusieurs phases. Au départ, l'accumulation de triglycérides dans l'hépatocyte est responsable de la stéatose de manière isolée et, par conséquent, des mesures hygiéno-diététiques peuvent permettre une guérison. Le foie peut alors retrouver son aspect normal. Par contre, si l'accumulation en triglycérides se poursuit, le foie est soumis à une inflammation intense appelée hépatite : hépatite stéatosique non alcoolique (NASH), ayant tendance à s'aggraver avec le temps. Le pronostic du patient peut être sévère avec un risque d'évolution du foie vers la fibrose ou la cirrhose, ou l'installation de tumeurs (cancer hépatique). A ce stade, un traitement approprié permet de ralentir la cinétique de cette évolution (figure 17).

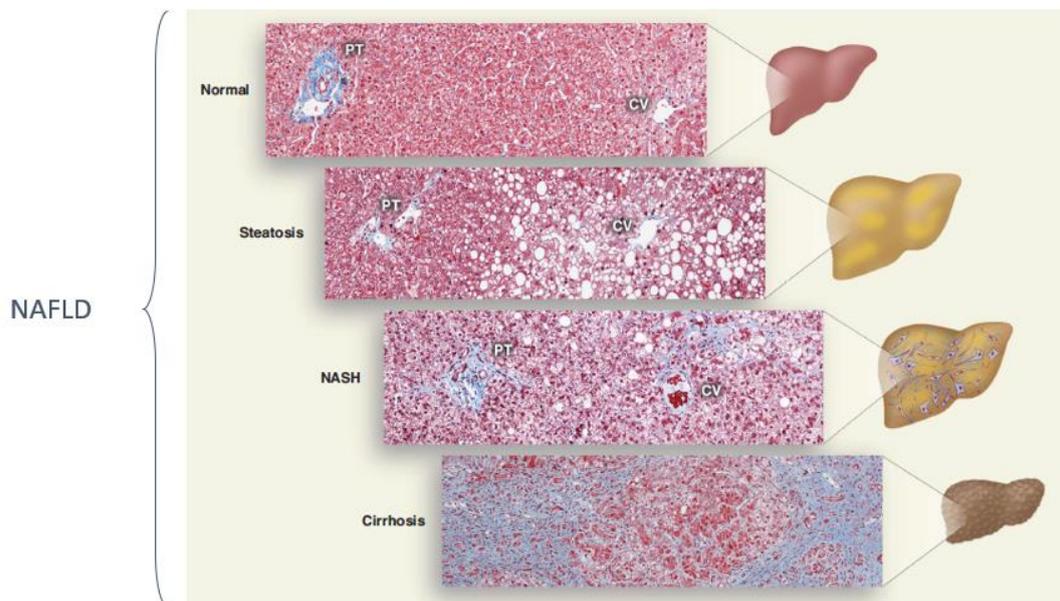


Figure 17 : Evolution de la maladie stéatosique (d'après Cohen et al Science 2011). Ces coupes histologiques illustrent le développement et la progression de la stéatose hépatique à partir d'un foie sain. La stéatose peut évoluer en NASH (hépatite stéatosique non alcoolique), puis en cirrhose du foie et en carcinome hépatocellulaire. PT : triade portale ; CV : veine centrale ; NAFLD : stéatose hépatique non alcoolique

Le récepteur FXR est fortement impliqué dans la progression de cette maladie, simplement parce que les effets qu'il médie se produisent à différents stades du métabolisme des graisses.

Le premier élément discriminant est l'absorption des acides gras. Dans cette maladie, il existe une relation directe entre le niveau d'expression de CD36 (un transporteur d'acides gras) et le niveau de triglycérides dans le foie (129). L'activation de FXR entraîne une réduction de CD36 et, par conséquent, une diminution de l'absorption des acides gras (130). Deuxièmement, le récepteur FXR exerce un effet de freinage sur la synthèse des lipides en faisant intervenir plusieurs acteurs tels que SHP et SREBP-1c (109, 131). Outre les effets de freinage ou d'inhibition médiés par FXR, FXR est également capable de promouvoir le catabolisme des graisses. En effet, FXR augmente l'oxydation des acides gras en stimulant les expressions de PPAR α et CPT1 (132). Enfin, FXR interagit également avec l'exportation des lipides, en inhibant la sécrétion de VLDL, impliquant HNF4 α , MTP et ApoB (133). De plus, FXR augmente les capacités de clairance des triglycérides en augmentant l'expression de la lipoprotéine lipase (109). Il est intéressant de noter que la signalisation de FXR associée à celle de FGF semble être altérée dans les processus de développement des maladies stéatosiques du foie (NAFLD/NASH) (134, 135). Par exemple, certaines études montrent que les acides biliaires sériques et fécaux peuvent être considérés comme une signature pronostique de la gravité de la NASH et de la fibrose (136, 137). De plus, à l'instar de ce que l'on observe dans les encéphalopathies dues à la toxicité des acides biliaires (138), la toxicité des AB pourrait contribuer aux lésions cellulaires et à la carcinogénèse (139).

En conclusion, FXR est impliqué dans de nombreuses voies imbriquées dans le développement de la stéatose hépatique. Les AB ne sont pas des ligands exclusifs de FXR, différents ligands synthétiques et semi-synthétiques de FXR présentant une spécificité et une puissance d'activation plus importantes, ont été développés. L'agoniste non stéroïdien GW4064 (EC50 65 nM) est fortement utilisé dans des études in vitro et in vivo, évaluant les effets biologiques induits par FXR (140). Mais en prenant en compte les éléments mentionnés précédemment, notamment sur l'effet de freinage de la lipogénèse et la lutte contre la fibrose, il semble rationnel que des modulations d'activité des acides biliaires et de FXR puisse conduire à des opportunités thérapeutiques pour le traitement de la NAFLD/NASH.

L'acide obéticholique (INT-747; 6-ECDC; 6-Ethylchenodeoxycholic acid, (EC50 100 nM)) est un ligand semi-synthétique de FXR ayant des propriétés anti-cholestatiques, anti-inflammatoires et anti-fibrotiques, utilisé dans le traitement de la cirrhose biliaire primaire. Il dérive du CDCA, agoniste endogène du FXR, mais plus puissant (2 log) sur FXR. Ce médicament est considéré comme le chef de file parmi les ligands stéroïdiens de FXR, il est en phase 3 pour le traitement de la NASH et de la cirrhose compensée. Grâce à l'utilisation de

cette molécule, plusieurs études rapportent les effets bénéfiques de son utilisation, notamment sur la réduction des transaminases hépatiques, l'amélioration de l'histologie du foie et donc de la fibrose, la perte de poids (141, 142). D'autres paramètres cliniques permettant l'établissement de scores sont également améliorés, comme le score d'activité de la NAFLD, le ballonnement des hépatocytes et l'inflammation lobulaire.

Le Cilofexor (GS-9674) et le Tropifexor (LJN-452, EC50 0.26 nM) sont des ligands synthétiques de FXR, et plus précisément, n'ont pas de structure stéroïde ou d'acide biliaire (contrairement à l'acide obéticholique). Ils sont en phase 2 pour le traitement de la NASH, leurs bénéfices se situent au niveau de la réduction de la stéatose hépatique, des enzymes hépatiques et des acides biliaires sériques (143, 144).

De manière intéressante, certains auteurs ont montré que ces agonistes synthétiques du FXR pouvaient diminuer l'hypertension portale, et ce par le biais de multiples processus, notamment une diminution de la fibrose, de l'angiogenèse et de l'inflammation (145). L'avantage majeur de s'éloigner de la structure d'un AB (comme avec l'INT-747), concernant Cilofexor et Tropifexor, est d'être hautement sélectif sur FXR, et d'éviter les effets croisés sur d'autres récepteurs des AB, notamment le récepteur TGR5. D'un point de vue pharmacocinétique, lorsque l'on compare les résultats obtenus avec ces 3 molécules, l'efficacité du point de vue de l'amélioration de la stéatose hépatique semble être dose-dépendante (146).

Pour les points négatifs liés à ces traitements, on peut citer le fait que certains effets indésirables courants ont été rapportés, notamment le prurit, une augmentation du LDL cholestérol et une diminution du HDL cholestérol et parfois une augmentation de la résistance à l'insuline. De plus, en dehors des scores cliniques, histologiques et des analyses biochimiques de routine en laboratoire, la réponse à ces traitements ne peut pas encore être évaluée avec un seul biomarqueur. Enfin, toutes ces molécules n'ont pas une pharmacocinétique similaire, en raison de leurs différences physico-chimiques. Le GW4064, par exemple, est largement utilisé dans les études *in vitro* pour évaluer les effets biologiques induits par FXR, que nous avons également utilisé au cours de nos travaux, mais sa solubilité est limitée, ce qui entraîne une faible biodisponibilité orale. D'autres composés prometteurs, agonistes du FXR, sont en cours d'étude, et pour certains d'entre eux en développement clinique, nous pouvons citer les molécules EDP-305, Nidufexor, Px-104, WAY-362450, EP-024297, et Fexaramine.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Alors que les rôles du récepteur FXR dans les différents métabolismes des organes périphériques sont bien connus et encore sujets à de nombreuses recherches, l'implication de ce récepteur dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique, au commencement de ce projet de thèse, restait à découvrir. Ceci étant, différents éléments de la littérature apportaient déjà quelques éléments en faveur d'un rôle potentiel de FXR (et de ses ligands) dans le contrôle central. En effet, l'inactivation globale en FXR protégeait d'une prise de poids excessive dans des modèles d'obésité génétique ou induite par un régime riche en graisses, ceci étant accompagné d'une réduction de la masse adipeuse et d'une amélioration du métabolisme glucidique (147, 148), alors que l'activation de FXR par administration périphérique potentialisait la prise de poids et l'intolérance au glucose dans ces modèles d'obésité induite par un régime riche en graisses (149). Ces effets n'étant pas reproduits par l'inactivation spécifique de FXR dans le foie, ces données suggéraient donc un rôle probable de FXR dans un autre organe métabolique ou dans la communication inter-organes. D'autres auteurs ont montré par ailleurs des effets de FXR sur la prise alimentaire (150), mais également sur l'autre versant de l'homéostasie énergétique, à savoir la thermogénèse adaptative (151), l'activité locomotrice (152) et de manière plus générale les dépenses énergétiques (153, 149). De plus, notre équipe ainsi que d'autres auteurs ont mis en évidence l'expression de FXR au niveau du SNC (98, 154), et notamment dans la structure clé du contrôle central de l'homéostasie énergétique, à savoir l'hypothalamus.

Ainsi, compte tenu des résultats obtenus par le laboratoire d'accueil concernant l'expression hypothalamique de FXR et de divers travaux rapportant la présence d'acides biliaires au sein du SNC (138, 155–157), nous avons émis l'hypothèse que le récepteur FXR pouvait être un nouvel acteur de la régulation centrale de l'homéostasie énergétique. Afin de répondre à cette hypothèse, les objectifs de ce travail de thèse sont les suivants : 1) affiner le profil d'expression de FXR au sein de l'hypothalamus, 2) étudier les conséquences d'un traitement central pharmacologique par un agoniste de FXR sur l'homéostasie énergétique et sur l'activation neuronale, 3) définir qualitativement et quantitativement la composition du pool cérébral d'acides biliaires chez la souris.

MATERIELS ET METHODES

Animaux. Les expérimentations animales ont été approuvées par la Commission institutionnelle pour l'utilisation et le soin des animaux. Le comité d'éthique de l'Université de Lille a approuvé tous les protocoles sur les souris (APAFIS#11237-20170911185145v2 et APAFIS#13331-2017091915214567v17). Des souris mâles wild-type (C57BL/6J), des souris mâles déficientes en FXR (FXR-KO) et leurs contrôles de portée (FXR-WT), sur le fond génétique C57BL/6J (Charles River), des souris FXR flox/flox âgées de 16 à 19 semaines, ont été hébergées dans une animalerie spécifique sans pathogène (EOPS), selon un cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h dont la température (21,5 °C) et l'humidité sont contrôlées. Un régime alimentaire standard (A04, Safe) et de l'eau étaient disponibles à volonté, sauf pendant le protocole d'exposition au froid. Selon les protocoles, les souris sont placées dans des cages métaboliques (système TSE, Hambourg, Allemagne) ou dans des cages standard.

Cannulation intracérébroventriculaires. Les souris ont été randomisées en fonction de leur poids corporel, anesthésiées à l'aide d'un mélange de kétamine (75 mg/kg)/xylazine (10 mg/kg) et équipées stéréotaxiquement d'une canule ciblant le ventricule latéral du cerveau (AP:+0,24 mm, ML : +1 mm). La canule était fixée sur le crâne avec du ciment dentaire.

Agents pharmacologiques. Pour les traitements par voie intracérébroventriculaire (ICV), l'agoniste synthétique GW4064 (3-[(E)-2-[2-chloro-4-[[3-(2,6-dichlorophenyl)-5-propan-2-yl]-1,2-oxazol-4-yl]methoxy]phenyl]ethenyl]benzoic acid, Tocris, 2473/50, pureté > 97%) et l'agoniste synthétique Tropifexor (2-[(1R,5S)-3-[[5-cyclopropyl-3-[2-(trifluoromethoxy)phenyl]-1,2-oxazol-4-yl]methoxy]-8-azabicyclo[3.2.1]octan-8-yl]-4-fluoro-1,3-benzothiazole-6-carboxylic acid, Clinisciences, HY-107418) ont été dissous dans du DMSO 100%. Les solutions ont été injectées en volume de 1 µl, 0,25µl/min. Au cours des protocoles d'administration centrale et chronique, nous avons administré une injection intracérébroventriculaire (ICV) chaque jour (à la fin de la journée juste avant l'extinction des lumières) pendant 6 jours de GW4064 ou de Tropifexor, ou leur véhicule (100% DMSO) et les souris ont été mises à mort le lendemain de la dernière injection. Pour le traitement intrapéritonéal (IP), nous avons dissous l'agoniste spécifique du récepteur adrénergique β3 CL 316243 (Sigma-Aldrich, C5976,) dans une solution saline à la dose de 0,1 mg/ml et l'avons injecté dans un volume de 100 µl / 10 g de souris.

Injection stéréotaxique des vecteurs viraux. Les souris FXR flox/flox ont été randomisées en fonction de leur poids corporel, anesthésiées à l'aide d'un mélange de kétamine (100 mg/kg)/xylazine (20 mg/kg) et équipées stéréotaxiquement d'une canule ciblant l'hypothalamus médiobasal. La canule était fixée sur le crâne avec du ciment dentaire. Le vecteur viral correspond à un Adénovirus AAV2/9 codant pour la CRE recombinase couplée à la protéine fluorescente GFP (AA9-CMV-CRE-GFP). Les solutions virales ont été injectées en volume de 0.5 µl, 200 nl/min.

Monitoring des souris en cage métabolique. Les souris wild-type sont placées individuellement dans des cages métaboliques (systèmes TSE, Hambourg, Allemagne). Les paramètres énergétiques sont enregistrés en continu et comprennent : la prise alimentaire (en grammes par minute), l'activité locomotrice (nombre de traversées de cage, nombre de redressement), la consommation d'oxygène VO₂ (en mL/h/kg de masse maigre), la consommation de dioxyde de carbone CO₂ (en mL/h/kg de masse maigre) à partir desquelles la dépense énergétique est calculée (formule de Weir : $EE = (3,94 \times VO_2 + 1,106 \times VCO_2) / 1000$ en kcal/h/kg de masse maigre) et quotient respiratoire (RER)

Mesure de l'activité du système nerveux sympathique. Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'un mélange de kétamine (75mg/kg)/xylazine (10mg/kg), et après une période de latence de 20 min, une dissection a été effectuée pour exposer la carotide. Le nerf sympathique, proche de l'artère, a été disséqué sans tissus sous-jacents sur une distance d'environ 1 cm jusqu'au ganglion cervical supérieur. Le nerf a ensuite été recouvert d'huile de paraffine pour prévenir la déshydratation et soigneusement au contact d'une paire d'électrodes d'enregistrement en fil d'argent (0,6 mm de diamètre). Les électrodes ont été connectées à une sonde à haute impédance et les potentiels d'action ont été affichés et sauvegardés sur un ordinateur après amplification initiale par un amplificateur à faible bruit (amplificateur BIO, ADInstrument, Paris, France). L'activité du nerf unipolaire a été enregistrée en continu pendant 15 minutes. Les données ont été numérisées avec le numériseur PowerLab/4sp (ADInstrument, Paris, France). Les signaux ont été amplifiés, filtrés et enregistrés par le logiciel Chart 4 (ADInstrument, Paris, France).

Protocole d'exposition au froid. Les souris C57BL/6J ont été hébergées individuellement à 4 °C pendant 8 heures sans accès ni à la nourriture, ni à l'eau, uniquement pendant l'exposition au froid. La température rectale a été mesurée à l'aide d'une sonde rectale à la fin de l'exposition au froid.

Extraction d'ARN, rétrotranscription, Q-PCR. Les PVN, ARC, foie, TAB et TAE ont été disséqués et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen). Un traitement DNase a été effectué pour éliminer toute trace d'ADN génomique dans les échantillons. La quantité d'ARN de chaque échantillon (30µL de solution d'extraction) a été mesurée à partir de 1.5µL de solution d'extraction, en utilisant un spectrophotomètre Nanodrop One (ThermoFischer). Les réactions de rétrotranscription ont été réalisées à l'aide du kit cDNA Reverse Transcription High Capacity Kit (Applied Biosystem). Les réactions de Q-PCR en technique Sybr Green ont été effectuées grâce au kit Brilliant Sybr Green II QPCR Master Mix sur l'analyseur Stratagene MX3000P (Agilent Technologies). Les réactions de Q-PCR en technique TaqMan ont été effectuées grâce au kit TaqMan Multiplex Master Mix (Applied Biosystem) sur l'analyseur Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System. Les expressions géniques étudiées dans ce travail sont normalisées à un gène témoin (cyclophiline pour l'approche Sybr Green, 18s pour l'approche Taqman) dont les expressions ne sont pas influencées par les conditions expérimentales.

Gene	NCBI number	Sequences 5'-3'	
		Forward	Reverse
Cyclophilin	NM_001123068	GCATACGGGTCCTGGCATCTTGTC	ATGGTGATCTTC TTGCTGGTCTTGC
FXR (α 1-2)	NM_001163504.1	ATGAATCTGATTGGGCACTCCCAT	AAATAAGCTTTCAGAAAGAGAAAA
SHP	NM_011850	ACGATCCTCTTCAACCCAGA	AGGGTAGAGGCCATGAGGAG
BSEP	NM_0210022	GTCTGACTCAGTGATTCTTCGC	GAGCAATGCGCACACACTTC
NPY	NM_023456,2	ACTCCGCTCTGCGACACTAC	TCTCAGGGCTGGATCTCTTG
PGC1a	NM_008904	CTACAGACACCGCACACACC	TCATCCCTCTTGAGCCTTTC
HSL	NM_010719.5	GTGGCGAAAAGGCAAGATCAA	CTGGCTTGAGAAGAAGGCCA
ATGL	NM_025802.3	CCACATTGGCGTGGCCTCCT	AACCGCTTCCGGGCCTCCTT
DGAT1	NM_010046.3	GACGGCTACTGGGATCTGA	TCACCACACACCAATTCAGG
UCP1	NM_009463	GGAGGTGTGGCAGTGTTTCATTGG	AGCATTGTAGGTCCCGTGTAGCG
UCP2	NM_011671.5	AGCCCAGCCTACAGATGTGGTAAA	TATCCAGTGGTCGAGTCGTGTCAA
UCP3	AF_030164	CCTCCATTGCAATTGGCCTC	CCCTCTGTATTCTCTCTCCTCC
VEGF	NM_001025250.2	AGCACAGCAGATGTGAATGC	AATGCTTCTCCGCTCTGAA
DIO2	NM_010050.2	TCGCGGAGAGTGGAGGCGCA	CGTGCACCACACTGGAATTGGGAGC
Gene	NCBI number	Taqman assay ID	
TH	NM_009377.1	Mm00447557_m1	
Adrb3	NM_013462.3	Mm02601819_g1	
Adra1a	NM_001271759.1, NM_001271760.1, NM_013461.4	Mm00442668_m1	
Adra2a	NM_007417.4	Mm00845383_s1	
SIM1	NM_011376.3	Mm00441390_m1	
CRTC2	NM_028881.2	Mm01219960_m1	
18s	TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents (Thermofischer, 4308329)		

Tableau 3 : Amorces utilisées en technique Sybr green et Taqman. FXR : Farnesoid X Receptor ; SHP : Small Heterodimer Partner ; BSEP : Bile Salt Export Pump ; NPY : Neuropeptide Y ; PGC1a : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha ; HSL : Hormone-Sensitive Lipase ; ATGL : Adipose Triglyceride Lipase ; DGAT1 : Diacylglycerol O-Acyltransferase 1 ; UCP1 : Uncoupling protein1 ; UCP2 : Uncoupling protein2 ; UCP3 : Uncoupling protein3 ; VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ; DIO2 : Iodothyronine Deiodinase 2 ; TH : Tyrosine hydroxylase ; Adrb3 : β 3-adrenergic receptors ; Adra1a : α 1-adrenergic receptor ; Adra2a : α 2-adrenergic receptor ; SIM1: single-minded homolog 1; CRTC2 : CREB Regulated Transcription Coactivator 2

Western blotting. L'hypothalamus, le TAB et le foie ont été disséqués et immédiatement congelés dans l'azote liquide. Les tissus ont été homogénéisés dans 1 ml de tampon (Trizma-base / sucrose) à l'aide d'un broyeur de type polytron et passés en bain à ultrason. La concentration en protéines a été déterminée par le test BCA (Thermofischer ; 23225). Environ 20 à 30 μ g de protéines (en solution Trizma-base / sucrose / LDS sample buffer) ont été chargées dans chaque puits séparées à l'aide de gels NuPage 4-12% Bis-Tris (Thermofischer, NP0335BOX) et transférées sur des membranes de nitrocellulose grâce au kit iBlot 2 transfert stacks (Thermofischer, IB23001). Les membranes ont ensuite été incubées une nuit à 4°C en présence des anticorps primaires: UCP1 1/500 (Abcam, AB10983), Tyrosine Hydroxylase 1/500 (Merck, MAB5280), FXR 1/250 (Abcam Perseus, PP-A9033A-00), PKARII 1/500 (BD Biosciences, 610626), PPKARII 1/500 (BD Biosciences, 612550), HSP 90 α / β 1/1000 (H-114)

(Santa cruz biotechnology, sc-7947) et β Actine 1/1000 (Sigma, A5441), lavées puis incubées 2 heures à température ambiante en présence des anticorps secondaires correspondant conjugués à l'enzyme HRP. La révélation est effectuée grâce au réactif de type ECL (Millipore, WBKLS0500).

Immunofluorescence et immunohistochimie. Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'un mélange de kétamine (75mg/kg)/xylazine (10mg/kg), ceci suivi d'une perfusion intracardiaque réalisée avec une solution saline (NaCl 0,9%, 20mL) puis d'une solution de PAF 4%. Les TAB ont été prélevés et fixés par immersion à 4°C dans du PAF 4%, déshydratés, nettoyés et incorporés en paraffine. Des coupes de paraffine (5 μ m d'épaisseur) ont été colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine. Les cerveaux ont été prélevés et postfixés pendant 16 heures à 4°C dans du PAF 4%. La cryoprotection des cerveaux a été réalisée par des bains successifs de 24 heures de tampon PBS-sucrose (10%, 20%, 30%) à 4°C. Les cerveaux ont été inclus dans un milieu pour congélation (Jung) avant d'être congelés dans l'isopentane refroidi à -55°C et stockés à -80°C. Des coupes flottantes de 40 μ m ont été réalisées pour l'immunofluorescence p-CREB. Des coupes de 18 μ m d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat Leica (CM3050) et placés sur des lames Superfrost Plus (Thermofischer) pour les immunofluorescences vis-à-vis de FXR, α MSH, HuD/C.

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : FXR (Abcam, AB28676), α MSH (Millipore, AB5087), HuD/C (Thermofischer, A-21271), pCREB (Ser133) (87G3) (Cell Signaling, 9198S) et C-Fos (Abcam, AB208942), conformément aux protocoles décrits ci-dessous. L'acquisition des images a été réalisée au microscope confocal (LSM 710, Zeiss). La quantification et l'analyse des signaux ont été effectuées à l'aide du logiciel Imaris. Pour l'analyse quantitative du signal fluorescent p-CREB dans les neurones du noyau arqué, un total de 16951 neurones de souris contrôles (n = 4) et 12704 neurones de souris traitées (n = 3) ont été comptés sur les coupes de noyau arqué et l'intensité de fluorescence a été classée en 3 niveaux : bas, moyen et fort, selon l'appréciation du logiciel Imaris.

Immunohistochimie C-fos. Les lames ont d'abord été réhydratées avec 1mL de PBS 0,01M puis perméabilisées (PBS 0,01M + 0,3% de triton X-100) pendant 10min. Les sites antigéniques non spécifiques ont été saturés (PBS 0,01M + blocking reagent 1/200, Vector MKB-2213-1) pendant 1 heure à température ambiante. Les lames ont ensuite été incubées pendant 16 heures à 4°C dans l'obscurité, avec l'anticorps C-Fos (Abcam, AB208942) dilué au

1/100 dans une solution de PBS 0,01M + 0,3 % de triton X-100 + 1 % de sérum de chèvre. Après lavage (PBS 0,01M, 3x5min), les lames ont été incubées pendant 2 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome émettant à 488 nm (Thermofischer, A11034), dilué au 1/400 dans une solution de PBS 0,01M + 0,3 % de triton X-100. Après lavage (PBS 0,01M, 3x5min), un marquage a été effectué par une solution de Hoechst diluée au 1/1000 dans du PBS 0,01M (Invitrogen®, Hoechst 33258). Les lames sont lavées une dernière fois (PBS 0,01M, 3x5min) puis montées avec des lamelles (Dako® Fluorescent Mounting Medium).

Double marquage FXR/ α MSH. Les lames ont d'abord été réhydratées avec 1mL de PBS 0,01M puis perméabilisées (PBS 0,01M + 0,3% de triton X-100) pendant 10min. L'activité des peroxydases endogènes a été neutralisée (PBS 0,01M + H₂O₂ 3 %, 10 min) et les sites antigéniques non spécifiques ont été saturés (PBS 0,01M + 1 % blocking reagent, Thermofischer, B40922) pendant 1 heure à température ambiante. Les lames ont ensuite été incubées pendant 16 heures à 4°C dans l'obscurité, avec l'anticorps FXR (Abcam, AB28676) dilué au 1/100 (PBS 0,01M + 1% blocking reagent). Après lavage (PBS 0,01M, 3x5min), les lames ont été incubées pendant 2 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec l'anticorps secondaire anti lapin couplé à l'HRP (Thermofischer, B40922), dilué au 1/100 (PBS 0,01M + 1% blocking reagent). Après lavage (PBS 0,01M, 3x5min), la révélation a été effectuée à l'aide de tyramide émettant à 488 nm (Thermofischer, B40922), dilué au 1/100 (tampon d'amplification, Thermofischer, B40922 + H₂O₂ 0,0015%). Les sites antigéniques non spécifiques ont été saturés (PBS 0,01M + 0,1 % de triton X-100 + 5 % de sérum d'âne) pendant 1 heure à température ambiante. Les lames ont ensuite été incubées pendant 16 heures à 4°C dans l'obscurité, en présence de l'anticorps α MSH (Milipore AB5087) dilué à 1/10000 (PBS 0,01M + 0,1% triton X-100 + 1% sérum d'âne). Après lavage (PBS 0,01M, 3x5min), les lames ont été incubées pendant 2 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome émettant à 555 nm (Molecular Probe, A-21432), dilué à 1/200 (PBS 0,01M + 0,1% triton X-100). Après lavage (PBS 0,01M, 3x5min), un marquage a été effectué par une solution de Hoechst diluée au 1/1000 dans du PBS 0,01M (Invitrogen®, Hoechst33258). Les lames sont lavées une dernière fois (PBS 0,01M, 3x5min) puis montées avec des lamelles (Dako® Fluorescent Mounting Medium).

Double marquage FXR/HuD/C. Les lames ont d'abord été réhydratées avec 1mL de PBS 0,01M puis perméabilisées (PBS 0,01M + 0,3% de triton X-100) pendant 10min. L'activité des peroxydases endogènes a été neutralisée (PBS 0,01M + H₂O₂ 3 %, 10 min) et les sites antigéniques non spécifiques ont été saturés (PBS 0,01M + 1 % blocking reagent, Thermofischer, B40922) pendant 1 heure à température ambiante. Les lames ont ensuite été incubées pendant 16 heures à 4°C dans l'obscurité, avec l'anticorps FXR (Abcam, AB28676) dilué au 1/100 (PBS 0,01M + 1% de réactif de blocage). Après lavage (PBS 0,01M, 3x5min), les sections ont été incubées pendant 2 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec l'anticorps secondaire anti lapin couplé à l'HRP (Thermofischer, B40922), dilué au 1/100 (PBS 0,01M + 1% blocking reagent). Après lavage (PBS 0,01M, 3x5min), la révélation a été effectuée à l'aide de tyramide émettant à 488 nm (Thermofischer, B40922), dilué au 1/100 (tampon d'amplification, Thermofischer, B40922 + H₂O₂ 0,0015%). Les sites antigéniques non spécifiques ont été saturés (PBS 0,01M + Mouse IgG Blocking reagent 1/200, MOM Kit, Vector). Les lames ont ensuite été incubées pendant 16 heures à 4°C dans l'obscurité, en présence d'anticorps HuD/C (Thermofischer, A-21271) dilués au 1/500 (PBS 0,01M + 0,1% X-100 triton + 1% sérum de chèvre). Après lavage (PBS 0,01M, 3x5min), les lames ont été incubées pendant 2 heures à température ambiante, à l'abri de la lumière, avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome émettant à 568 nm (Invitrogen A-31570), dilué au 1/200 (PBS 0,01M + 0,1% triton X-100). Après lavage (PBS 0,01M, 3x5min), un marquage a été effectué par une solution de Hoechst diluée au 1/1000 dans du PBS 0,01M (Invitrogen®, Hoechst33258). Les lames sont lavées une dernière fois (PBS 0,01M, 3x5min) puis montées avec des lamelles (Dako® Fluorescent Mounting Medium).

Double marquage FXR-NPY. Ce marquage a été effectué sur des sections de cerveau de souris dont l'expression de la protéine GFP fluorescente est sous le contrôle du promoteur NPY, sans double marquage.

Immunohistochimie sur coupe flottante. Les coupes de cerveau ont été placées dans une plaque 12 puits. Les sites antigéniques non spécifiques ont été saturés (PBS 0,01M + blocking reagent, Vector MKB-2213-1) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. Les coupes ont ensuite été incubées pendant 16 heures à 4°C dans l'obscurité sous agitation, avec l'anticorps PCREB (Ser133) (87G3) (Cell Signaling, 9198S) dilué au 1/1000 dans une solution de PBS 0,01M + 0,2 % de triton X-100 + 1 % de sérum de chèvre. Après lavage

(PBS 0.01M, 3x5min), les sections ont été incubées pendant 2 heures à température ambiante sous agitation, à l'abri de la lumière avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome émettant à 488 nm (Molecular Probe, A11008) dilué au 1/1000 dans une solution de PBS 0.01M. Après lavage (PBS 0.01M, 3x5min), un marquage a été effectué par une solution de Hoechst diluée au 1/5000 dans une solution de PBS 0.01M (Invitrogen®, Hoechst33258) pendant 5 min sous agitation. Les sections sont lavées une dernière fois (PBS 0.01M, 3x5min) puis montées avec des lamelles (Dako® Fluorescent Mounting Medium) sur des lames Superfrost Plus (Thermofischer).

Référence anticorps primaire	Cible	Isotype	Espèce hôte	Dilution Ac I	Référence anticorps secondaire	Isotype	Espèce hôte	Dilution Ac II
Western Blot								
Abcam, AB10983	UCP1	IgG	Rabbit	1/500 overnight 4°C (TBS Tween milk)	Sigma A0545	IgG	Goat	1/500 2H room temperature (TBS Tween milk)
Merck, MAB5280	TH	IgG	Mouse	1/500 overnight 4°C (TBS Tween milk)	Sigma A4416	IgG	Goat	1/500 2H room temperature (TBS Tween milk)
Abcam Perseus, PP-A9033A-00	FXR	IgG	Mouse	1/500 overnight 4°C (TBS Tween milk)	Sigma A4416	IgG	Goat	1/500 2H room temperature (TBS Tween milk)
BD Biosciences, 610626	PKARII	IgG	Mouse	1/250 overnight 4°C (TBS Tween milk)	Sigma A4416	IgG	Goat	1/500 2H room temperature (TBS Tween milk)
BD Biosciences, 612550	PPKARII	IgG	Mouse	1/250 overnight 4°C (TBS Tween milk)	Sigma A4416	IgG	Goat	1/500 2H room temperature (TBS Tween milk)
Santa cruz biotechnology, sc-7947	HSP 90α/β (H-114)	IgG	Rabbit	1/1000 overnight 4°C (TBS Tween milk)	Sigma A0545	IgG	Goat	1/1000 2H room temperature (TBS Tween milk)
Sigma, A5441	Béata Actin	IgG	Mouse	1/1000 overnight 4°C (TBS Tween milk)	Sigma A4416	IgG	Goat	1/1000 2H room temperature (TBS Tween milk)
Immunohistochimie								
Abcam, AB28676	FXR	IgG	Rabbit	1/100 16h 4°C (PBS 0.01M + 1% blocking reagent)	Thermofischer, B40922	IgG	Goat	1/100 2H room temperature (PBS 0.01M + 1% blocking reagent)
Merck Millipore AB5087	alpha MSH	IgG	Sheep	1/10000 16h 4°C (PBS 0.01M + 0.1% X-100 Triton + 1% donkey serum)	Molecular probe, A-21432	IgG	Donkey	1/200 2H room temperature (PBS 0.01M + 0.1% X-Triton)
Thermofischer, A-21271	HuD/C	IgG	Mouse	1/500 16h 4°C (PBS 0.01M + 0.1% X-100 Triton + 1% goat serum)	Invitrogen A-31570	IgG	Donkey	1/200 2H room temperature (PBS 0.01M + 0.1% X-Triton)
Cell Signaling, 91985	PCREB (Ser133) (87G3)	IgG	Rabbit	1/1000 16h 4°C (PBS 0.01M + 0.2% triton X-100 + 1% goat serum)	Molecular probe, A11008	IgG	Goat (IgG)	1/1000 2H room temperature (PBS 0.01M)

Tableau 4 : Détail des anticorps utilisés en western Blot et immunohistochimie

Hybridation *in situ*

L'hybridation fluorescente *in situ* a été réalisée à l'aide du kit RNAscope® Multiplex 2.0, conformément aux instructions du fabricant (Advanced Cell Diagnostics). Brièvement, des sections de cerveau (20 µm) ont été fixées dans du paraformaldéhyde 4 % pendant 1h à 4°C et déshydratées par des solutions d'éthanol de concentrations croissantes (50, 70 et 100 %) pendant 5 min chacune. Les sections ont été traitées par du peroxyde d'hydrogène à température ambiante pendant 10 min, puis hybridées avec des sondes à 40 °C pendant 2 h dans une étuve humidifiée. Les sondes NR1H4 (FXR ; 484491), POMC (314081-C3) et NPY (313321-C2) ont été utilisées. Après l'hybridation, les sections de cerveau ont été soumises à une série d'étapes d'amplification du signal (Opal 520, 570 et 690), puis rincées avec le tampon de lavage (ACD) deux fois pendant 2 minutes entre chaque étape. Enfin, le marquage nucléaire a été effectué en utilisant une solution de Hoechst diluée au 1/1000 dans du PBS 0,01M (Invitrogen®, Hoechst33258) et les lames ont été montées avec des lamelles (Dako® Fluorescent Mounting Medium).

Extraction et dosage des acides biliaires. Le protocole d'extraction des acides biliaires cérébraux a été adapté du protocole de Zhang et Klaassen (158), permettant l'extraction des ABs à partir de foie. Le principe repose sur l'utilisation initiale d'une méthode mécanique (broyage) associée à une méthode chimique, notamment par l'utilisation d'acétonitrile, solvant aprotique dipolaire. Pour la quantification ultérieure des ABs, cinq standards internes deutérés (Interchim®) (0.5 µM d4-CA, 0.5 µM d4-GCA, 0.5 µM d4-TCA, 0.5 µM d4-CDCA, 0.5 µM d4-GCDCA en méthanol) ont été incorporés avant extraction. Brièvement, les cerveaux ont été placés dans un tube falcon de 45ml additionnés de 2 ml d'eau puis homogénéisés par polytron. 200 µl d'homogénat ont été ajoutés à 100 µl de standard interne, 50 µl de méthanol et 1 ml d'un mélange d'acétonitrile/ammoniac 5% dans des tubes à hémolyse en verre. Après agitation par vortex puis agitation continue pendant une heure à température ambiante, les tubes ont été centrifugés à 12000g (13000 rpm) pendant 10 minutes. Le surnageant a été collecté, le culot repris par 1 ml de méthanol puis vortexé pendant 5 minutes et centrifugé à 12000g (13000 rpm) pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu a été combiné à celui obtenu précédemment, puis évaporé sous azote à 50°C. Les culots après évaporation ont été resuspendus dans 60µL de méthanol à 50%, centrifugés à 12000g (13000 rpm) pendant 1 minute. Le surnageant obtenu a été stocké à -20°C avant dosage des acides biliaires par LC-MS/MS.

Le protocole d'extraction des acides biliaires sanguins repose sur le principe de précipitation (protocole Garcia) : 50 µl de plasma dans un eppendorf et ajouter 25 µL de standard interne et 225 µl de MeOH froid, vortexer 3 fois 10 secondes et placer à -20°C pendant 20 minutes. Centrifuger 10 min à 10000g à +4°C puis récupérer la phase supérieure dans un tube en verre et évaporer au speed vac (à 45°C, 2h30). Reprendre par 50µl de mélange Méthanol/H2O 50% et vortexer 60 secondes puis centrifuger 1 min à 10000g à +4°C. Reprendre le surnageant et congeler à -20°C avant dosage des acides biliaires par LC-MS/MS.

Les AB ont été séparés et dosés au sein de la faculté de pharmacie de Lille, par la technique de chromatographie liquide associée à la spectrométrie de masse en tandem. Brièvement, les ABs ont d'abord été séparés les uns des autres par une chromatographie liquide (UFLC-XR : Shimadzu) selon un mode isocratique à 35 % d'acétonitrile pendant 5 min puis en gradient de concentration progressif de 35% à 90% d'acétonitrile jusque 37 min, suivi d'un mode isocratique à 35% jusque 41 minutes. Ils ont ensuite été fragmentés par un spectromètre de masse en tandem (API Qtrap 5500 : Applied Biosystems) équipé de plusieurs analyseurs en série disposés sur le trajet des ions, permettant d'étudier des fragmentations provenant des composés moléculaires (mode d'ionisation négatif, balayage en mode MRM). Le calcul des concentrations a été réalisé grâce à l'utilisation des standards internes deutérés et de gammes d'étalonnage, permettant d'établir les rapports (aire pic analyte) / (aire pic standard interne).

Analyses statistiques : Les données sont présentées sous la forme de la moyenne +/- SEM et analysées grâce au logiciel PRISM (GraphPad, USA). Les données ont été analysées grâce aux tests de Student (t-test), ANOVA two way et X₂. Une P-value < 0.05 est considérée comme significative.

RESULTATS

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle de FXR exprimé au sein de l'hypothalamus afin d'évaluer si ce récepteur nucléaire pouvait être un nouvel acteur du contrôle central de l'homéostasie énergétique. Comme précédemment expliqué, nous nous sommes dans un premier temps attachés à préciser l'expression cérébrale de FXR et dans un second temps à déterminer les conséquences de l'activation pharmacologique de FXR cérébral sur l'homéostasie énergétique. De plus, j'ai été amené à participer, en parallèle de ce projet, à des projets connexes ayant pour objectifs d'étudier la composition qualitative et quantitative du pool cérébral d'acides biliaires chez la souris.

1. Etude de l'expression hypothalamique de FXR

Des études récentes au sein du laboratoire, réalisées avant mon arrivée et poursuivies au cours de mon master et de ma thèse, ont confirmé et affiné les données issues de la littérature (98, 154) concernant l'expression hypothalamique du récepteur nucléaire FXR.

Nous avons confirmé les données de Gofflot et al (98) observant l'expression de FXR au sein de l'hypothalamus (figure 18) :

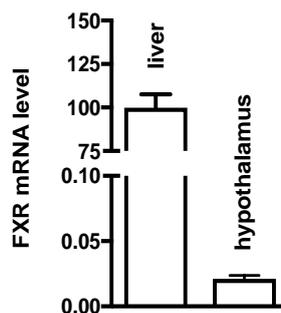


Figure 18: Expression hypothalamique de FXR par qPCR. Expression de FXR dans le foie et l'hypothalamus par qPCR. L'expression de FXR a été normalisée par rapport à la cyclophiline. Les résultats (moyenne +/- SEM) sont exprimés par rapport à l'expression de FXR dans le foie, dont son expression a été attribuée arbitrairement à la valeur de 100%.

De plus, afin d'obtenir des informations topologiques, nous avons étudié l'expression de FXR par hybridation *in situ*, nous permettant d'affirmer que l'ARNm de FXR était présent au sein de l'ARC et du VMH (figure 19).

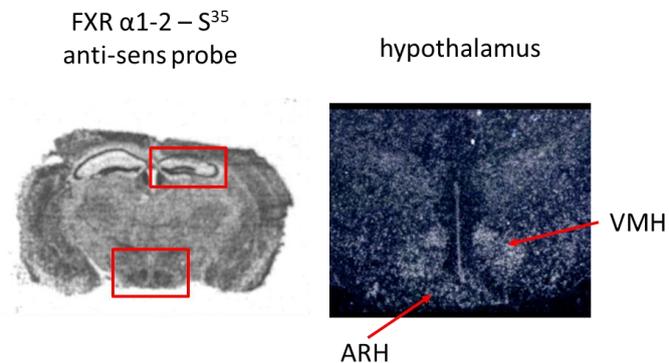


Figure 19 : Expression hypothalamique de FXR par hybridation *in situ*. FXR est exprimé dans tout le cerveau et, en particulier, dans l'hypothalamus. VMH : noyau ventromédian ; ARH : noyau arqué

Plus récemment, grâce à la technique RNAscope, nous avons pu affiner les données préliminaires obtenues par hybridation *in situ*. Nous avons donc adopté l'utilisation du kit RNAscope® Multiplex 2.0. Cette technique nous a permis de mettre en évidence l'expression de FXR au sein des neurones NPY et POMC au sein de l'ARC (figure 20).

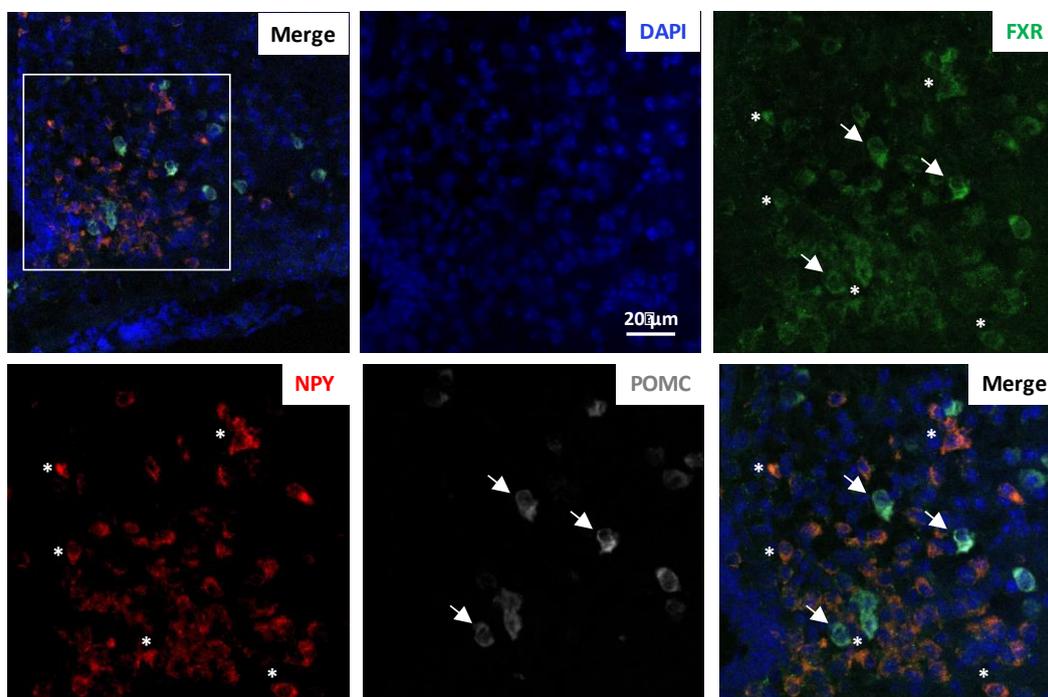


Figure 20: Expression de FXR au sein du noyau arqué par technique RNAscope. Images représentatives des comarquages de FXR avec NPY et POMC dans l'ARC (noyau arqué), technique RNAscope. La contre-coloration nucléaire a été réalisée avec une solution Hoechst.

Au niveau protéique, nous pouvons également affirmer que le récepteur FXR est bien exprimé au sein de l'hypothalamus (figure 21).

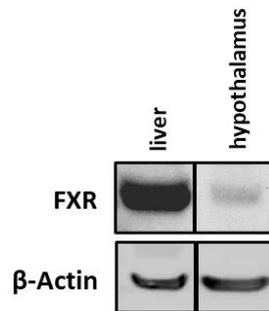


Figure 21: Expression hypothalamique de FXR par Western Blot. Le récepteur FXR est exprimé dans l'hypothalamus, son intensité d'expression étant comparée à une intensité de référence, au niveau hépatique.

Ensuite, afin de préciser l'expression de FXR au sein de l'hypothalamus, nous nous sommes intéressés plus précisément à sa cartographie d'expression au sein des noyaux hypothalamiques ARC et PVN par immunohistofluorescence. Son expression a d'abord été démontrée au niveau du noyau arqué (ARC) (figure 22). Le marqueur HuD/C étant un bon marqueur neuronal (protéine neuronale associée à l'ARN), nos résultats montrent en effet que le profil d'expression de FXR est similaire à celui de HuD/C avec une co-localisation au sein de l'ARC, au niveau nucléaire et cytoplasmique, démontrant ainsi une expression neuronale de FXR par les neurones hypothalamiques de l'ARC (figure 23).

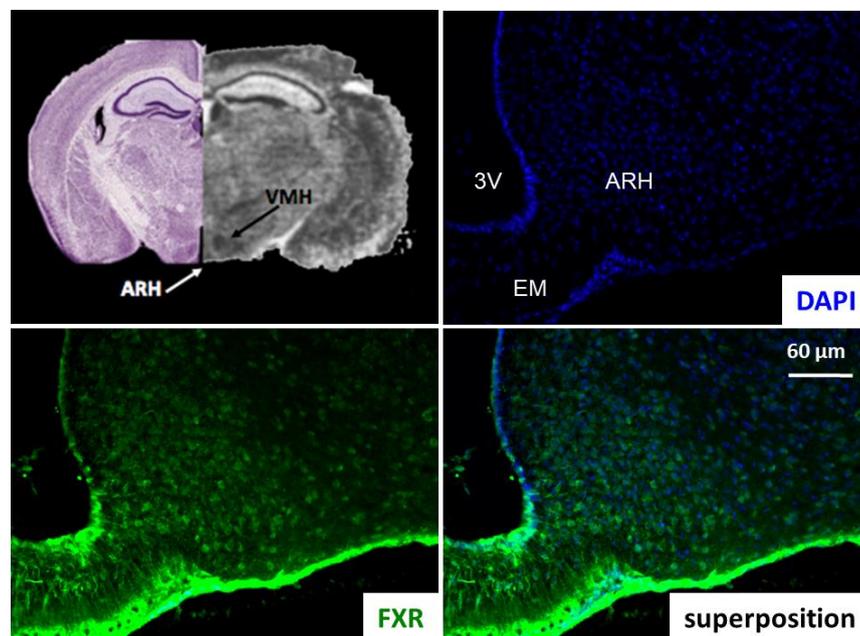


Figure 22 : Expression de FXR par hybridation *in situ* et immunohistofluorescence au niveau du noyau arqué (ARH) et de l'éminence médiane (EM). La contre-coloration nucléaire (bleue ; B et D) a été réalisée avec le DAPI. L'observation des immunomarquages a été réalisée au microscope confocal Zeiss LSM 710. 3V: troisième ventricule ; VMH : noyau ventromédian

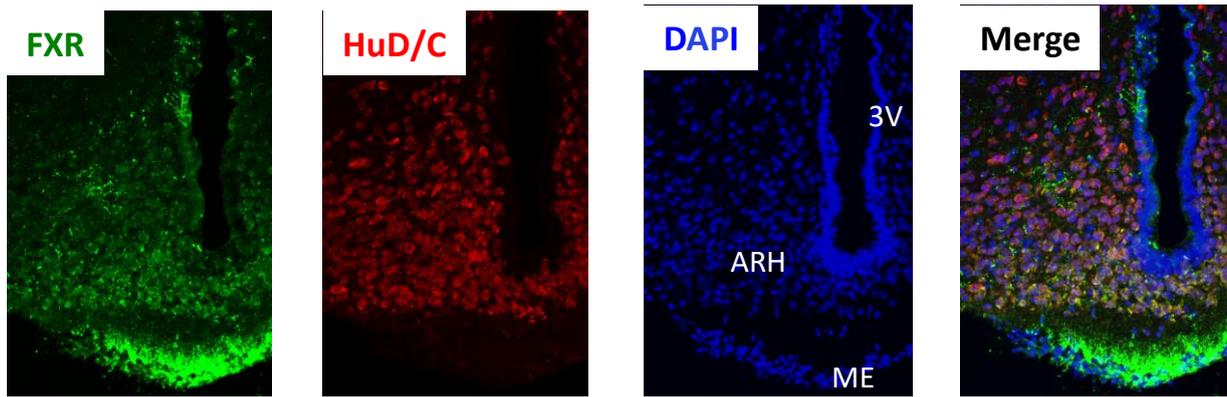


Figure 23: Expression neuronale de FXR par les neurones hypothalamiques. Images représentatives des comarquages de FXR avec HuD/C dans le noyau arqué. La contre-coloration nucléaire a été réalisée avec une solution Hoechst. L'observation des immunomarquages a été réalisée au microscope confocal Zeiss LSM 710. 3V : troisième ventricule; ME : éminence médiane ; ARH : noyau arqué

Nous nous sommes ensuite intéressés à préciser la nature des neurones exprimant FXR au sein de l'ARC. L'objectif étant de mettre en lien l'expression de FXR avec des neuropeptides bien connus et impliqués dans l'homéostasie énergétique, en l'occurrence NPY, α MSH et POMC (66). Nous avons pu mettre en évidence l'expression de FXR au sein des neurones NPY et α MSH au sein de l'ARC (figure 24).

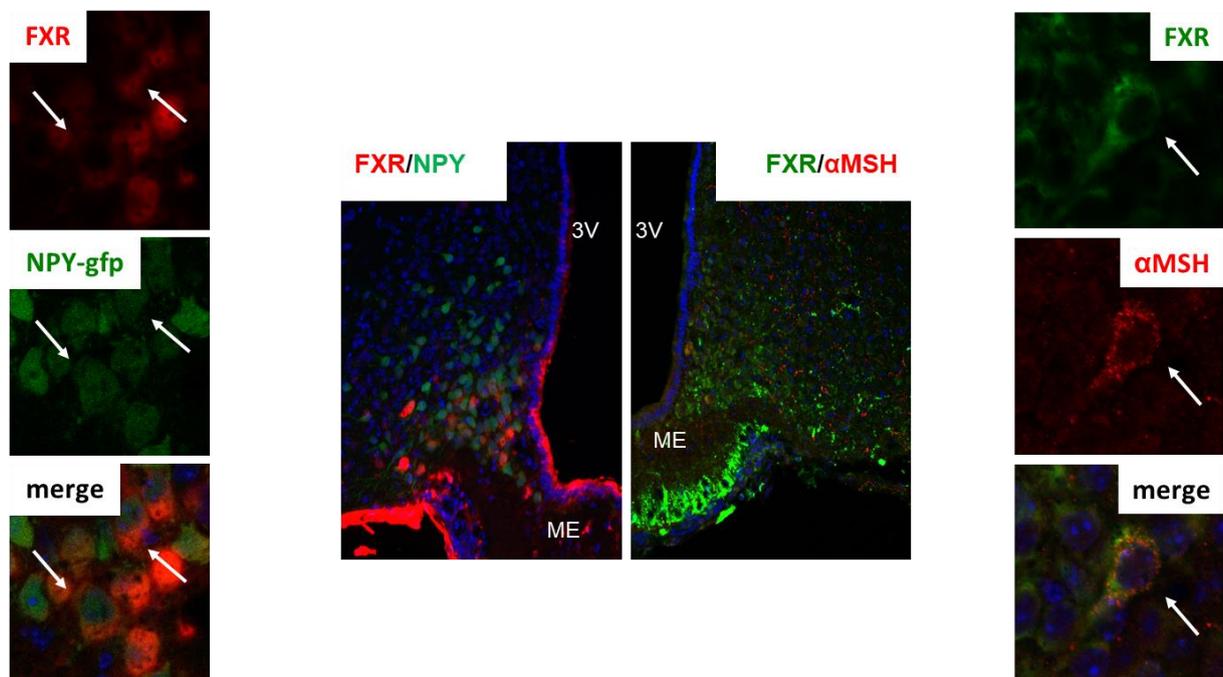


Figure 24: Expression de FXR, NPY et α MSH dans le noyau arqué par immunohistofluorescence. Images représentatives des comarquages de FXR avec NPY ou α MSH dans le noyau arqué. La contre-coloration nucléaire a été réalisée avec une solution Hoechst. L'observation des immunomarquages a été réalisée au microscope confocal Zeiss LSM 710. 3V : troisième ventricule ; ME : éminence médiane

De la même manière, nous nous sommes intéressés à l'expression de FXR au sein du PVN. Notre analyse démontre l'expression de FXR au sein du PVN au sein duquel deux types de marquage se distinguent : à savoir un marquage de type fibrillaire, concentré sur les deux extrémités supérieures du PVN, et un marquage des corps cellulaires neuronaux, diffus et homogène dans toute la structure du PVN (figure 25). Au sein du PVN, l'expression de l' α MSH présente elle aussi un marquage de type fibrillaire (figure 26), concentré cette fois-ci sur les deux extrémités inférieures du PVN, et un marquage des corps cellulaires neuronaux, diffus et homogène dans toute la structure du PVN. Il semble donc exister une colocalisation des marquages FXR et α MSH, avec un marquage des fibres provenant notamment de l'ARC.

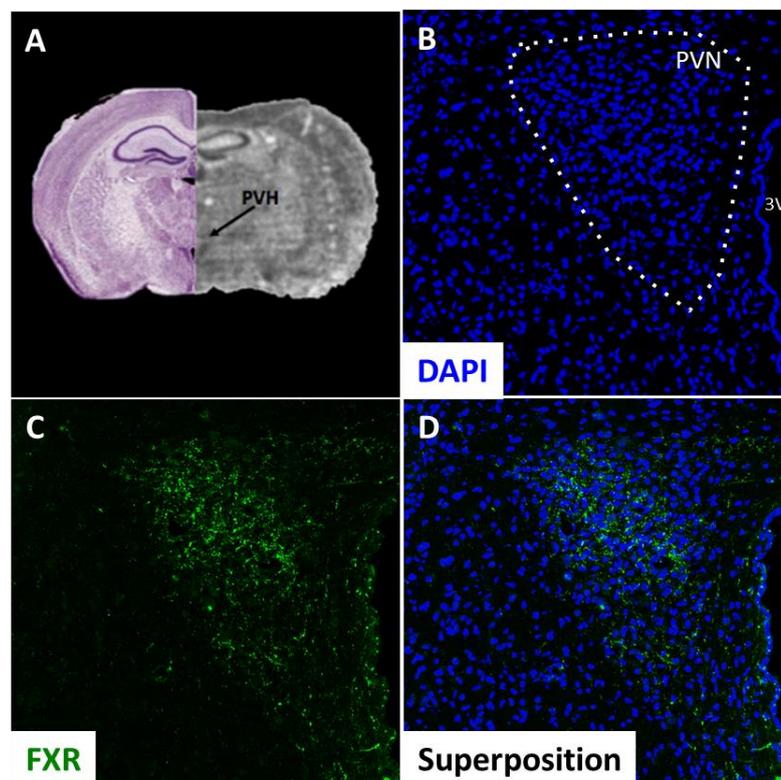


Figure 25: Expression de FXR au niveau du PVN par immunohistofluorescence. L'expression de FXR au niveau du noyau paraventriculaire (PVN) a été mise en évidence par hybridation *in situ* lors d'une étude préliminaire (A). Immunohistofluorescence FXR au niveau du PVN (C et D). La contre-coloration nucléaire (bleue) a été réalisée avec le DAPI (B et D). L'observation des immunomarquages a été réalisée au microscope confocal Zeiss LSM 710. 3V : troisième ventricule

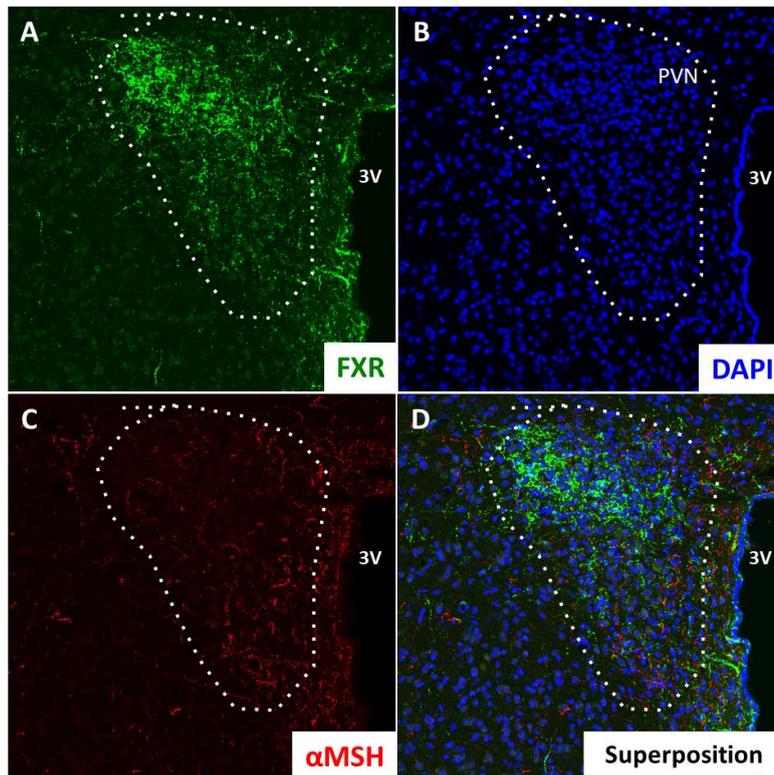


Figure 26: Expression de FXR et de l' α MSH au niveau du PVN. Immunohistofluorescence FXR (A et D) et α MSH (C et D) au niveau du noyau paraventriculaire (PVN). La contre-coloration nucléaire (bleue) a été réalisée avec le DAPI (B et D). L'observation des immunomarquages a été réalisée au microscope confocal Zeiss LSM 710. 3V : troisième ventricule

Le comarquage FXR/NPY au sein du PVN n'a techniquement pas été possible à mettre au point au cours de ce travail. De plus, l'arrêt de commercialisation de certains anticorps ou la perte de performance en fonction de la variabilité des lots commandés ont posé quelques difficultés dans la poursuite de la cartographie de FXR et des neuropeptides au sein du PVN et de l'ARC par immunohistofluorescence et microscopie confocale. Il nous a donc fallu attendre d'obtenir des souris reportrices dont l'expression de la protéine fluorescente GFP est sous le contrôle du promoteur NPY, ne nécessitant pas de double marquage immunohistofluorescent.

2. Etude de l'activation pharmacologique aigue de FXR cérébral

2.1 Analyse effet/dose en traitement aigu

Afin d'étudier les conséquences d'une administration centrale d'un agoniste FXR sur l'homéostasie énergétique, nous avons réalisé un suivi en cage métabolique de souris ayant reçu par injection ICV des doses croissantes de GW4064, agoniste de FXR de référence couramment utilisé (140). En effet, en l'absence de référence dans la littérature concernant les doses de GW4064 à administrer par voie ICV, nous n'avions aucune idée d'une posologie efficace pharmacologiquement vis-à-vis de l'activation de son récepteur, et surtout capable de modifier des paramètres physiologiques observables en cages métaboliques. Cette expérimentation, exploratoire, s'est donc basée sur l'analyse de l'évolution d'un ou plusieurs paramètres au sein des cages métaboliques, sans *a priori*, en fonction de la dose administrée.

Par soucis de clarté, les souris ayant reçu une injection ICV de DMSO seront nommées souris-DMSO et les souris ayant reçu une injection ICV de GW4064 seront nommées souris-GW4064dose1, souris-GW4064dose2 et souris-GW4064dose3. Les paramètres analysés sont la prise alimentaire, l'activité ambulatoire, la consommation en oxygène, le quotient respiratoire (RER) et les dépenses énergétiques. L'ensemble des paramètres analysés ne sont pas modifiés suite à l'injection ICV de GW4064 à la dose 1 (0.1 mM), par rapport au groupe contrôle (DMSO). En revanche, ces mêmes paramètres sont significativement diminués aux doses 2 (0.3 mM) et 3 (0.9 mM) avec un effet plus marqué à la dose 3 que l'on nommera dose "efficace" (figure 27). Plus précisément, les souris-GW4064dose3 présentent une réduction de la prise alimentaire dès la première nuit ainsi qu'une réduction de la consommation d'oxygène, de l'activité locomotrice et des dépenses énergétiques, ces effets étant visibles également la deuxième nuit post-administration. De plus, le calcul du quotient respiratoire montre des valeurs diminuées lors de la première nuit suivant l'administration, cet effet semblant s'estomper le lendemain et lors de la deuxième nuit. Enfin, un filtre appliqué sur le calcul de la VO_2 , ciblant uniquement les périodes où les animaux ne bougent pas, montre des valeurs diminuées de consommation d'oxygène chez les souris-GW4064dose3 en comparaison avec les souris-DMSO. L'ensemble de ces résultats démontre que l'administration ICV aigue de GW4064 modifie l'homéostasie énergétique de façon dose-dépendante.

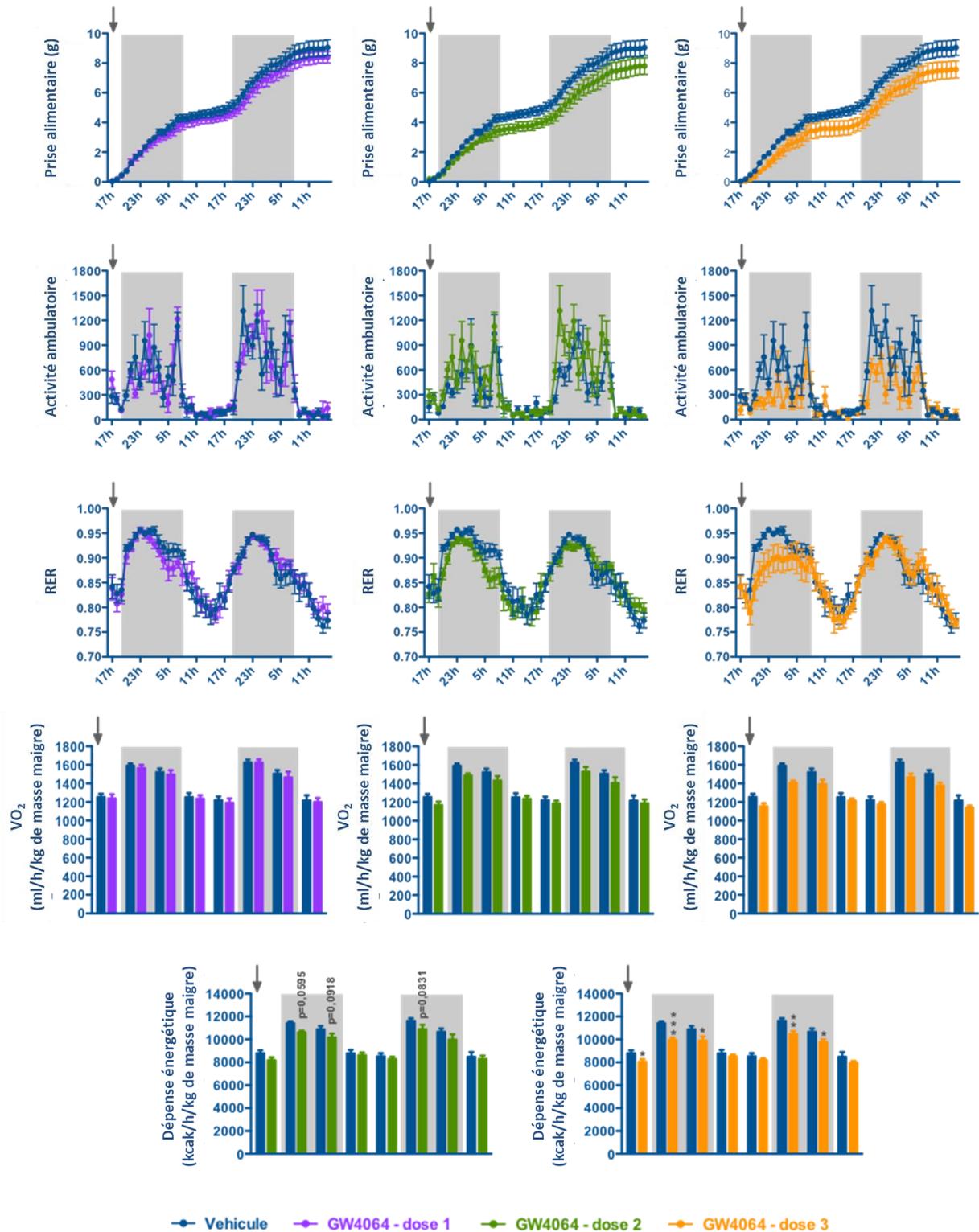


Figure 27: Etude de l'administration centrale de GW4064 sur l'homéostasie énergétique, en cage métabolique. Chaque souris a reçu une injection intracérébroventriculaire (ICV) d'une solution véhicule DMSO (J4) puis des injections ICV de GW4064 en trois doses croissantes (à J7, J10, J13) jusqu'à l'obtention d'une réponse métabolique efficace (D1 GW4064 = 0.1 mM, D2 = 3xD1, D3 = 9xD1). Les paramètres, enregistrés pendant 48 heures, comprennent la prise alimentaire, le quotient respiratoire RER, l'activité ambulatoire, la consommation d'oxygène VO₂ et la dépense énergétique. *P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

2.2 Activabilité pharmacologique de FXR et activation neuronale

Afin de déterminer si l'administration par ICV de GW4064 induit une activation neuronale que l'on pourra par la suite mettre en lien avec les paramètres analysés en cages métaboliques, nous avons réalisé des marquages immunohistofluorescents de C-fos, marqueur bien connu d'activation neuronale. L'analyse du signal C-fos a été réalisée selon l'axe antéro-postérieur des cerveaux de 8 animaux (souris-DMSO, n=4 et souris-GW4064dose3, n=4).

Alors que nous observons une diminution du signal C-fos dans l'ARC des souris-GW4064dose3 en comparaison aux souris-DMSO (figure 28), nous observons une augmentation de ce même signal au sein du PVN des souris-GW4064dose3 toujours en comparaison avec les souris-DMSO (figure 29).

Dans un second temps, nous avons évalué si l'administration par ICV de GW4064 à la dose efficace pouvait induire la transcription de gène cible de FXR, au sein des structures cérébrales présentant une différence du signal C-fos, permettant ainsi de mettre en évidence l'activabilité du récepteur FXR exprimé dans ces régions. De manière intéressante, l'expression de l'ARNm du gène cible de FXR, Bile Salt Export Pump (BSEP), transporteur connu au niveau hépatique pour permettre l'excrétion des acides biliaires conjugués dans le canalicule biliaire, est significativement augmentée dans le PVN dans les souris GW4064dose3 par rapport aux souris-DMSO (figure 29), alors qu'elle est diminuée au sein de l'ARC (figure 28).

L'administration ICV aigue de GW4064 induit donc l'expression de gène cibles de FXR, signe de son activation et ce, en association avec l'activation neuronale au sein du PVN.

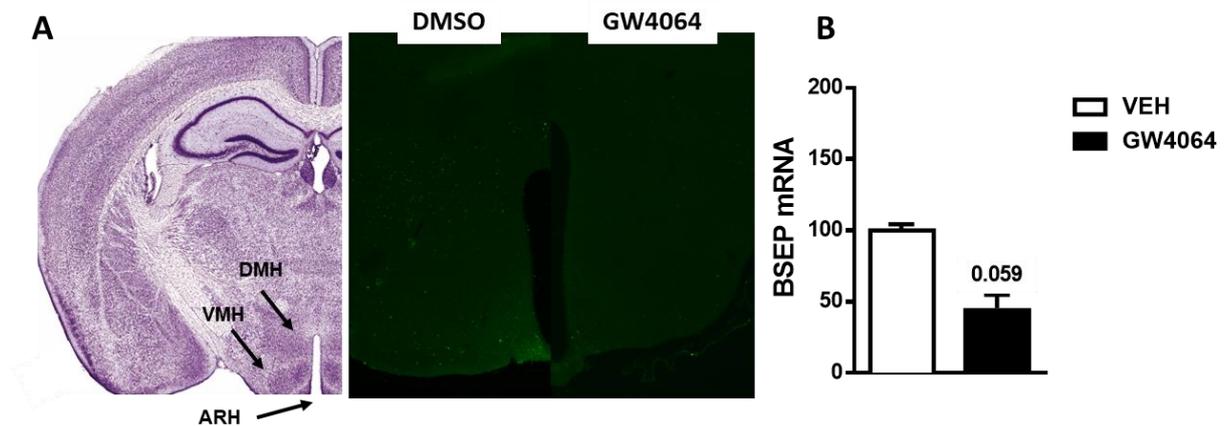


Figure 28: (A) Immunohistofluorescence C-Fos (vert) et (B) expression génique de BSEP, au niveau du noyau arqué (ARH) / éminence médiane (EM), 2h30 après administration en ICV du véhicule DMSO ou de l'agoniste FXR GW4064. L'observation de l'immunomarquage a été réalisée au microscope confocal Zeiss LSM 710. L'expression de BSEP, quantifiée par qPCR, a été normalisée par rapport à la cyclophiline. Les résultats (moyenne +/- SEM) sont exprimés par rapport à l'expression de BSEP après administration du véhicule à laquelle a été attribuée la valeur de 100%. VMH : noyau ventromédian; DMH: noyau dorsomédian.

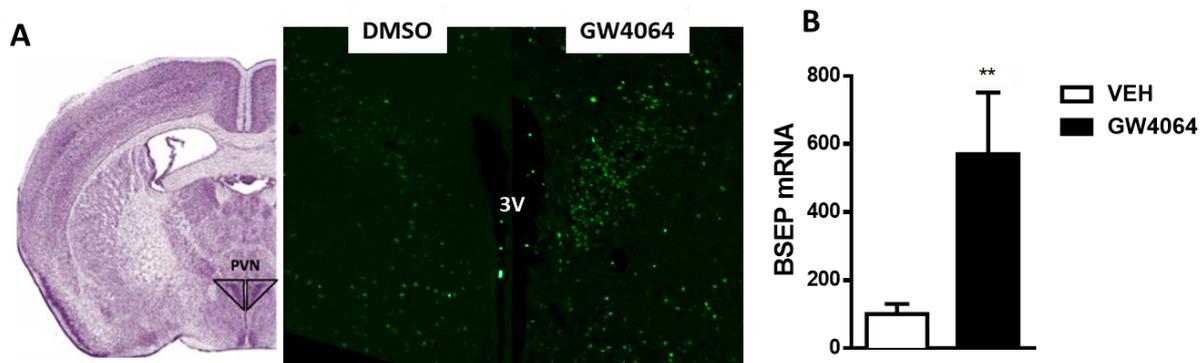


Figure 29: (A) Immunohistofluorescence C-Fos (vert) et (B) expression génique de BSEP, au niveau du noyau paraventriculaire (PVN), 2h30 après administration en ICV du véhicule DMSO ou d'agoniste de FXR GW4064. L'observation de l'immunomarquage a été réalisée au microscope confocal Zeiss LSM 710. L'expression de BSEP, quantifiée par qPCR, a été normalisée par rapport à la cyclophiline. Les résultats (moyenne +/- SEM) sont exprimés par rapport à l'expression de BSEP après administration du véhicule à laquelle a été attribuée la valeur de 100%. 3V : troisième ventricule. ** P < 0.01

L'ensemble des données nous apporte la preuve de concept selon laquelle le récepteur FXR exprimé au sein du SNC peut être activé par le GW4064, l'agoniste synthétique de référence de FXR, et ce par voie ICV, aboutissant à des modifications de différents paramètres de l'homéostasie énergétique étudiés en cages métaboliques.

3. L'administration ICV chronique de GW4064 induit l'activation de FXR au niveau de l'hypothalamus et modifie l'homéostasie énergétique

Un traitement médicamenteux en médecine humaine, surtout dans le cadre du traitement de maladies cardiovasculaires ou des perturbations liées au syndrome métabolique, est en général planifié de manière chronique, au long cours, avec une ou plusieurs prises quotidiennes. Afin d'apporter une dimension translationnelle au projet, il nous a paru intéressant dans ce contexte de réaliser une activation pharmacologique chronique de FXR et d'en évaluer les conséquences sur l'homéostasie énergétique. Il convient de mettre en évidence que les résultats chroniques peuvent être différents de ceux obtenus en aigu et ce pour plusieurs raisons. En effet, la pharmacocinétique de la molécule selon un mode aigu est probablement différente d'une mode chronique en injection ICV. D'autre part, des effets génomiques et non génomiques peuvent se présenter en fonction de la durée de traitement. Nous avons administré une injection ICV chaque jour pendant 6 jours de GW4064 à la dose de 0.9 mM, ou son véhicule (100% DMSO) chez des souris mâles C57bl6J placées en cages métaboliques à 17H (soit deux heures avant l'extinction des lumières). A l'issue du traitement central et chronique (6 jours de GW4064), nous avons pu démontrer que le récepteur FXR était activé, de par l'induction de l'expression de gènes cibles de FXR (SHP et BSEP) dans l'ARC (figure 30 a-b), mais pas dans le PVN (figure 30 c-d), indiquant de ce fait une activation spécifique de FXR au niveau de l'ARC. Afin d'apprécier les conséquences physiologiques de cette activation spécifique de FXR au niveau hypothalamique, nous avons enregistré et analysés différents paramètres de l'homéostasie énergétique mesurés au sein de cages métaboliques. Nous avons pu constater, en parallèle de cette activation de FXR, une diminution significative de la dépense énergétique nocturne sous GW4064, accompagnée d'une diminution légère de la VO_2 et de la VCO_2 , mais sans différences de l'activité locomotrice, du quotient respiratoire (respiratory exchange ratio : RER) ou de la prise alimentaire (figure 31). Par ailleurs, l'efficacité de prise alimentaire (« food efficiency ») et le delta de prise de poids, étaient augmentés significativement sous GW4064 à la fin du traitement chronique (6^{ème} jour), par rapport aux mêmes données obtenues juste après la première injection (figure 32).

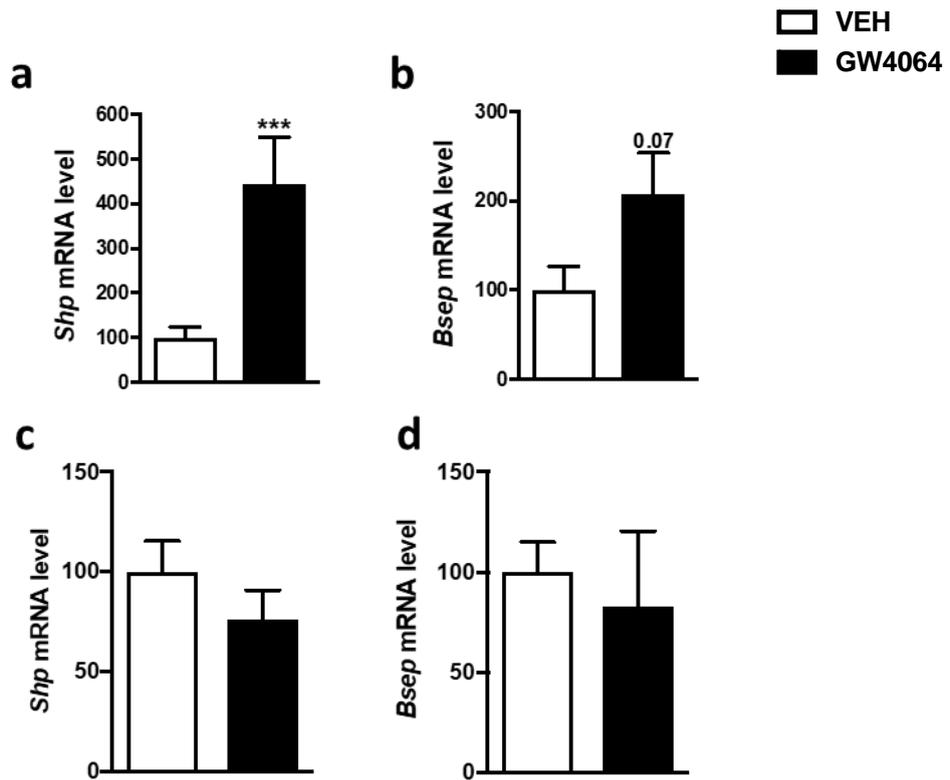


Figure 30: Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur l'expression de gènes cibles de FXR dans l'ARC et le PVN. Les souris ont reçu des injections ICV de GW4064 à 0.9 mM ou de son véhicule DMSO une fois par jour pendant 6 jours. Les niveaux d'ARNm indiqués ont été mesurés dans la structure éminence médiane/noyau arqué ou le PVN de l'hypothalamus. Les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student. * * * P < 0.001. (a-b) Expression de l'ARNm de Shp et Bsep par q-PCR dans l'ARC ; (c-d) Expression de l'ARNm de Shp et Bsep par q-PCR dans le PVN. (n=8 par groupe)

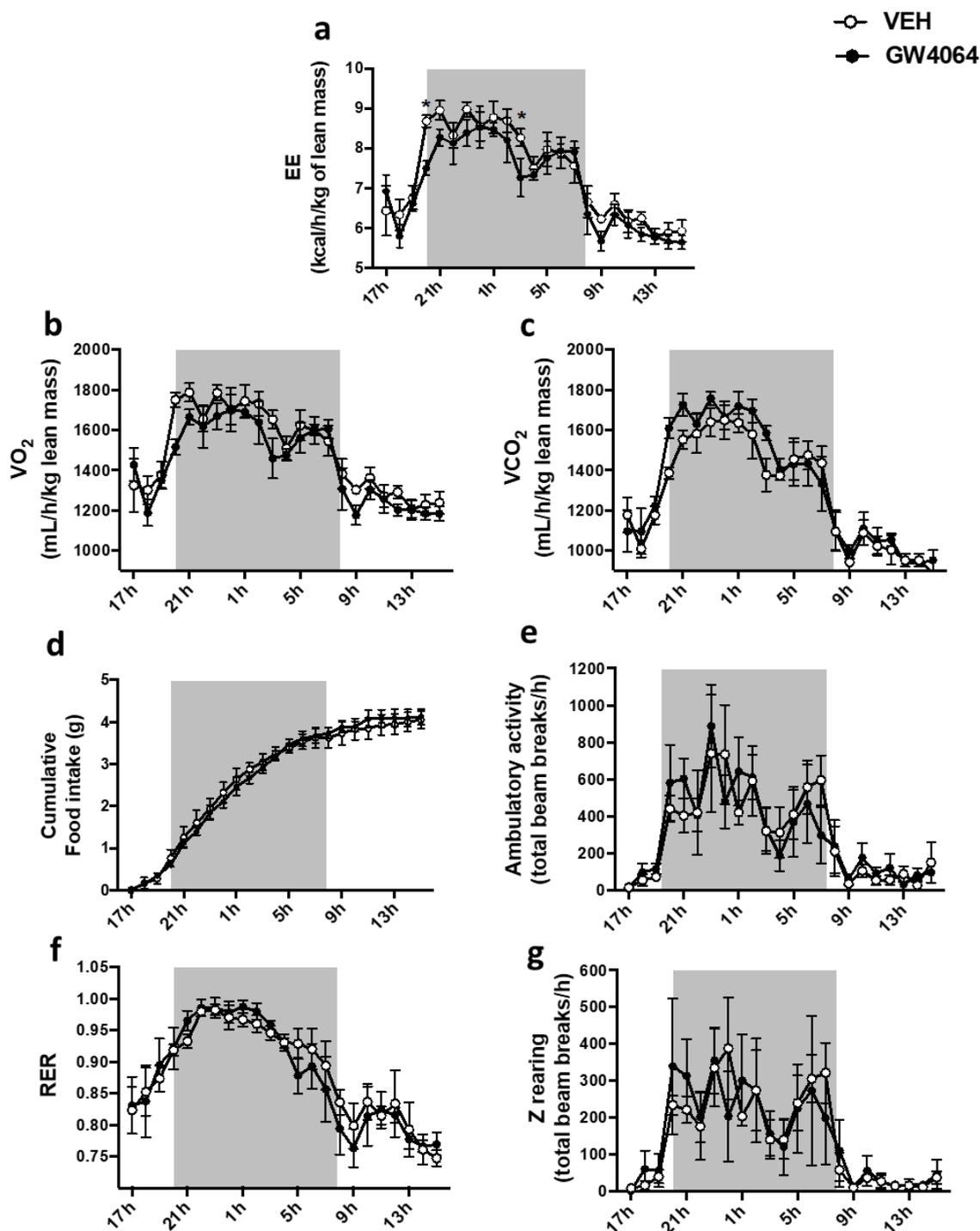


Figure 31: Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur les paramètres mesurés en cages métaboliques. Les souris ont reçu des injections intracérébroventriculaires (ICV) de GW4064 à 0.9 mM ou de son véhicule DMSO une fois par jour pendant 6 jours. Les paramètres suivants ont été mesurés en cages métaboliques (n=8 par groupe): (a) dépense énergétique (EE), (b) consommation d'oxygène par 24 heures (VO₂) (n=8 per group). (c) consommation de dioxyde de carbone par 24 heures (VCO₂), (d) prise alimentaire cumulative (FI) (e) activité locomotrice par 24 heures (nombre total d'interruptions du faisceau laser par heure), (f) quotient respiratoire par 24 heures (RER), (g) nombre de redressements par 24 heures. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test ANOVA two way suivi d'un Tukey post-hoc, les données étant représentées en moyennes ± SEM. *P < 0.05

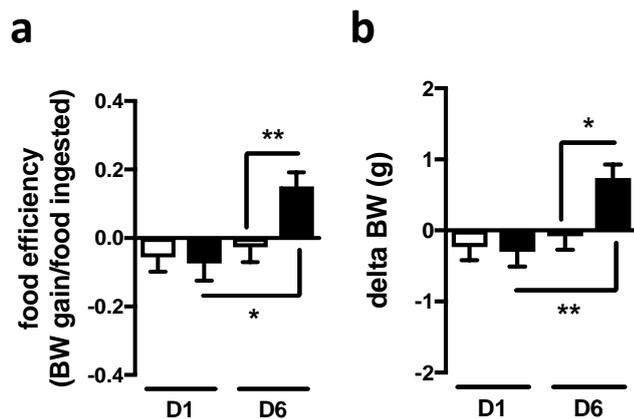


Figure 32: Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur l'efficacité de prise alimentaire (food efficiency) et le delta de prise de poids. Les souris ont reçu des injections intracérébroventriculaires (ICV) de GW4064 à 0.9 mM ou de son véhicule DMSO une fois par jour pendant 6 jours. (a) L'efficacité alimentaire a été calculée par le rapport entre le poids corporel et la prise alimentaire après un jour et 6 jours de traitement par GW4064 (n=8 par groupe). (b) Le gain de poids corporel a été mesuré après un jour et 6 jours de traitement (n=8 par groupe). Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test ANOVA two way suivi d'un Tukey post-hoc, les données étant représentées en moyennes \pm SEM. *P < 0.05, ** P < 0.01

4. L'administration ICV chronique de GW4064 modifie les fonctionnalités du TAB, le tonus sympathique et la thermogénèse

En prenant en considération les données précédentes, l'activation cérébrale chronique de FXR par un agoniste spécifique résulte en la modification de l'homéostasie énergétique et, plus précisément, de la dépense énergétique, sans modification de la prise alimentaire ni de l'activité physique. Ces observations nous ont suggéré que ceci pouvait être expliqué soit par une modification du métabolisme basal ou de la thermogénèse, deux des trois composantes de la dépense énergétique. Ainsi, pour rechercher les effets d'une activation chronique de FXR cérébral sur ces deux composantes, nous avons mesuré au sein des organes périphériques suivants : foie, tissu adipeux épididymal, tissu adipeux brun, l'expression génique de gènes impliqués dans plusieurs voies métaboliques ou dans la thermogénèse (94). Parmi les gènes testés, l'administration centrale et chronique de GW4064 a entraîné uniquement des modifications au niveau du tissu adipeux brun (TAB) (figure 33).

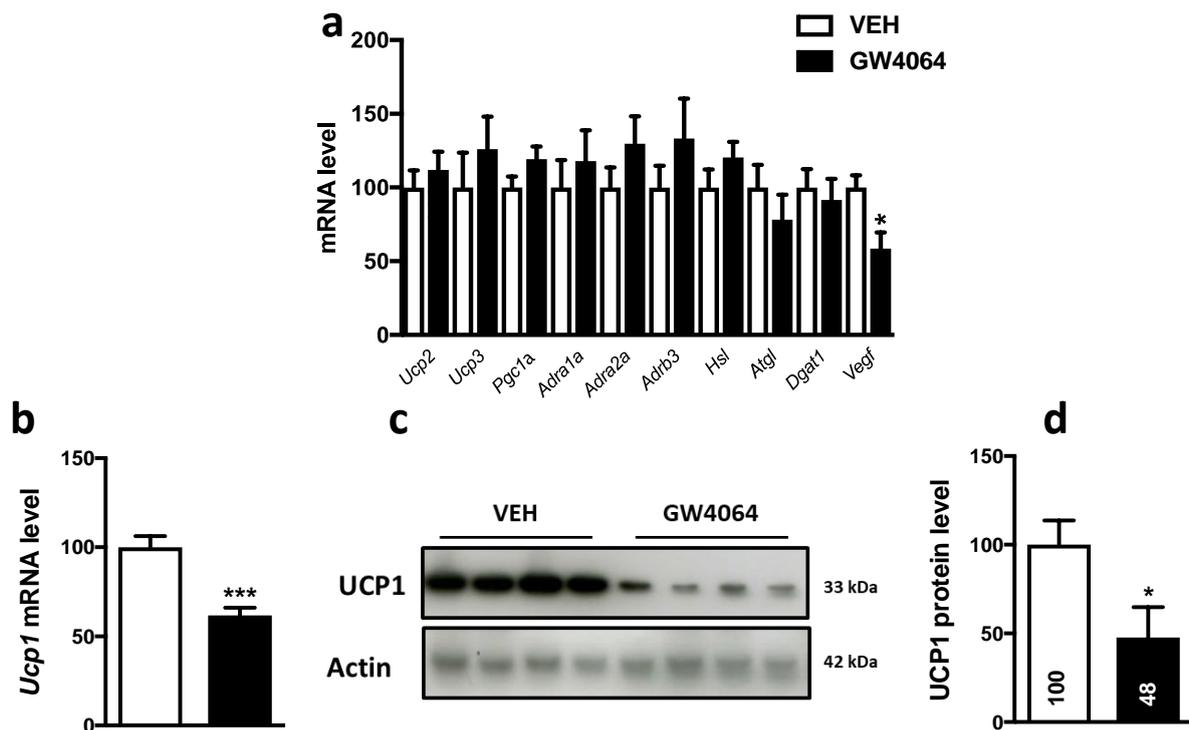


Figure 33: Effets d'un traitement central et chronique de GW4064 sur les expressions géniques et protéiques du tissu adipeux brun (TAB). L'ensemble des expressions géniques (a) et l'expression protéique de UCP1 (b-d) dans le TAB de souris ont été étudiées après 6 jours d'administration centrale de GW4064 (n = 8 par groupe). Pour les expressions géniques, les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline. La recherche a été faite au niveau du TAB pour différentes voies métaboliques nécessaires à son fonctionnement. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student. *P < 0.05, *** P < 0.001.

De manière plus précise, les expressions géniques et protéiques de UCP1 diminuaient significativement dans le TAB, UCP1 étant une protéine mitochondriale majeure de la régulation de la thermogénèse liée au tissu adipeux brun (159)(figure 33). De plus, une diminution de l'expression du gène du facteur de croissance Vegf, marqueur de vascularisation, ainsi qu'un élargissement des adipocytes bruns (figure 34), ont été trouvés lors du traitement par GW4064, suggérant un remodelage du TAB (160). Ces effets périphériques obtenus après stimulation centrale de FXR pourraient théoriquement s'expliquer par une fuite de ce médicament dans la circulation sanguine. Néanmoins, le GW4064 n'a pas été détecté dans le plasma après ces 6 jours d'injection (quantification par un analyseur très sensible ($C < 10\text{nM}(\text{LOQ})$). En outre, aucun des gènes cibles classiques de FXR n'a été induit dans le foie de ces souris (figure 35).

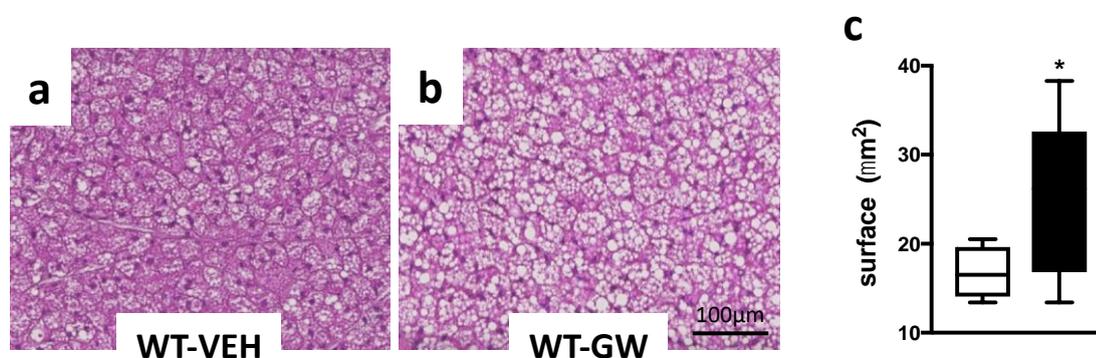


Figure 34: Effets d'un traitement central et chronique de GW4064 sur l'histologie du tissu adipeux brun (TAB). Les modifications histologiques ont été évaluées dans le TAB de souris après 6 jours d'administration centrale de GW4064 (n=5 par groupe). (a-b) Images représentatives de la coloration à l'hématoxyline / éosine, (c) Quantification de la surface des gouttelettes lipidiques. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student.*P < 0.05.

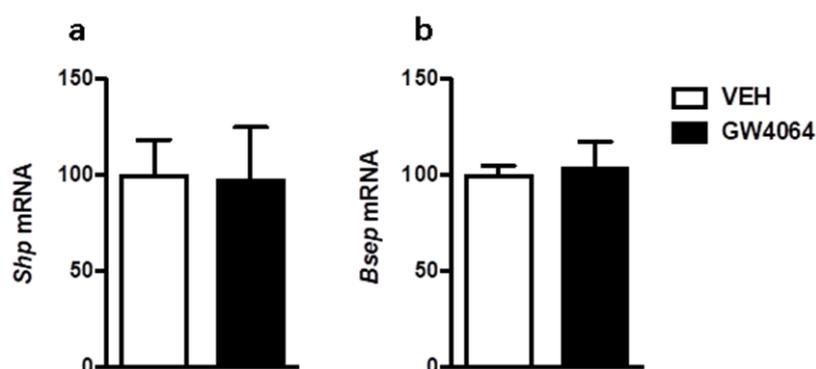


Figure 35: Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur l'expression de gènes cibles de FXR dans le foie. Les souris ont reçu des injections ICV de GW4064 à 0.9 mM ou de son véhicule DMSO une fois par jour pendant 6 jours. Les niveaux d'ARNm indiqués ont été mesurés dans le foie. Les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student (n=8 par groupe)

La signalisation entraînant l'expression d'UCP1 au niveau du tissu adipeux brun dépend du système nerveux sympathique (figure 9), par l'activation des récepteurs adrénergiques comme les récepteurs β_3 adrénergiques, via les catécholamines (91). La thermogénèse du TAB est en fait activée par des fibres nerveuses, appartenant au système nerveux sympathique et exprimant la tyrosine hydroxylase (89), enzyme nécessaire et limitante pour la synthèse des catécholamines.

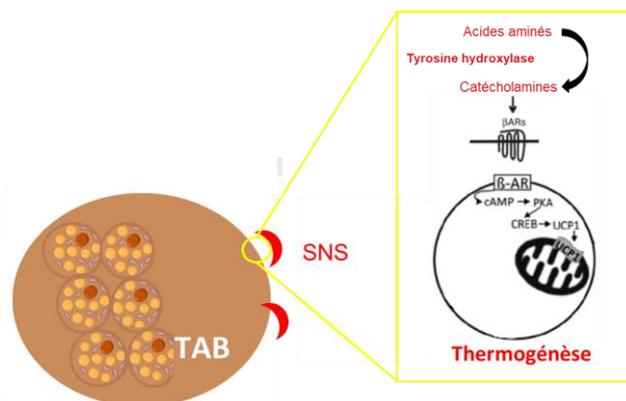


Figure 36 : Régulation de l'expression d'UCP1 par le système nerveux sympathique dans le TAB (rappel de la figure 9, schéma personnel). La signalisation qui conduit à l'expression d'UCP1 dépend du système sympathique. L'activation des récepteurs adrénergiques est réalisée par les catécholamines. Ces dernières sont obtenues à partir d'acides aminés par une série de réactions enzymatiques, dont la tyrosine hydroxylase qui en est l'enzyme limitante de synthèse. SNS : système nerveux sympathique ; TAB : tissu adipeux brun ; PVH : noyau paraventriculaire ; LHA: aire hypothalamique latérale ; DMH: noyau dorsomédian ; VMH: noyau ventromédian ; ARH: noyau arqué ; NTS : noyau du tractus solitaire ; VTA : aire tegmentale ventrale ; AMY : amygdale ; NAcc : noyau accubens, mPFC : cortex préfrontal ; CREB : c-AMP Response Element-Binding protein ; UCP1 : uncoupling Protein 1

Dans un premier temps, nous avons cherché à tester la réponse adrénergique à la fin d'un traitement central et chronique de GW4064 par une injection intra-péritonéale de CL 316243, stimulant spécifiquement les récepteurs β_3 adrénergiques, à la dose de 0,1 mg/ml ; 100 μ l / 10 g de souris. Nous nous sommes rendus compte que le GW4064 inhibait la réponse adrénergique induite par le CL 316243 pour la synthèse d'UCP1. Nous avons pu également démontrer que le traitement central et chronique de GW4064 entraînait une diminution du tonus sympathique, d'une part en analysant sa mesure électrophysiologique et d'autre part en analysant l'expression de la tyrosine hydroxylase dans le TAB (figure 37).

Collectivement, ces données suggèrent un rôle du récepteur FXR central dans la régulation de l'homéostasie énergétique, en modulant la thermogénèse via le système nerveux sympathique. Ces résultats nous ont donc également suggéré que l'administration centrale et chronique de GW4064 pourrait altérer la thermogénèse liée à UCP1 et causer un état d'intolérance au froid chez la souris.

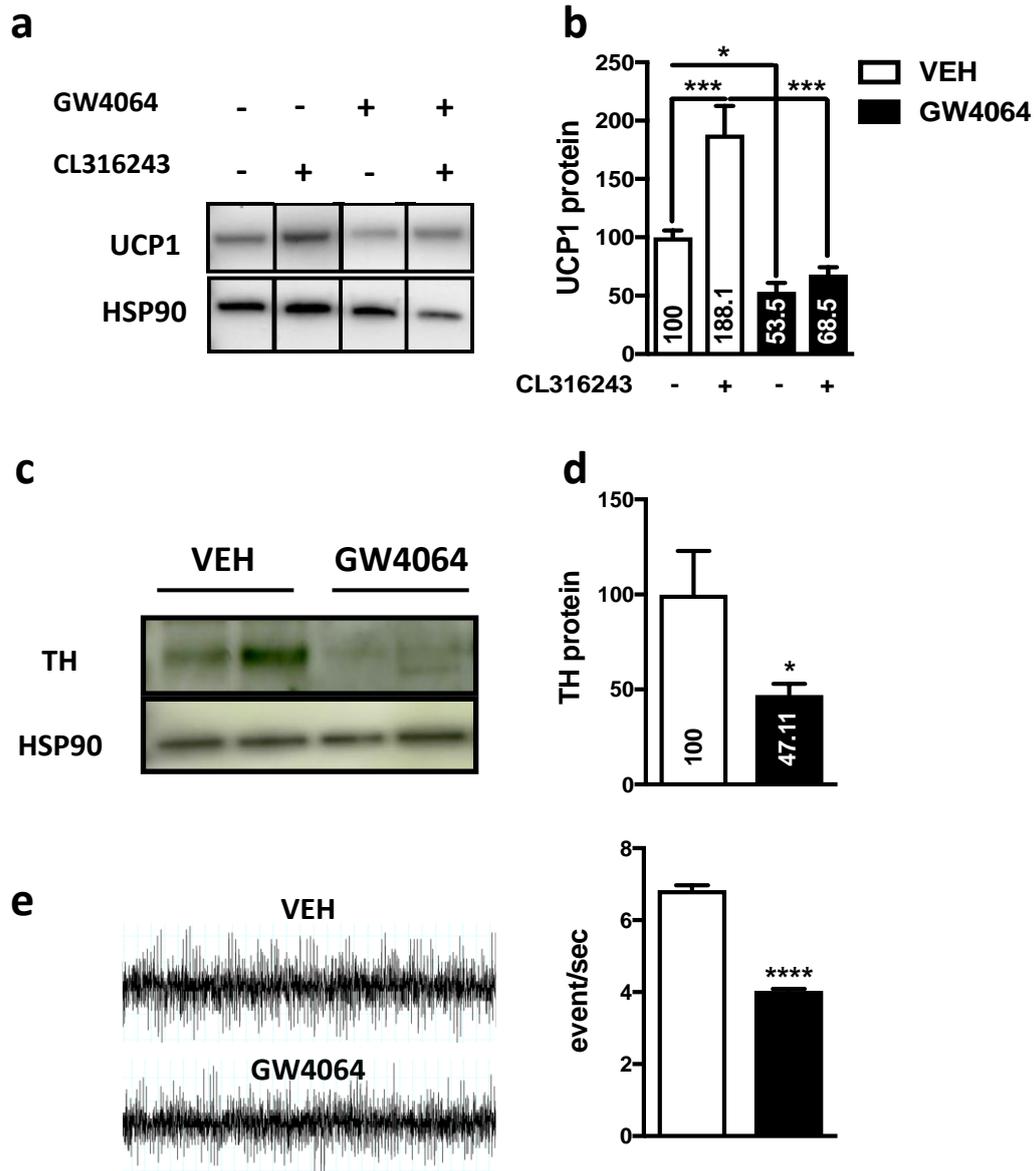


Figure 37 : Effets d'un traitement central et chronique de GW4064 sur le système nerveux sympathique. (a-b) L'expression protéique de UCP1 a été étudiée à la suite d'un traitement central et chronique de GW4064 (8 souris par groupe) suivi par l'activation ou non des récepteurs β_3 adrénergiques du TAB grâce à l'injection intrapéritonéale de CL316243 (0,1 mg/ml, 100 μ l / 10 g de souris). (c-d) Expression protéique de la Tyrosine hydroxylase (TH) dans le TAB (n = 5 par groupe) (e) Mesure du tonus sympathique par mesure électrophysiologique *In vivo* (n = 5 par groupe). Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student ou ANOVA two way suivi d'un test Tukey post-hoc, les données étant représentées en moyennes \pm SEM. *P < 0.05, *** P < 0.001, **** P < 0.0001.

Pour déterminer si l'activation centrale de FXR a un impact fonctionnel sur les fonctions du TAB, l'impact du traitement ICV de GW4064 sur la thermogenèse adaptative a été étudié chez des souris soumises à une exposition au froid de 8 heures. Comme prévu théoriquement, l'exposition au froid a induit fortement l'expression des niveaux d'ARNm et protéiques de UCP1 et de la TH chez les souris traitées par le véhicule. De manière surprenante, le

traitement par ICV de GW4064 a fortement atténué cette induction. De plus, les souris traitées par ICV avec le GW4064 présentent une température rectale nettement inférieure à celle des souris traitées avec le véhicule lorsqu'elles sont placées à 4°C (figure 38).

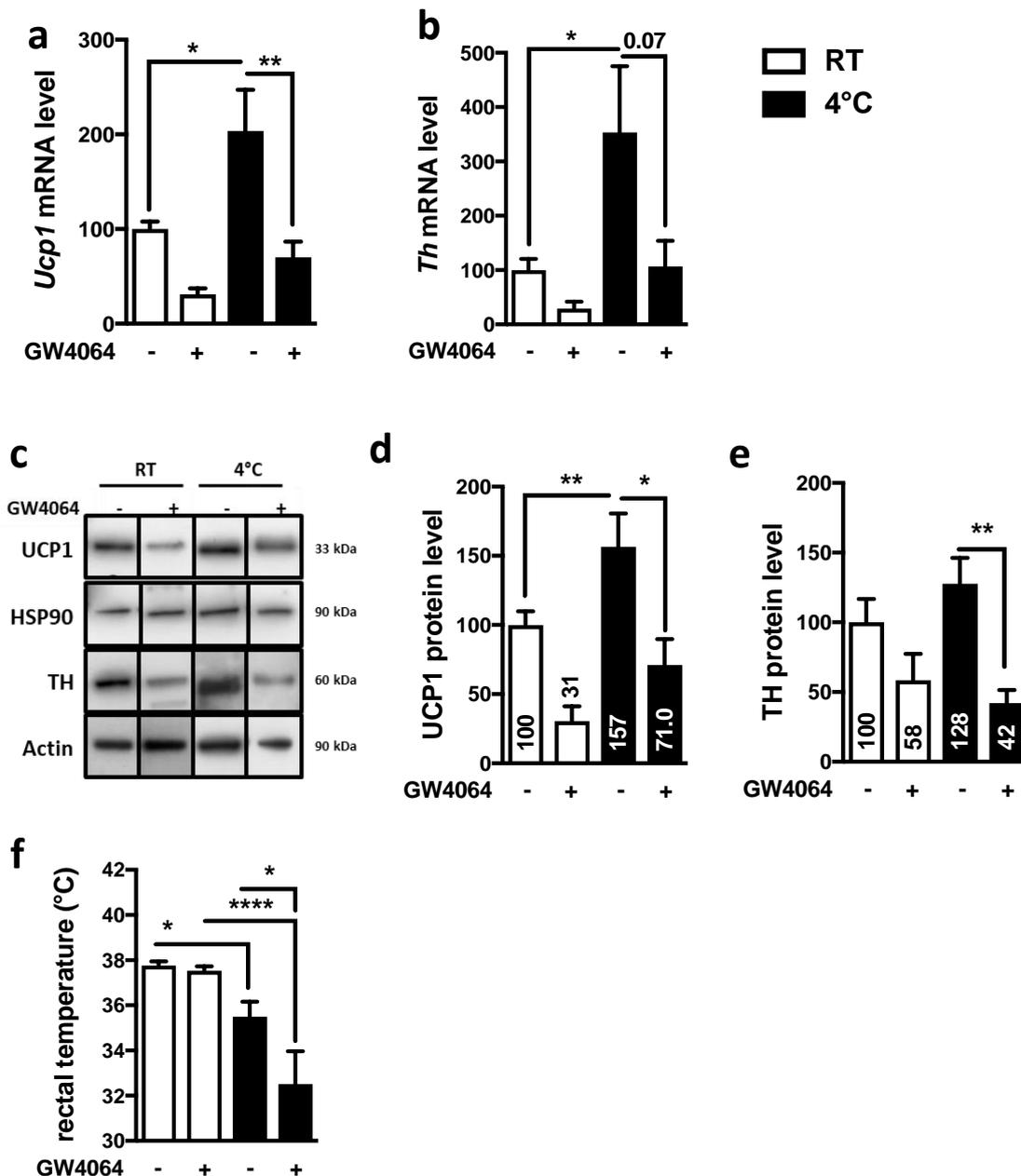


Figure 38: Effets d'un test de thermogénèse adaptative (8 heures) sur les synthèses de UCP1 et de la TH dans le TAB ainsi que sur la température rectale, à la suite d'un traitement chronique et central de GW4064. Les expressions géniques de UCP1 et de la TH (a-b) ainsi que leurs expressions protéiques (c-e) ont été étudiées dans le TAB après un traitement central et chronique de GW4064 suivi d'un test de thermogénèse adaptative de 8 heures à la fin du traitement chronique, en comparant les résultats à température ambiante (RT, 23°C) et à 4°C (n=5 par groupe). Pour l'expression génique, les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline et de 18s, les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. La température rectale (f) a été mesurée à la fin du test de thermogénèse adaptative (n=10/RT et n=5/4°C). Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test ANOVA two way suivi d'un test Tukey post-hoc, les données étant représentées en moyennes ± SEM. *P < 0.05, ** P < 0.01, **** P < 0.0001

L'exposition au froid est un stimulus important qui entraîne une augmentation des fonctions métaboliques du TAB (161). Ainsi, les niveaux d'ARNm des récepteurs Alpha1-, 2- et 3-adrénergiques ainsi que Pgc1a et Dio2 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-alpha and Iodothyronine Deiodinase 2) ont augmenté dans le TAB en réponse à une exposition au froid de 8 heures. Cependant, le traitement par ICV avec le GW4064 n'a pas modulé l'expression de ces gènes induite par une exposition à 8h de froid, ce qui suggère un mécanisme en amont de la signalisation des récepteurs adrénergiques et exclut un mécanisme dépendant de la signalisation thyroïdienne (figure 39).

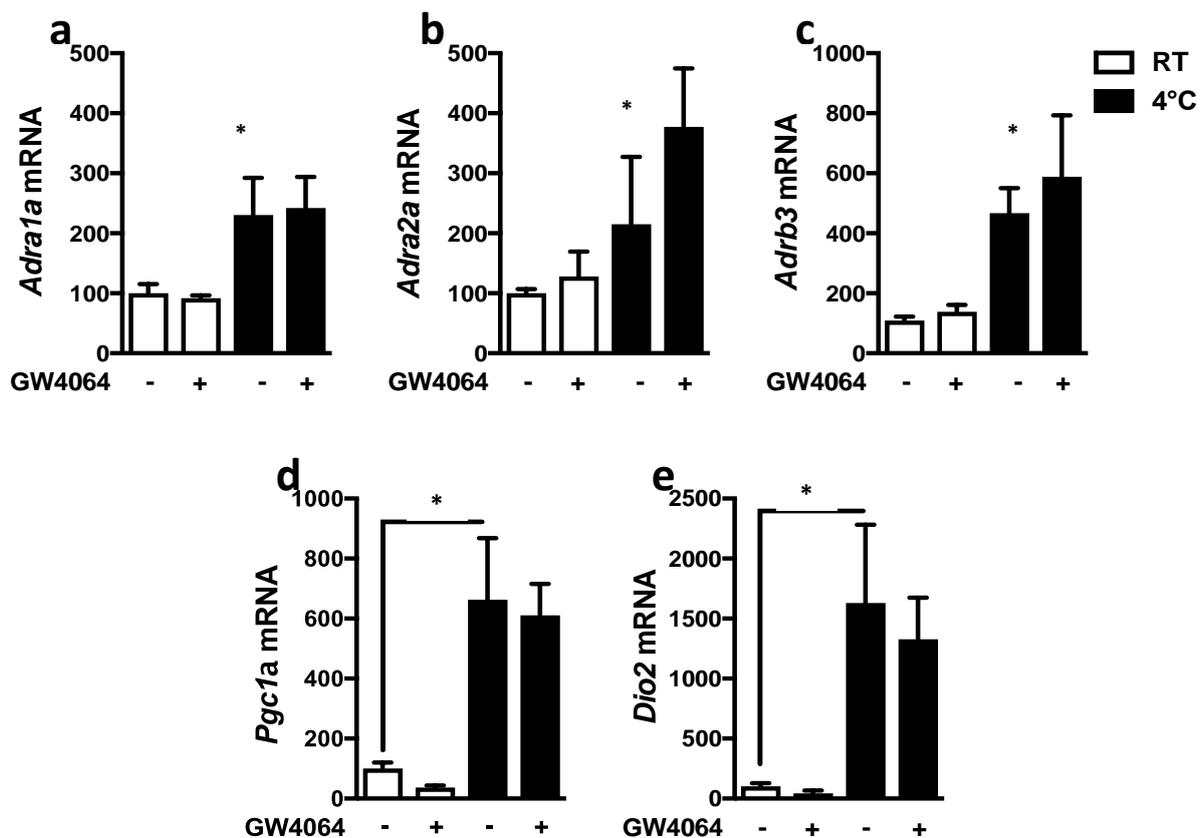


Figure 39: Effets d'un traitement central et chronique de GW4064, lors d'un test de thermogénèse adaptative, sur les expressions de gènes régulant les fonctions métaboliques du TAB. (a-e) Les niveaux d'ARNm indiqués ont été mesurés dans le TAB de souris placées à température ambiante (23°C) ou 4°C (n=5 par groupe) après un traitement central et chronique de GW4064. Les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline ou de 18s. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test ANOVA Two-Way suivi d'un Tukey post-hoc. *P < 0.05

5. L'administration ICV chronique de GW4064 altère la signalisation PKA-CREB et l'expression de la TH dans l'hypothalamus

Pour déterminer comment l'activation cérébrale de FXR module le tonus sympathique dans le TAB, l'expression de la TH a été mesurée dans l'hypothalamus. Les neurones exprimant la TH sont situés dans le PVN et projettent vers les centres de régulation autonomes du tronc cérébral et de la moelle épinière pour intégrer et relayer les informations sympathiques, par exemple vers la TAB (90). Une voie métabolique d'origine centrale et induisant la diminution de UCP1 dans le TAB a déjà été reportée dans la littérature. En effet, certains auteurs ont montré qu'une modification d'expression de NPY dans le noyau arqué pouvait modifier le tonus sympathique et contrôler les fonctions du TAB via un relai par les neurones exprimant la tyrosine hydroxylase dans le noyau paraventriculaire (162). De manière intéressante, nos résultats montrent que le traitement central et chronique au GW4064 a diminué l'expression de l'ARNm et de la protéine TH dans l'hypothalamus (figure 40).

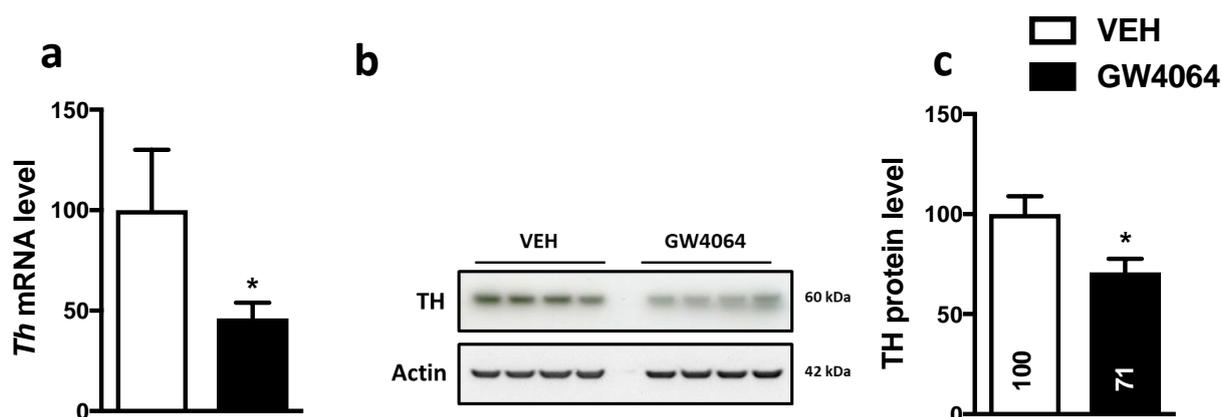


Figure 40: Effets d'un traitement chronique et central de GW4064 sur l'expression hypothalamique de la Tyrosine hydroxylase (TH). L'expression de la TH hypothalamique a été étudiée à la suite d'un traitement central et chronique de GW4064. (a) Expression génique, les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de 18s (n=8 par groupe), (b) Expression protéique (n=5 par groupe). Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student, les données étant représentées en moyennes \pm SEM. *P < 0.05

L'expression de la TH dans l'hypothalamus est sous le contrôle du facteur de transcription phosphorylé CREB (c-AMP Response Element-Binding protein) par la protéine kinase c-AMP-dépendante (PKA) (163), interagissant avec la protéine PKARII exprimée par les neurones dans l'hypothalamus (164). Il est intéressant de noter que le niveau de phosphorylation de la protéine PKARII est plus faible dans l'hypothalamus lors du traitement

par ICV GW, associé à une diminution de l'immunomarquage pCREB dans l'ARC (figure 41). De plus, le traitement par ICV GW4064 a diminué les niveaux d'ARNm de NPY et Pgc1a, des gènes cibles de CREB bien connus (165, 166), dans l'ARC (figure 42).

Ces données démontrent que l'activation pharmacologique de FXR hypothalamique modifie la signalisation PKA-CREB hypothalamique, modulant ainsi l'expression de TH dans l'hypothalamus, et réduisant finalement le tonus sympathique sur le TAB, affectant ainsi l'homéostasie énergétique.

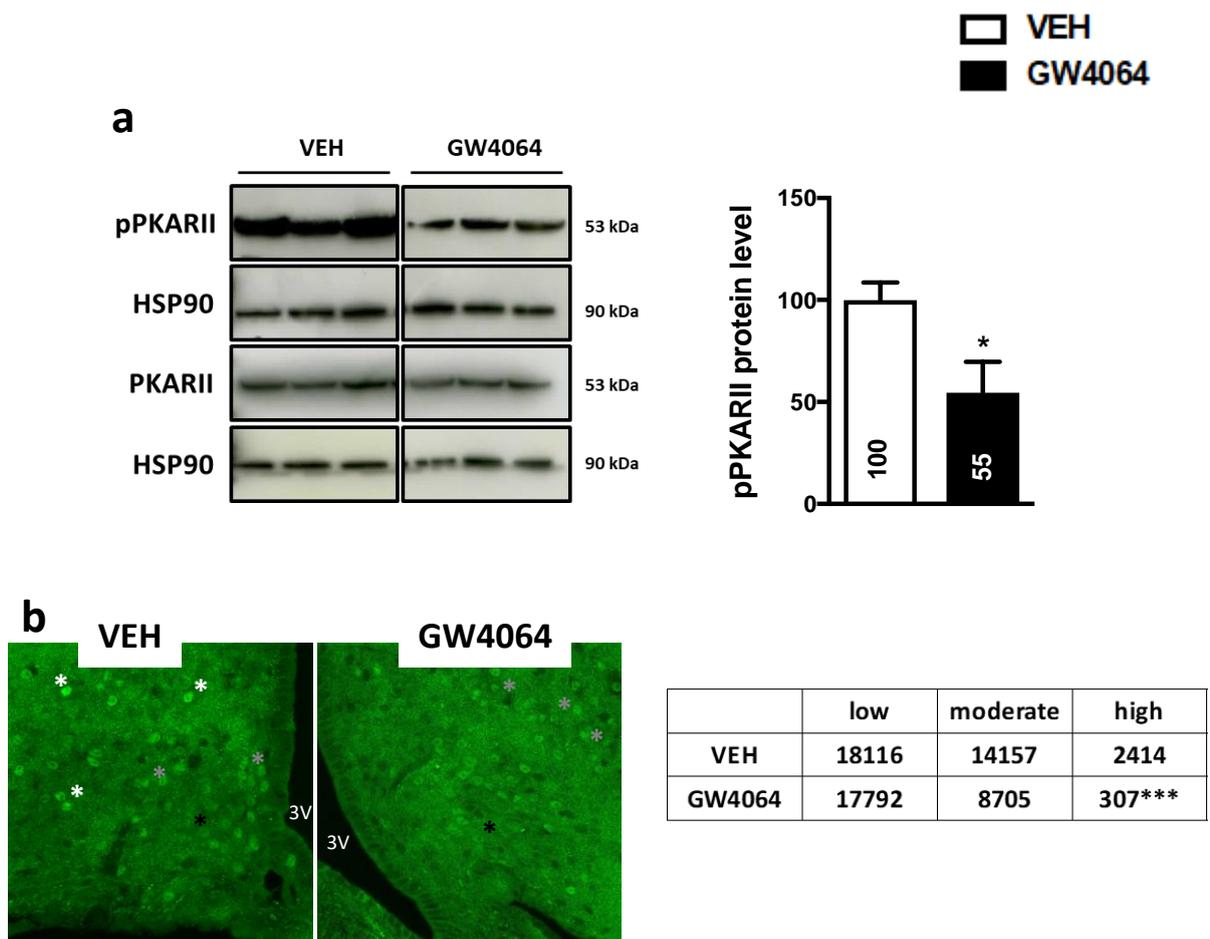


Figure 41 : Effets d'un traitement chronique et central de GW4064 sur la signalisation PKA-CREB hypothalamique. (a) Expressions protéiques de pPKARII et PKARII dans l'hypothalamus (n=5 par groupe). (b) Images représentatives de l'immunomarquage pCREB dans l'ARC (n=8 pour le groupe VEH ; n=7 pour le groupe GW4064) ; dont la quantification des cellules « pCREB-positives » est mentionnée de manière graduelle : basse (astérisque noire), intermédiaire (astérisque grise) et forte (astérisque blanche) intensités. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student ou de X2 pour la quantification de pCREB, *P < 0.05, *** P < 0.001

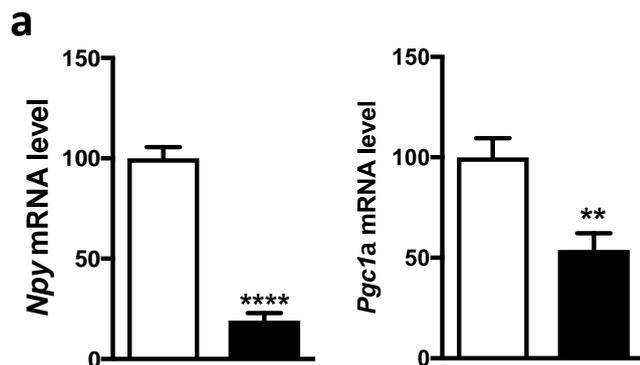


Figure 42 : Effets d'un traitement chronique et central de GW4064 sur l'expression hypothalamique de gènes cibles du facteur de transcription CREB. (a) Expressions géniques de Npy et Pgc1a dans l'ARC, les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline (n=8 par groupe). Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student. ** P < 0.01, **** P < 0.0001

6. FXR est le récepteur impliqué dans les effets du GW4064 sur le tissu adipeux brun

Plusieurs méthodes peuvent nous permettre d'affirmer que les résultats obtenus suite à l'administration centrale de GW4064 résultent bien de l'activation du récepteur FXR présent au niveau central.

- Pour rappel, nous avons déjà montré que l'administration ICV aigüe et chronique de GW4064 induisait une induction de gène cible de FXR au niveau de l'hypothalamus, sans que l'on ne retrouve ni d'activation de FXR, ni de trace de GW4064 au niveau périphérique, cela constituant déjà un premier élément de preuve.
- Afin d'affiner nos résultats concernant l'implication de FXR sur les effets observés sur le TAB et l'homéostasie énergétique, nous avons répliqué nos expérimentations en utilisant a) des souris mâles globalement invalidées pour FXR (FXR KO) traitées par GW4064 et b) un autre agoniste synthétique spécifique de FXR, le Tropicexor, à la place du GW4064, afin de tester le potentiel d'activation de FXR cérébral par un autre agoniste pharmacologique spécifique. La preuve ultime consistera au développement d'un modèle conditionnellement et spécifiquement délété pour FXR au niveau neuronal, et d'évaluer l'impact du GW4064 sur l'homéostasie énergétique chez ces animaux (dans les perspectives de ce manuscrit).

6.1 Utilisation d'un modèle de souris globalement invalidées pour FXR (FXR KO)

Au cours de notre étude, nous avons vérifié si les résultats obtenus précédemment étaient FXR-dépendants, de par l'utilisation de souris mâles globalement invalidées pour FXR (FXR KO). Lors de l'utilisation du GW4064 ou de son véhicule chez la souris FXR KO, nous n'avons pas observé d'induction de gènes cible de FXR dans le noyau arqué (figure 43). De la même manière, nous n'avons pas pu répliquer la diminution d'UCP1 ou de la tyrosine hydroxylase dans le tissu adipeux brun (figure 44). De plus, l'interférence de FXR sur les expressions hypothalamiques de NPY/PGC1a/TH n'a pas été retrouvée chez la souris FXR KO (figure 45).

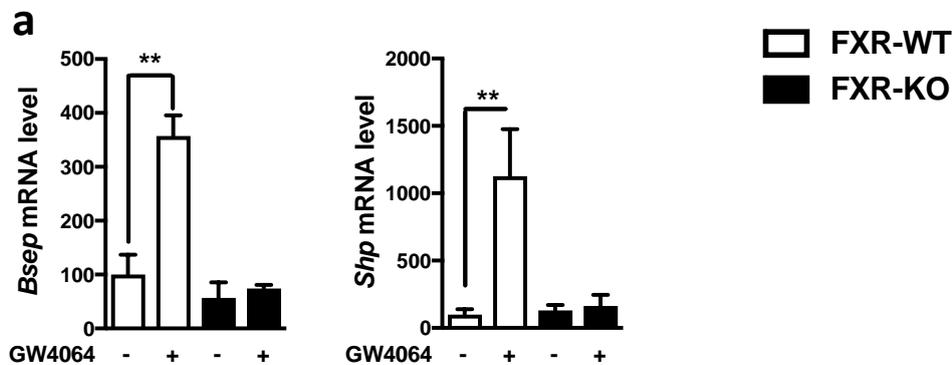


Figure 43 : Comparaison de l'expression hypothalamique des gènes cibles de FXR à la suite d'un traitement chronique et central de GW4064 entre des souris Wild Type et des souris FXR-KO. Les expressions géniques ont été étudiées après 6 jours de traitement central et chronique de GW4064 dans la zone éminence médiane/noyau arqué. Les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline (n=8 par groupe). Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un Anova two way suivi d'un test Tukey post-hoc. ** P < 0.01

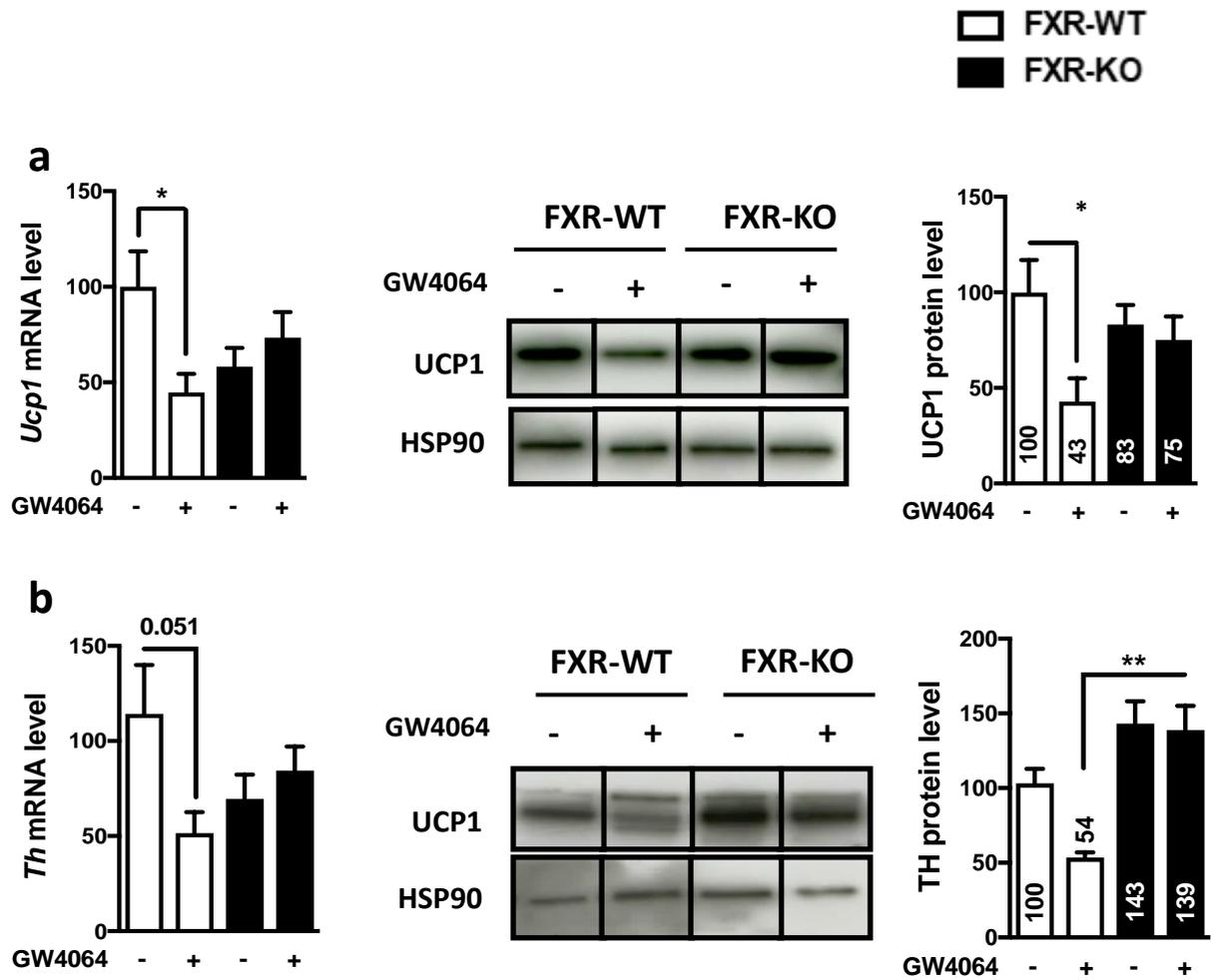


Figure 44 : Comparaison de l'expression d'UCP1 et de la TH dans le TAB à la suite d'un traitement chronique et central de GW4064 entre des souris Wild Type et des souris FXR-KO. Les expressions géniques (n=8 par groupe) et protéiques (n=8 par groupe) d'UCP1 (a) et de la TH (b) ont été étudiées après 6 jours de traitement central et chronique de GW4064 dans le TAB. Pour les expressions géniques, les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline ou de 18s. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un Anova two way suivi d'un test Tukey post-hoc. *P < 0.05, ** P < 0.01

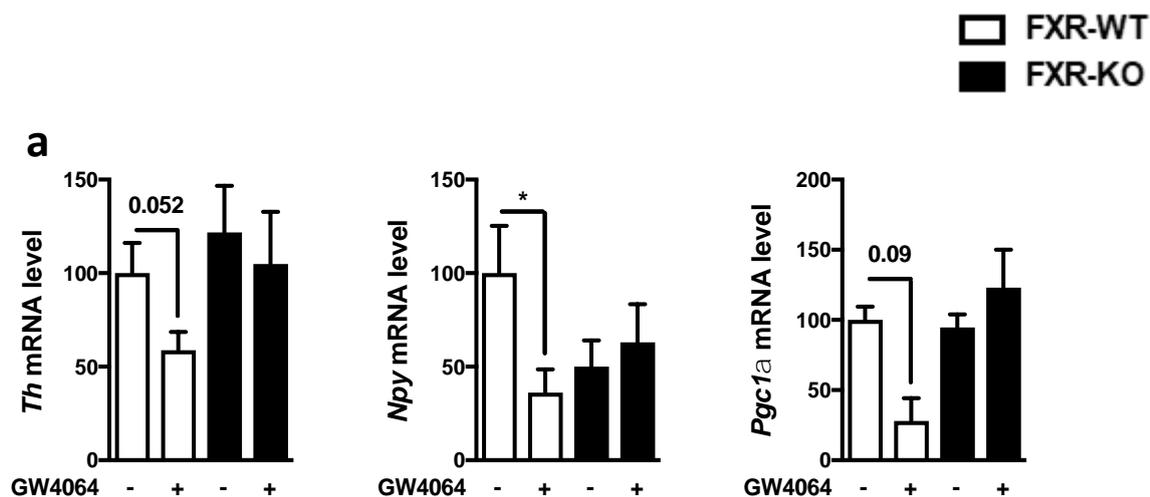


Figure 45 : Expressions hypothalamiques de la TH, NPY et PGC1a à la suite d'un traitement chronique et central de GW4064, entre des souris Wild Type et des souris FXR-KO. Les expressions géniques (n=8 par groupe) ont été étudiées après 6 jours de traitement central et chronique de GW4064 dans l'ARC. Les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline ou de 18s. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un Anova two way suivi d'un test Tukey post-hoc. *P < 0.05.

6.2 Utilisation du Tropicifexor, autre agoniste synthétique spécifique de FXR

Nous avons décidé de tester un autre agoniste de FXR, le Tropicifexor (HY-107418, Clinisciences), molécule découverte par des chercheurs de la société Novartis dans le but de traiter les maladies cholestatiques du foie et de la stéatohépatite non-alcoolique (NASH). Il présente aussi l'avantage d'être en étude clinique de phase II pour la NASH, la fibrose hépatique et la cirrhose biliaire primitive. Les objectifs initiaux étaient de réaliser les mêmes expériences faites avec le GW4064. Ceci étant, il convient de souligner que cette partie de travail de thèse, lors de l'utilisation du Tropicifexor, a été fortement perturbée par la crise sanitaire liée au coronavirus COVID19, ayant drastiquement ralenti toute l'activité de recherche au sein du laboratoire (expérimentations *in vivo et ex vivo*, approvisionnements en réactifs de laboratoire, activité en animalerie), ce qui nous a empêché de répliquer l'ensemble des résultats obtenus avec le GW4064.

Afin de déterminer la dose de Tropicifexor à utiliser pour un traitement chronique en ICV, voici la démarche que nous avons suivie : en partant du postulat que le Tropicifexor est 100 fois plus puissant que le GW4064, nous avons sélectionné une dose initiale de Tropicifexor correspondant à la dose finale de GW4064 mais divisée par 100, soit 0,009 mM. Nous avons réalisé un effet/dose *in vivo* avec les doses suivantes D1 = 0,009 mM (aigu) ; D2 = 0,0027

(aigu) ; D3 = 0,081 et D4 = 0,243 mM (chroniques), afin de mettre en évidence des modifications significatives des paramètres étudiés en cages métabolique entre le groupe traité par le Tropicifexor et le groupe traité uniquement par le véhicule DMSO. Parmi les doses testées (D1, D2 puis D3), seule la dose D3 a permis d'obtenir des modifications significatives en cages métaboliques, nous permettant donc d'initier un traitement chronique à cette dose. Ainsi, nos résultats montrent que le traitement ICV chronique de Tropicifexor induit une modification de la plupart des paramètres des cages métaboliques (figure 47), mais, alors que nous constatons des diminutions des paramètres enregistrés sous GW4064, les variations constatées sont plutôt des augmentations avec ce nouvel agoniste utilisé, pour rappel, à 0.081 mM (D3). Ces résultats physiologiques peuvent être corrélés avec l'activabilité spécifique de FXR au niveau de l'hypothalamus, puisque nous constatons, comme avec le GW4064, que les expressions de gènes cible de FXR, SHP et BSEP, sont induites au sein du noyau arqué (figure 46).

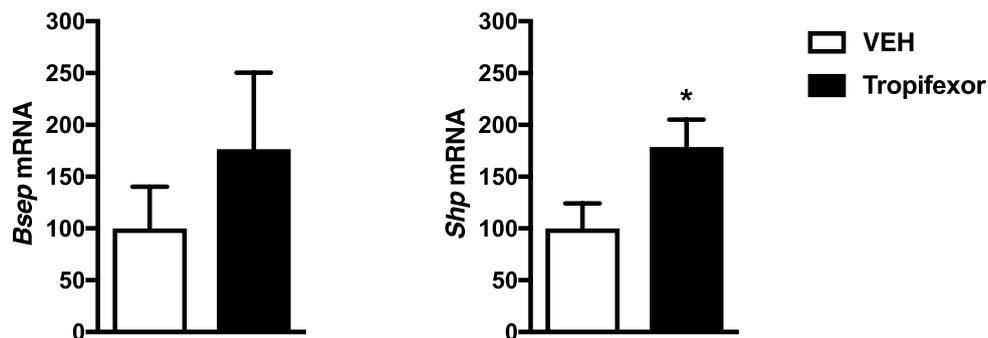


Figure 46: Expression de l'ARNm de Shp et Bsep dans le noyau arqué à la suite de l'administration centrale et chronique de Tropicifexor (D3). Les niveaux d'ARNm indiqués ont été mesurés dans la structure éminence médiane/noyau arqué de l'hypothalamus. Les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student. *P < 0.05

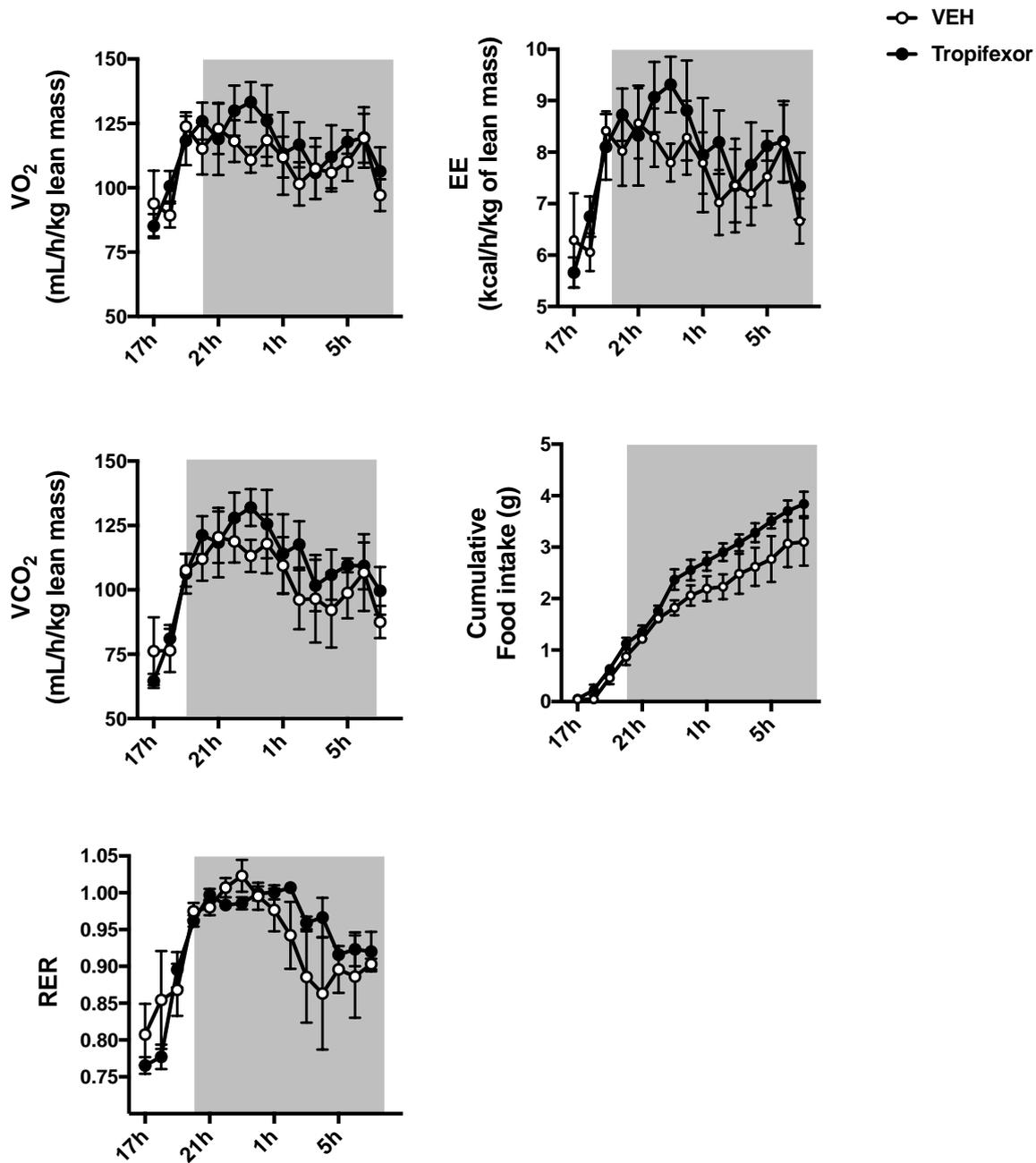


Figure 47: Etude de l'administration centrale et chronique de Tropifexor sur l'homéostasie énergétique en cage métabolique. Données des cages métaboliques après la dernière injection (au 6ème jour d'injection). Les souris ont reçu des injections intracérébroventriculaires (ICV) de Tropifexor à 0.081 mM (D3) ou de son véhicule DMSO une fois par jour pendant 6 jours. Les paramètres suivants ont été mesurés en cages métaboliques : dépense énergétique (EE), consommation d'oxygène par 24 heures (VO₂), consommation de dioxyde de carbone par 24 heures (VCO₂), prise alimentaire cumulative (FI), activité locomotrice par 24 heures (nombre total d'interruptions du faisceau laser par heure), quotient respiratoire par 24 heures (RER), nombre de redressements par 24 heures. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test ANOVA two way suivi d'un Tukey post-hoc, les données étant représentées en moyennes ± SEM.

Afin de corrélérer ces résultats avec ceux observés en périphérie avec le GW4064, l'impact de ce traitement au Tropicifexor sur les fonctionnalités du tissu adipeux brun a été analysé. De manière plus précise, nous avons montré que l'expression protéique de UCP1 diminuait significativement dans le tissu adipeux brun (figure 48). De plus, comme nous l'avions remarqué avec le GW4064, le traitement ICV chronique de Tropicifexor modifie l'histologie du TAB en augmentant la surface des adipocytes bruns, reflétant un remodelage du TAB (figure 49). Néanmoins, aucune différence significative n'a été constatée concernant l'expression de la TH dans le TAB.

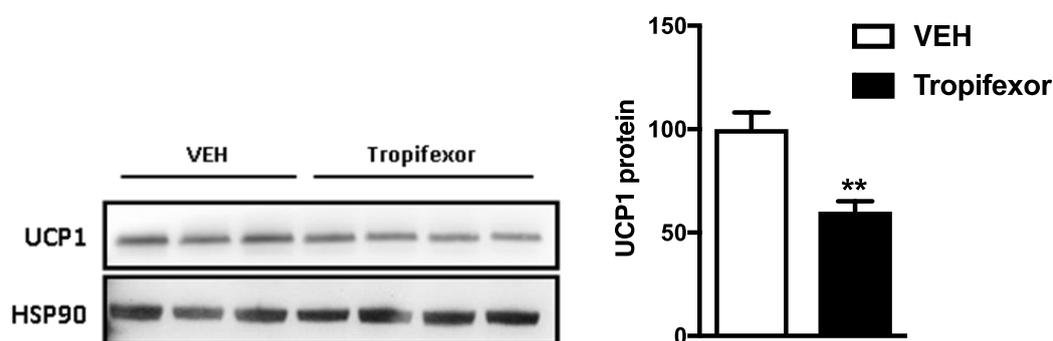


Figure 48: Effets d'un traitement central et chronique de Tropicifexor sur l'expression d'UCP1 dans le tissu adipeux brun (TAB). L'expression d'UCP1 dans le TAB de souris a été étudiée après 6 jours d'administration centrale de Tropicifexor (D3). Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student. ** P < 0.01

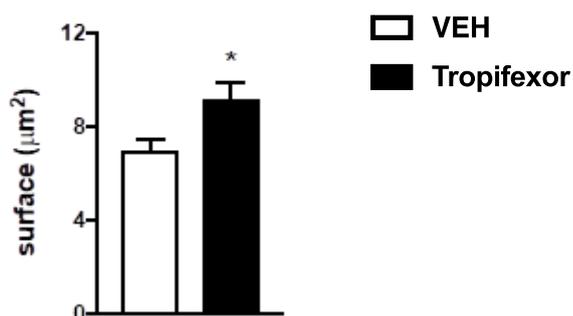


Figure 49 : Effets d'un traitement central et chronique de Tropicifexor (D3) sur l'histologie du tissu adipeux brun (TAB). Les modifications histologiques ont été évaluées dans le TAB de souris après 6 jours d'administration centrale de Tropicifexor. Quantification de la surface des gouttelettes lipidiques. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student. * P < 0.05.

Collectivement, ces résultats récents obtenus avec le Tropicifexor, comparés à ceux du GW4064, mettent en évidence le potentiel d'activation de FXR cérébral par un agoniste pharmacologique spécifique et son impact sur l'homéostasie énergétique. Ces données apportent donc la preuve de concept que le récepteur FXR est un modulateur important du contrôle central de l'homéostasie énergétique, deux molécules chimiquement différentes mais agonistes vis-à-vis de FXR ayant pour finalité la modulation de la thermogénèse liée au tissu adipeux brun. Les mécanismes mis en jeu sont probablement multiples, étant donné l'effet inverse observé en cages métaboliques entre les deux agonistes à la dose D3 d'une part, et l'absence de différence d'expression sur la TH d'autre part. Étant donnée la différence de comportement pharmacocinétique probable entre ces deux molécules, ce qui expliquerait en partie les différences observées, nous avons réitéré l'administration de Tropicifexor en ICV selon deux protocoles différents. Premièrement, étudier la même dose (D3) mais sur une durée plus courte. Malheureusement, cette étude sur une période plus courte n'a pas été contributive, aucune différence significative n'a pu être observée sur les paramètres étudiés. L'autre protocole a consisté à augmenter la dose en la multipliant par trois, soit 0.243 mM. De la même manière que précédemment, nous avons analysé les conséquences physiologiques de cette activation par la mesure des paramètres des souris placées en cages métaboliques (figure 50). À l'image de ce que l'on observait avec le GW4064 (ICV GW4064 chronique à la dose 3), les modifications constatées avec le Tropicifexor à 0.243 mM portent sur la dépense énergétique, VO_2 et VCO_2 , en les diminuant en phase nocturne au bout du 6^{ème} jour. Les souris traitées présentent une diminution de la dépense énergétique sans effet sur la prise alimentaire. De plus, nous constatons une diminution de l'expression de la protéine UCP1 ainsi qu'une augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques dans le TAB, confirmant que l'activation du récepteur FXR cérébral par le Tropicifexor affecte le remodelage du TAB, ceci répliquant nos résultats obtenus avec le GW4064 (figure 51). Par contre, aucune différence significative n'a été constatée concernant l'expression de la TH dans le TAB à cette dose D4.

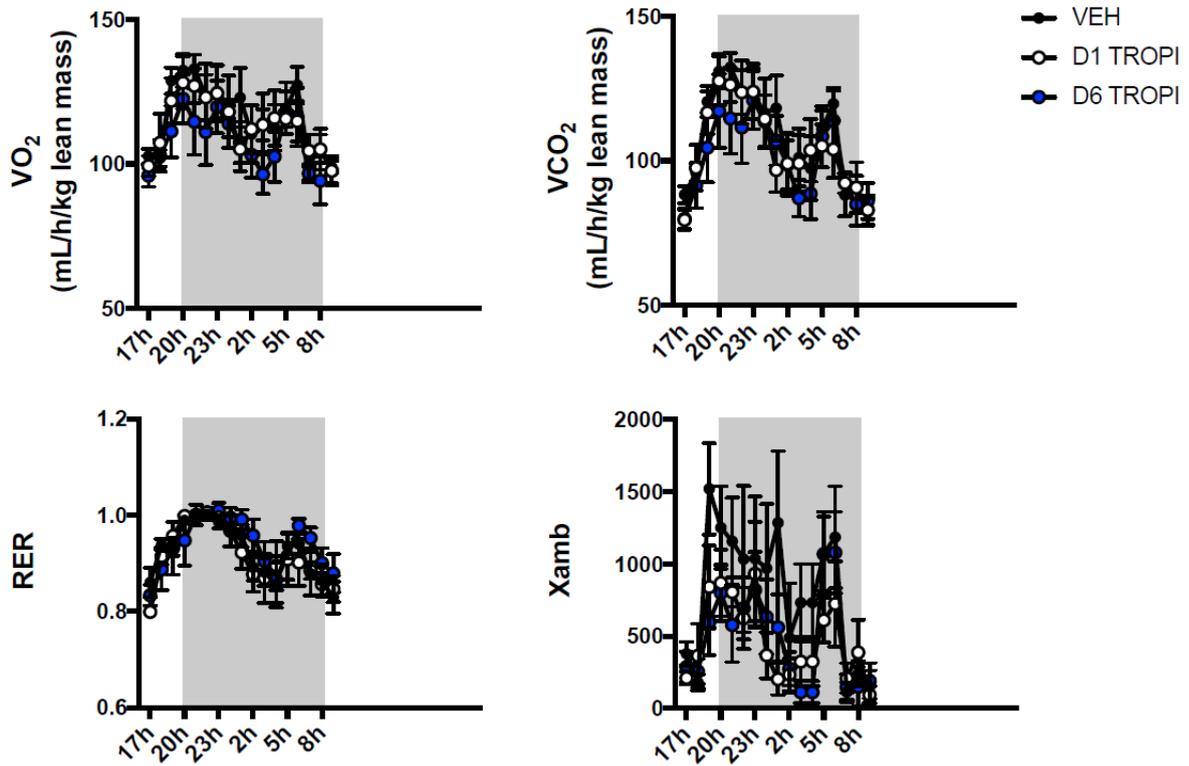


Figure 50: Etude de l'administration centrale et chronique de Tropifexor sur l'homéostasie énergétique lors d'une augmentation de dose. Données des cages métaboliques après la première injection (D1) ou la dernière injection (D6). Les souris ont reçu des injections intracérébroventriculaires (ICV) de Tropifexor à 0.243 mM ou de son véhicule DMSO une fois par jour pendant 6 jours. Les paramètres ont été mesurés en cages métaboliques : consommation d'oxygène par 24 heures (VO₂), consommation de dioxyde de carbone par 24 heures (VCO₂), quotient respiratoire par 24 heures (RER), nombre de mouvements par 24 heures. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test ANOVA two way suivi d'un Tukey post-hoc, les données étant représentées en moyennes ± SEM.

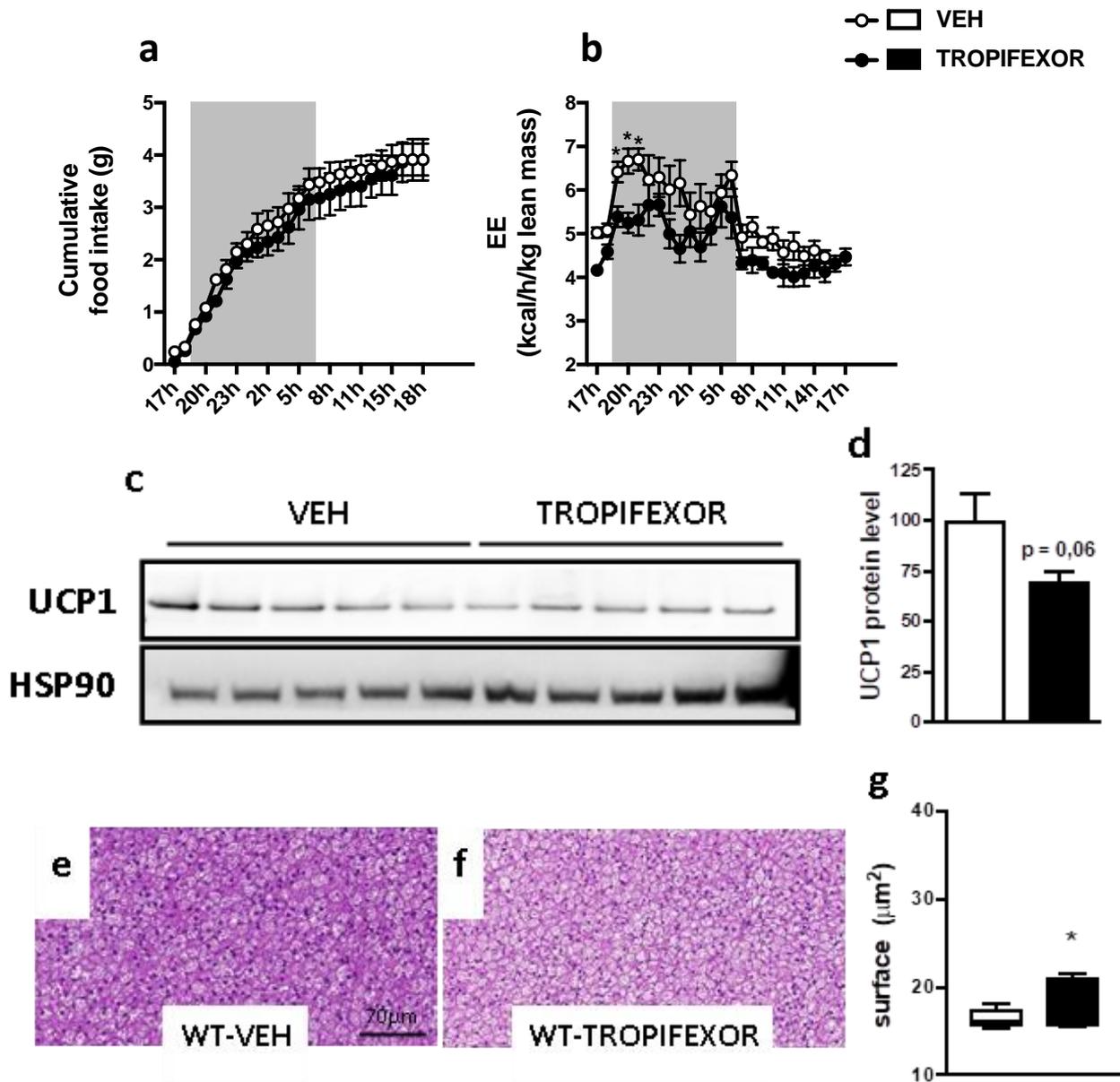


Figure 51: Effets d'une augmentation de dose de Tropicifexor sur les dépenses énergétiques et les fonctionnalités du TAB. (a-b) Données des cages métaboliques après la dernière injection. Les souris ont reçu des injections intracérébroventriculaires (ICV) de Tropicifexor à 0.243 mM ou de son véhicule DMSO une fois par jour pendant 6 jours (n = 5 par groupe). Les paramètres illustrés sont les suivants : dépense énergétique (EE) et prise alimentaire cumulative (FI). (c-d) L'expression d'UCP1 dans le TAB de souris a été étudiée après 6 jours d'administration centrale. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. (e-f-g) Les modifications histologiques ont été évaluées dans le TAB de souris après 6 jours d'administration centrale. La coloration a été effectuée à l'hématoxyline / éosine, suivie d'une quantification de la surface des gouttelettes lipidiques. Les résultats sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec le véhicule DMSO. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student ou ANOVA two way suivi d'un Tukey post-hoc, les données étant représentées en moyennes ± SEM. *P < 0.05

7. Projet connexe

7.1 Etude qualitative et quantitative du pool cérébral d'acides biliaires chez la souris

Surtout étudiés en périphérie pour leur rôle de détergent des lipides alimentaires, puis en tant que molécules de signalisation, les acides biliaires commencent à présent à être décrits au niveau du cerveau, notamment dans des contextes pathologiques où l'accumulation anormale d'acides biliaires périphériques aboutit à l'enrichissement du cerveau en ces molécules. Néanmoins, l'hypothèse d'une présence cérébrale basale d'acides biliaires, dérivés du métabolisme du cholestérol à ce niveau, n'est pas à écarter.

Au cours de ce projet de thèse, nous nous sommes également intéressés à déterminer la composition cérébrale des acides biliaires cérébraux chez des souris saines soumises à un régime standard. De manière exploratoire, afin de détecter et doser les acides biliaires du cerveau murin, nous avons retenu pour cette étude un protocole d'extraction dérivé de celui de Zhang et Klaassen (figure 52) (158). Ces auteurs ayant validé l'extraction des ABs à partir de foie de souris, nous avons mis au point ce protocole pour le cerveau murin et l'avons validé grâce à la méthode des ajouts dosés en AB. Le calcul des rendements d'extraction a été réalisé grâce à la méthode des ajouts dosés, consistant en un ajout de 50 µl contenant tous les ABs à 300 nM dans du méthanol (a). Le dosage des ABs totaux (provenant du cerveau et des ajouts) a été effectué en triplicats, ce qui nous a permis de calculer la concentration moyenne (en nM) avec ajouts dosés (b). Par ailleurs, les ABs provenant uniquement des cerveaux (sans ajouts dosés) ont été dosés en triplicats, ce qui nous a permis de calculer la concentration moyenne (en nM) sans ajouts dosés (c). Les rendements ont été calculés, pour chaque AB, selon la formule: « Rendement d'extraction d'un AB = [(b) – (c)] / (a) ». Nos résultats montrent des rendements d'extraction très satisfaisants, allant de 73% pour le LCA jusque 130% pour le THDCA (figure 53). Les AB étant quantifiés grâce à l'utilisation de standards internes deutérés permettant d'établir les rapports (aire pic analyte) / (aire pic standard interne), les rendements d'extraction ont été calculés selon deux conditions : la première consiste en l'ajout de standards internes au début de l'extraction, au même moment que l'homogénéat tissulaire et les ajouts dosés. La deuxième condition consiste en l'ajout des standards internes une fois l'extraction terminée, juste avant l'étape d'évaporation. Les résultats obtenus dans ces deux conditions sont semblables et présentent une corrélation linéaire significative.

L'effet matrice du tissu après extraction a été évalué en comparant les surfaces des pics de chacun des 5 étalons internes sans aucun AB endogène (absence de tissu cérébral) ni exogène (absence d'ajouts dosés). Le dosage des AB dans ce contrôle négatif n'a retrouvé aucun AB.

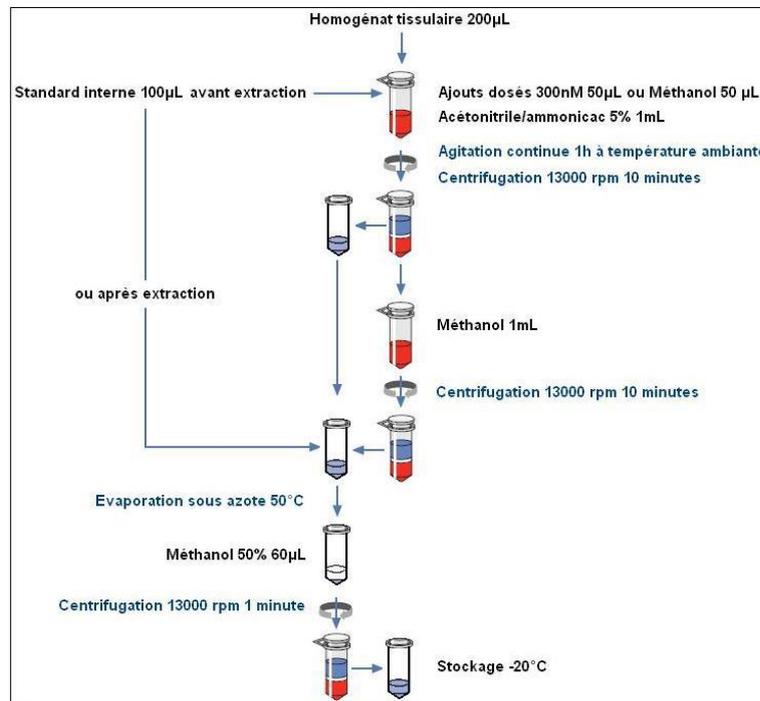


Figure 52: Protocole d'extraction des acides biliés à partir de cerveau murin. Adapté du protocole de Zhang et Klaassen (Zhang et Klaassen, 2010). Le principe repose sur l'utilisation initiale d'une méthode mécanique (broyage) associée à une méthode chimique, notamment par l'utilisation d'acétonitrile, solvant aprotique dipolaire

Acide biliaire	Standard interne avant extraction	Standard interne après extraction
	Rendement (%)	Rendement (%)
CA	94	94
CDCA	90	90
DCA	87	86
LCA	73	79
UDCA	114	108
aMCA	96	91
bMCA	90	85
wMCA	87	85
HCA	103	100
HDCA	109	105
GCA	101	99
GCDCA	97	96
GDCa	80	80
GLCA	106	112
GUDCA	108	100
GHCA	123	119
GHDCA	130	122
TCA	125	125
TCDCa	93	94
TDCA	97	100
TLCA	83	89
TUDCA	124	121
TaMCA	100	92
TbMCA	105	99
TwMCA	111	106
THCA	118	113
THDCA	130	122

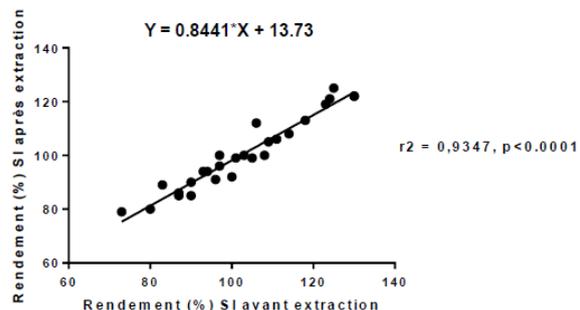


Figure 53 : Comparaison des rendements d'extraction des acides biliés, lors de l'ajout du standard interne avant ou après extraction. Les rendements ont été calculés selon la formule: « Rendement d'extraction d'un acide biliaire = [(b) – (c)] / (a) » où a = ajout de 50 µl contenant tous les ABs à 300 nM dans du méthanol ; b = concentration moyenne (en nM) avec ajouts dosés ; c = concentration moyenne (en nM) sans ajouts dosés

Grâce à la technique d'extraction, et le dosage des échantillons en CL/SM, nous avons retrouvé au sein du cerveau murin (pool de 3 cerveaux totaux murins, souris nourries par régime standard) la présence de 9 ABs, principalement tauroconjugués (figure 54). Le TCA et le T β MCA sont les ABs majoritaires au niveau cérébral. Il convient de souligner le pourcentage important de TBMCA, antagoniste de FXR, et moins représenté (7%), le DCA, un des 3 agonistes les plus puissants pour FXR. Les concentrations des ABs, rapportées au poids de tissu initial, sont comprises entre 2 et 116 fmol/mg.

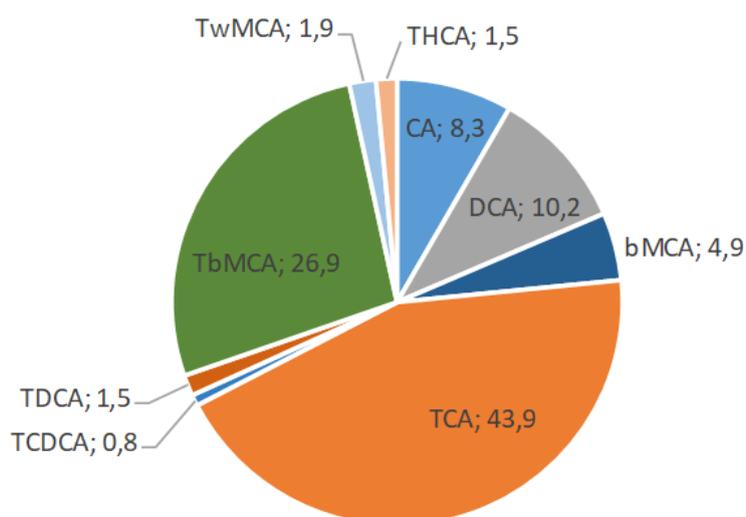


Figure 54: Composition en AB du cerveau murin. Cette évaluation a été réalisée sur un pool de 3 cerveaux totaux murins, les valeurs chiffrées sont mentionnées en termes de pourcentage. Les acides biliaires ont été séparés et dosés par LC-MS/MS.

Nous avons pu récupérer les données d'une étude préliminaire réalisée au laboratoire, concernant la composition plasmatique en AB chez la souris (sur le plasma de souris C57BL6J (n=7) nourries par un régime standard) et chez l'humain (111). L'analyse de ces données, comparées à celles au niveau cérébral, montre une composition cérébrale en AB différente de celle du sang circulant, aussi bien en répartition, en terme de conjugaison et en terme de concentration. Au niveau du plasma murin (figure 55), le β MCA libre a été retrouvé majoritairement (27%), suivi du wMCA libre (23%). Chez l'homme (figure 56), la forme majoritaire dans le sang est constituée par le CDCA conjugué. Cet AB, accompagné du DCA, sont les formes prédominantes et sont également les espèces les plus puissantes pour activer FXR. Le T β MCA, retrouvé dans la partie majoritaire au niveau cérébral murin, n'est représenté qu'en très faible proportion au niveau circulant. Le cerveau murin contient donc un pool d'AB, dont la composition est bien distincte de celle du pool circulant.

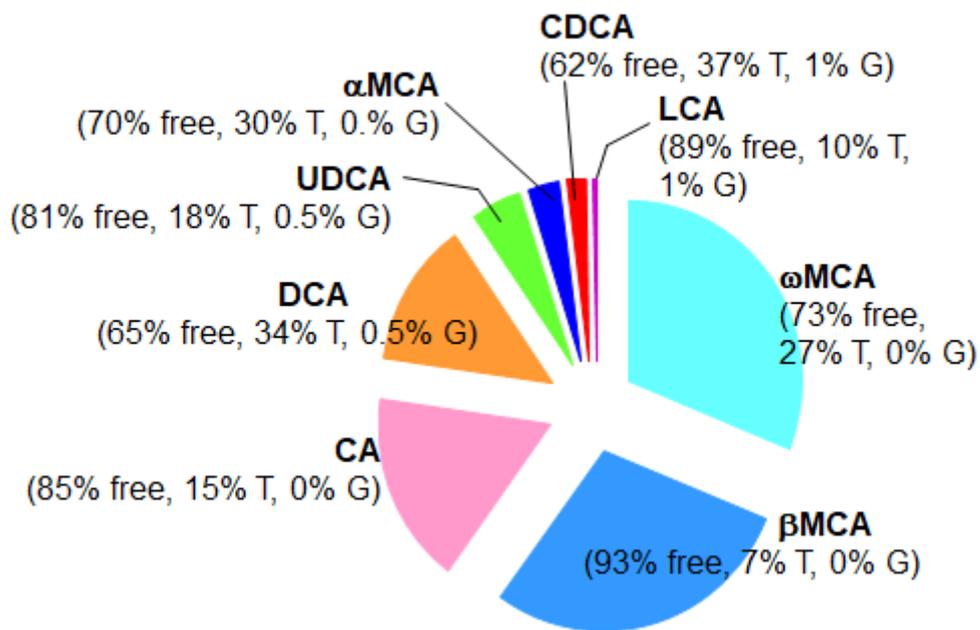


Figure 55: Composition en AB plasma murin. Les acides biliaires ont été séparés et dosés par LC-MS/MS. D'après Prawitt J, Caron S, Staels B. TEM 2014

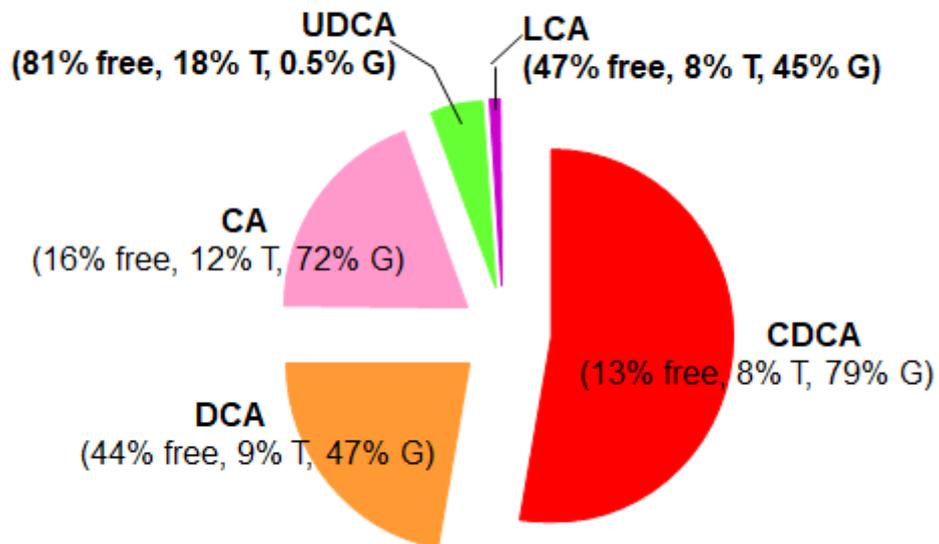


Figure 56: Composition en AB du plasma humain. Les acides biliaires ont été séparés et dosés par LC-MS/MS. D'après Prawitt J, Caron S, Staels B. TEM 2014

Afin de déterminer s'il existe une variabilité de composition cérébrale, nous avons comparé la variabilité inter-individus sur 10 cerveaux totaux de souris mâles C57BL6 après 4 heures de jeûne. Les souris ont été classées en 3 groupes en fonction du nombre d'acides biliaries rencontrés, à savoir : groupe 1 : de 1 à 2 Abs retrouvés, groupe 2 : de 3 à 4 Abs retrouvés en groupe 3 : > 5 Abs retrouvés. Nos résultats (figure 57) montrent de grandes variations entre les individus, probablement liées à la sensibilité de la technique de dosage, à la variation de l'extraction ou alors de manière inhérente à l'animal. Néanmoins, quelque-soit le nombre d'ABs détectés, le TCA est toujours majoritaire, suivi du TβMCA et d'autres tauro-conjugués. Pour le groupe 3, les compositions sont semblables à celle retrouvée lors de l'expérimentation précédente en utilisant un pool de 3 cerveaux.

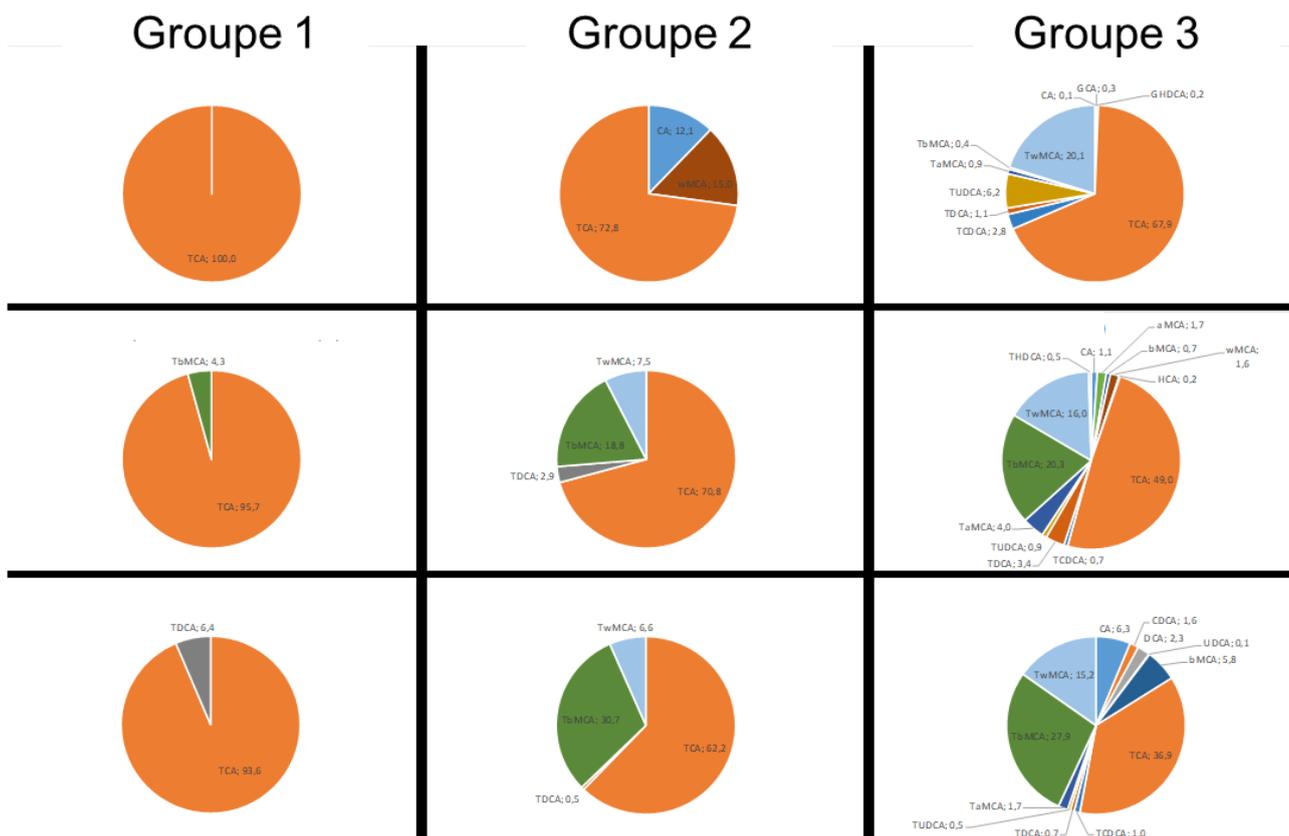


Figure 57: Etude de la variation inter-individus pour la composition en AB du cerveau murin. Cette évaluation a été réalisée sur 10 cerveaux entiers indépendamment, les valeurs chiffrées sont mentionnées en terme de pourcentage. Les acides biliaries (AB) ont été séparés et dosés par LC-MS/MS. Groupe 1 : de 1 à 2 ABs retrouvés, groupe 2 : de 3 à 4 ABs retrouvés, Groupe 3 : > 5 ABs retrouvés

Nous avons ensuite investigué l'existence éventuelle d'une « composition-région spécifique » dans la composition cérébrale des acides biliaires, notamment pour les acides biliaires les plus affins pour FXR pharmacologiquement, en étudiant spécifiquement la composition en ABs de l'hypothalamus. Etant donnée la taille de cette structure, la constitution d'un pool de plusieurs hypothalami a été réalisée pour pallier à d'éventuels problèmes de limites de détection. Au total, 6 souris mâles C57BL6 après 4 heures de jeûne ont été prélevées. Nous retrouvons comme espèce majoritaire le TCA, suivi d'autres espèces tauro-conjuguées : TCA >> TbMCA >> TDCA > TCDCA (figure 58), profil se rapprochant de la composition du cerveau murin total. La composition en ABs des pools d'hypothalamis est donc semblable à la composition retrouvée sur cerveau total. Ceci suggère qu'il n'existe, à priori, pas de zonation cérébrale concernant la composition en acides biliaires.

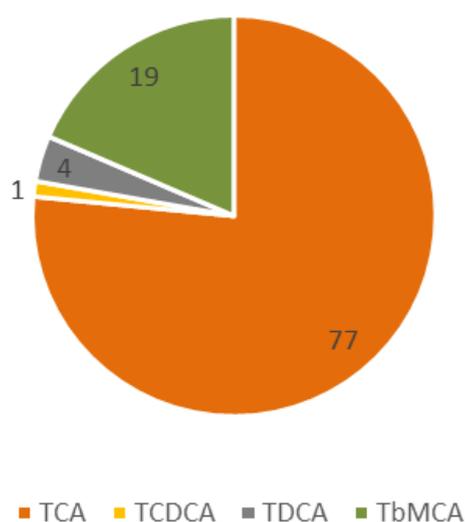


Figure 58 : Composition en AB de l'hypothalamus murin. Cette évaluation a été réalisée sur un pool de 6 hypothalami murins, les valeurs chiffrées sont mentionnées en termes de pourcentage. Les acides biliaires ont été séparés et dosés par LC-MS/MS.

7.2 L'administration ICV chronique de GW4064 modifie les concentrations d'acides biliaries

L'activation du récepteur FXR par un agoniste impacte le métabolisme des acides biliaries. L'activation de son gène cible *SHP* est en effet en mesure de contrôler l'activation ou la répression des cytochromes directement impliqués dans le catabolisme du cholestérol et la synthèse des acides biliaries. Dans ce contexte, il nous a semblé intéressant d'étudier la composition cérébrale du cerveau de souris ayant préalablement reçu en ICV un agoniste de FXR. Nous avons étudié la composition cérébrale en AB après administration ICV de GW4064 en chronique, chez 16 souris mâles C57BL6, après 6 jours de traitement (1inj/jour) de GW4064 ou du véhicule DMSO en ICV. Les 16 cerveaux étaient entiers, analysés en simplicat (figure 59). Le traitement central chronique de GW4064 semble augmenter les quantités d'AB présentes au niveau du cerveau murin, notamment les espèces d'AB libres et tauro-conjuguées (pas d'impact sur les glyco-conjuguées). Nous constatons de ce fait des différences significatives de composition, avec une augmentation franche du CA, DCA et du TbMCA.

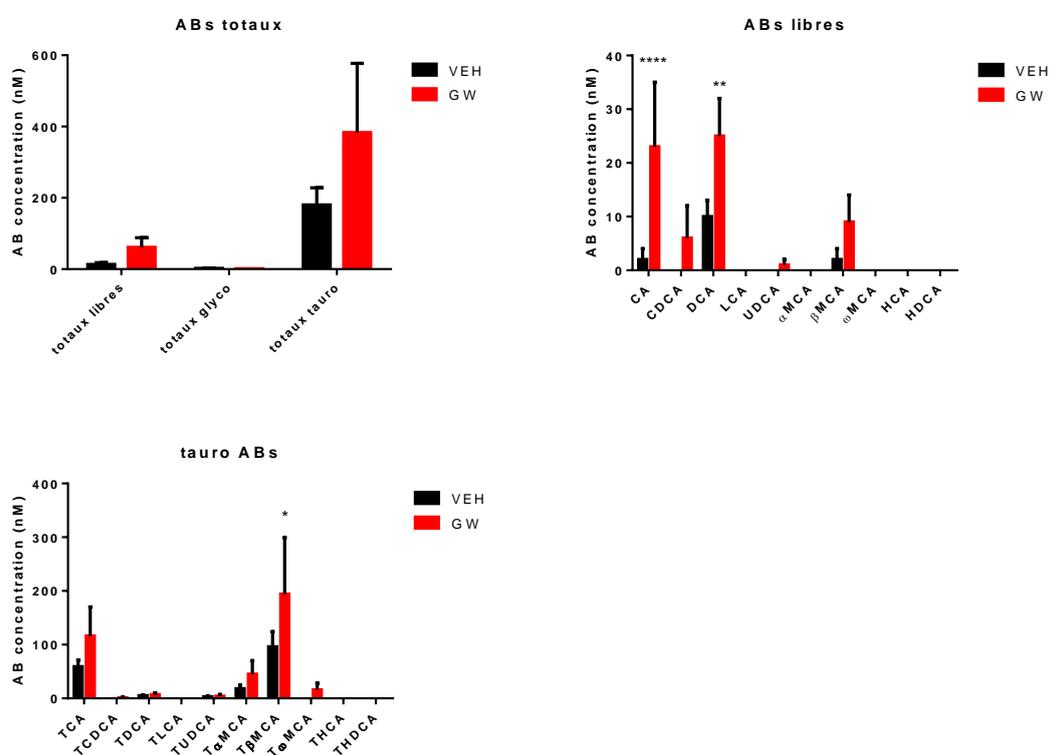


Figure 59: Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur la composition en AB du cerveau murin. Cette évaluation a été réalisée sur 16 cerveaux totaux murins indépendamment. Les acides biliaries ont été séparés et dosés par LC-MS/MS. *P < 0.05, ** P < 0.01, **** P < 0.0001

La même expérimentation a été répliquée, en augmentant l'effectif des souris et en comparant également l'effet potentiel du GW4064 sur les compositions sanguines en ABs. Ainsi, nous avons étudié la composition cérébrale en AB chez 34 souris mâles C57BL6, après 6 jours de traitement (1inj/jour) de GW4064 ou du véhicule DMSO en ICV et la composition sanguine chez 17 souris mâles C57BL6, après 6 jours de traitement (1inj/jour) de GW4064 ou du véhicule DMSO en ICV (figure 60). Au niveau du cerveau, notre travail démontre encore une fois l'effet du GW4064 sur l'augmentation des concentrations des ABs, avec des différences significatives au niveau du CA, bMCA, TCA et TbMCA. Cette même tendance se répercute également sur le sang mais de manière moins prononcée, avec des différences significatives au niveau du CA et du bMCA

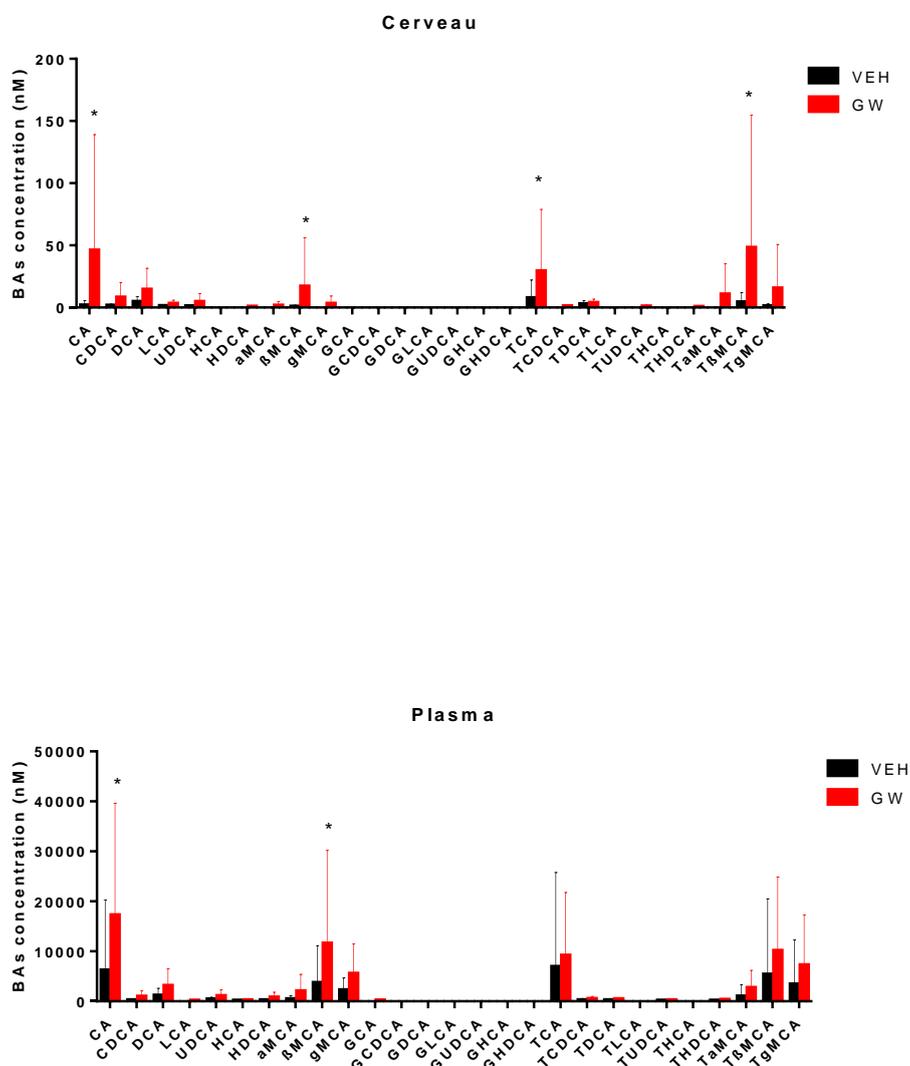


Figure 60 : Effet d'un traitement central (6 jours) de GW4064 sur la composition en AB du plasma et du cerveau murin. Cette évaluation a été réalisée sur 34 cerveaux totaux murins indépendamment pour l'étude cérébrale, et 17 plasmas. Les acides biliaires ont été séparés et dosés par LC-MS/MS. *P < 0.05

DISCUSSION

Le récepteur FXR appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de transcription impliqués dans divers processus tels que le développement, la reproduction ou le métabolisme énergétique. Plusieurs études démontrent que FXR est un acteur important du métabolisme hépatique, régulant les métabolismes glucidiques, lipidiques et des acides biliaires. FXR est un régulateur clé du métabolisme entéro-hépatique. Outre son action sur le métabolisme des acides biliaires, des lipides et du glucose, FXR régule la sensibilité à l'insuline et la sécrétion de GLP1 (64, 167). En outre, la déficience globale en FXR induit une résistance à l'obésité induite par un régime alimentaire ou de manière génétique (147, 148). Son activité hépatique est complétée par celle exercée sur d'autres organes tels que le tissu adipeux, les intestins ou le pancréas, démontrant de ce fait le rôle majeur de FXR dans le contrôle périphérique de l'homéostasie énergétique. Des études récentes au sein du laboratoire ont mis en évidence par hybridation *in situ* et immunofluorescence, la présence du récepteur nucléaire FXR dans différentes zones cérébrales, notamment au niveau hypothalamique, structure clé du contrôle central de l'homéostasie énergétique. A ce jour, quelques études rapportent l'expression de FXR au sein de l'hypothalamus (98, 154).

Alors que le rôle de FXR dans la régulation de l'homéostasie énergétique en périphérie est bien connu, son implication au sein du système nerveux central n'a pas encore été décrite.

Etude des conséquences d'une stimulation centrale aigue de FXR sur le contrôle de l'homéostasie énergétique et l'activation neuronale.

L'utilisation du GW4064, agoniste synthétique spécifique de FXR, chez des souris C57BL6J en administration ICV aigue, réduit la prise alimentaire, la consommation en oxygène, l'activité locomotrice, la dépense énergétique et le quotient respiratoire. Ces modifications de l'homéostasie énergétique par le GW4064, observées par rapport à une référence qu'est l'administration en ICV du véhicule DMSO, apparaissent dose-dépendantes. En effet, en l'absence de référence dans la littérature concernant les doses de GW4064 à administrer par voie ICV, la dose initiale (dose1 : 0.1 mM) a été déterminée par rapport aux doses utilisées lors de travaux antérieurs du laboratoire, consistant en l'administration ICV d'insuline chez la souris. L'objectif était initialement, de manière exploratoire, de se baser sur un « output »

précis : regarder un paramètre au sein des cages métaboliques sans *a priori*. L'absence de différences significatives lors de l'administration de la dose 1 (0.1 mM) par rapport à l'action du véhicule DMSO sur les paramètres de la cage métabolique nous a amené à administrer une seconde dose (D1 x 3), permettant cette fois-ci d'obtenir des modifications significatives. Ces modifications observées avec la dose 2 ont été vérifiées en utilisant une dose 3 (D2 x 3), les modifications étant encore plus significatives par rapport à l'action du DMSO.

Les dépenses énergétiques ont été évaluées grâce à l'équation de Weir tenant compte de la VO_2 et de la VCO_2 . Les dépenses énergétiques sont à la fois dues à l'activité physique des souris (activité locomotrice) mais également au métabolisme énergétique cellulaire, comme le métabolisme oxydatif. Un filtre appliqué sur le calcul de la VO_2 , ciblant uniquement les périodes où les animaux ne bougent pas, nous a permis de constater une diminution de la VO_2 sous GW4064 par rapport celle sous DMSO. Ainsi, cette diminution de la VO_2 sous GW4064, et donc indirectement des dépenses énergétiques, n'est pas expliquée uniquement par la diminution de l'activité locomotrice, nous suggérant de ce fait une action du GW4064 sur le métabolisme cellulaire. Par ailleurs, les travaux de Graham Lusk ont permis d'évaluer l'utilisation des substrats énergétiques en fonction de la valeur du RER (168). Nous avons montré au cours de l'étude en administration aiguë que le GW4064 diminuait les valeurs du RER, suggérant ainsi une utilisation accentuée des lipides par rapport aux glucides, sous GW4064. Quand les souris mangent moins, elles utilisent normalement plus les lipides. Le dosage des acides gras libres serait intéressant à ce niveau pour évaluer une différence entre les souris traitées ou non par le GW4064. Alors que les effets du récepteur FXR en périphérie sont bien décrits, l'implication du récepteur FXR central sur la régulation des métabolismes périphériques est à démontrer.

Lors du suivi régulier des souris en animalerie et lors de leur préhension/contention, les souris nous ont paru de plus en plus calme au fil des jours ayant suivi l'administration des doses croissantes d'agonistes. Cette observation, associée à la diminution de la VO_2 et de l'activité locomotrice, pourrait également être expliquée par un changement dans la balance des activités sympathiques/parasympathiques, médié directement ou indirectement par FXR, et pouvant être évalué par le dosage du polypeptide pancréatique circulant (169). Le dosage de ce dernier a été effectué mais la gamme de mesure proposée et le nombre de tests disponibles dans le coffret de dosage ne nous a pas permis de vérifier nos résultats dont la plupart étaient

« hors gamme ». Cette partie pourrait être complétée par le dosage des catécholamines urinaires ou sanguines, plus significatives, mais également délicates à doser. L'activité sympathique a donc été évaluée indirectement par le dosage de la TH et par des mesures électrophysiologiques. Enfin, afin d'écarter un éventuel effet toxique du GW4064, l'utilisation d'une souris déficiente pour FXR permettrait d'apprécier une éventuelle toxicité intrinsèque de cette molécule en dehors de la stimulation de FXR. Néanmoins, nos expérimentations ultérieures sur les modèles FXR-KO en chronique n'ont pas mis en évidence de toxicité apparente. De plus, nous n'observons pas en aigu d'effet sur le poids, le pelage ou le comportement. De plus, les cycles jour/nuit sont corrects et conservés. Une question intéressante qui mérite d'être posée est comment être certain qu'un effet chronique ne se soit pas installé entre les doses 1, 2 et 3? Nous constatons systématiquement un épuisement de l'effet sur les courbes en cage métabolique au bout de 48h. Il faudrait aussi connaître la demi-vie du GW dans le LCR pour être certain (donnée non connue).

Au cours de l'étude de l'activabilité de FXR et de son activation neuronale, en comparant les deux structures hypothalamiques PVN et ARC, seul le PVN a présenté un marquage C-Fos plus intense chez les souris ayant reçu le GW4064 par rapport à celles ayant reçu le DMSO. Il faut garder à l'esprit que l'évaluation de l'activation neuronale, par l'intermédiaire de la protéine C-Fos, a été effectuée chez des animaux mis à mort 2h30 après une dernière injection d'une dose efficace de GW4064 (dose 3) ou de DMSO. L'absence d'augmentation d'activation neuronale au niveau du noyau arqué pourrait s'expliquer par ce délai, car il est possible que certaines zones soient activées à 2h30 post injection, et d'autres dans des délais plus précoces ou plus tardifs. En effet, C-Fos est un facteur de transcription (380 AA) dont la vitesse de renouvellement est rapide, d'une durée de vie de 30 minutes. Le gène C-Fos appartient à la famille des gènes de réponse précoce, c'est à dire un des premiers gènes s'activant quand la cellule passe de l'état quiescent G0 à un état activé. Son induction est donc très rapide et transitoire. D'après les données de la littérature, le signal d'activation neuronale C-Fos se situe aux alentours de 2h30 pour l'expression protéique.

L'activation neuronale et l'expression génique, localisées au niveau du PVN, est intéressante car le PVN constitue un acteur majeur du contrôle central de l'homéostasie énergétique par l'intermédiaire du système mélanocortine (14, 40). Le PVN contient en effet des neurones exprimant les récepteurs MC4R, récepteurs aux mélanocortines comme l' α MSH. Il constitue

également un centre intégrateur de signaux neuro-endocriniens et du système nerveux autonome, permettant une régulation de processus cardiovasculaires. Ces fonctions médiées par le PVN peuvent expliquer en partie les modifications enregistrées par nos cages métaboliques. Li et al ont par exemple montré que l'activation des récepteurs MC4R au niveau du PVN modulait le tonus sympathique (170). Par ailleurs, certains auteurs ont montré que la stimulation des neurones du PVN pouvait avoir des conséquences sur le rythme respiratoire (171).

Il paraît étrange d'imaginer l'expression concomitante de FXR dans des populations neuronales exprimant des neuropeptides entraînant des réponses alimentaires opposées (exemple à la fois dans les neurones NPY et α MSH), aussi bien dans l'ARC que dans le PVN. Mais pour rappel, le même cas de figure se présente avec l'expression des récepteurs de la leptine/insuline sur les 2 populations pré-citées. FXR est capable de transactivation et de transrepression. Dans les 2 populations, il est possible qu'il y ait des coactivateurs et des corépresseurs activés différemment. Le marquage de type fibrillaire observé au sein du PVN pour FXR et α MSH est probablement un marquage des fibres provenant notamment de l'ARC.

Ayant démontré que le récepteur FXR central était activable et que son activation aigue impacte l'homéostasie énergétique, il nous a semblé pertinent d'étudier son activation chronique, à l'image de la chronicité des traitements pharmacologiques actuels dans la lutte contre les pathologies associées au syndrome métabolique.

Etude de l'activation centrale et chronique (6 jours) de FXR : effets du tonus sympathique sur le TAB.

Nos résultats démontrent que l'activation du FXR cérébral par l'administration ICV de GW4064 modifie l'histologie et les fonctionnalités du TAB par une régulation hypothalamique du tonus sympathique. D'un point de vue mécanistique, étant donnés nos résultats intéressants sur le système nerveux sympathique et les modifications d'expression de la TH à la fois périphérique et centrale, il nous a semblé utile d'investiguer les potentielles voies de régulation en amont de la TH. Dans la littérature, il a été démontré que l'administration périphérique de GW4064 modifie l'expression hépatique de gènes impliqués

dans l'autophagie par le biais de mécanismes impliquant le facteur de transcription CREB (172). Nos données indiquent que l'activation de FXR dans le cerveau agit par un mécanisme similaire : l'inhibition de la voie PKA-CREB dans l'ARC entraîne une diminution de l'expression des gènes cibles de CREB. Bien que nous ayons montré que l'activation pharmacologique centrale de FXR modifie la signalisation PKA-CREB, le mécanisme direct est inconnu et reste à élucider.

Il est important de noter que les changements induits par le GW4064 sont absents chez les souris FXR-KO, ce qui indique et relève la sélectivité/ spécificité du composé. Conformément aux résultats de la littérature selon lesquels le GW4064 active l'expression de *Shp*, un gène cible connu du FXR, dans les cultures neuronales primaires (154), nous avons constaté que le GW4064 administré en ICV induit également ce gène cible *in vivo*, de manière FXR dépendante. Bien que les quantités de GW4064 administrées par ICV soient bien inférieures aux quantités généralement administrées *per os* ou IP, afin d'exclure les effets possibles d'une fuite périphérique de GW4064 après injection ICV, les concentrations plasmatiques de GW4064 ont été mesurées à l'aide d'un système analytique très sensible (chromatographie liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse). Ce test n'a pas révélé de quantité détectable de GW4064 dans le plasma des souris traitées par ICV GW4064 après 6 jours. De plus, aucun des gènes cibles classiques de FXR n'a été trouvé induit dans le foie, ce qui écarte l'hypothèse d'une éventuelle fuite systémique du composé et/ou d'une activation périphérique du FXR. Afin de renforcer l'idée que nos résultats soient FXR dépendants, nous avons au cours de ce travail utilisé un autre agoniste spécifique de FXR, déjà utilisé en clinique chez l'homme, le Tropicifexor. En fonction des doses utilisées, nous avons constaté quelques différences de résultats entre le GW4064 et le Tropicifexor. Des mécanismes compensatoires du système nerveux sympathique peuvent être évoqués afin d'expliquer les différences observées entre les deux agonistes. Il est également important de souligner la différence de comportement pharmacocinétique probable entre ces deux molécules. Le test effet-dose réalisé avec le Tropicifexor illustre en partie cette problématique, avec un effet maximal obtenu de manière plus précoce avec le GW4064 comparativement au Tropicifexor, malgré le fait que le Tropicifexor présente un EC50 beaucoup plus faible (0.2 nM Tropicifexor / 65 nM d'après la littérature). Néanmoins, en augmentant les doses de Tropicifexor, toujours selon le même schéma (dose multipliée par trois, par rapport à la précédente), nous répliquons

nos résultats obtenus avec le GW4064 sur l'homéostasie énergétique ainsi que sur l'expression d'UCP1 et le remodelage du TAB.

Au cours de notre travail, nous avons pu montrer une altération de l'activité adrénergique dans le TAB (via l'expression de TH), ce qui a été confirmé à plus grande échelle par la diminution du tonus sympathique global. Une autre piste intéressante aurait été d'effectuer une dénervation du TAB (afin d'inhiber toute stimulation du SNA) avant administration de GW4064 et de comparer les résultats avec des souris ayant un SNA intact à ce niveau. Nos mesures en cages métaboliques n'ont pas permis de mesurer et d'évaluer les conséquences éventuelles d'un déséquilibre de l'activité du système nerveux autonome sur les grandes fonctions cardiovasculaires (fréquence cardiaque, contractilité, pression artérielle). Néanmoins, sous 6 jours de GW4064, nous avons pu observer de légers effets inverses entre la diminution de la consommation d'oxygène et l'augmentation de la consommation de dioxyde de carbone la nuit. Nous pouvons penser que les troubles du contrôle sympathique provoquent des altérations de la consommation d'oxygène / dioxyde de carbone, ce qui renforce la pertinence de ce résultat. En effet, certaines études ont montré que la modulation pharmacologique des récepteurs adrénergiques, via des médicaments bloquant les récepteurs adrénergiques ou des agonistes adrénergiques directement, pouvait moduler l'absorption/consommation de ces gaz (173–176). De façon opposée, certains auteurs ont montré que les modulateurs du système nerveux sympathique n'ont pas nécessairement d'effets cardiovasculaires indésirables, ce qui pourrait être le cas pour notre médicament et notre protocole d'administration (177).

Etude de l'activation centrale FXR : un traitement chronique plus long ?

Les effets biologiques et physiologiques observés dans cette étude sont significatifs mais faibles car les animaux ont été traités pendant une courte période. En effet, l'activation pharmacologique de FXR cérébral étant encore mal connue, l'objectif initial était, de manière exploratoire, d'observer si l'activation de ce récepteur nucléaire pouvait ou non avoir un effet sur l'homéostasie énergétique, quelle que soit sa nature, en supposant qu'elle puisse également être toxique à long terme et entraîner un taux de létalité important. Au vu des résultats obtenus, il serait intéressant de prolonger la durée de l'étude afin d'évaluer si 1) les effets restent stables et 2) un phénotype particulier s'installe, notamment lié à la réduction de la

dépense énergétique et au dysfonctionnement du TAB. Il peut y avoir certaines limites au traitement à long terme. Tout d'abord, l'administration du médicament par injection ICV est invasive, et une étude à long terme visant à déterminer si l'activation de FXR cérébral provoque l'obésité chez les souris est difficile à réaliser de cette manière. L'utilisation d'une pompe osmotique avec administration continue du médicament peut convenir à un traitement à plus long terme. Cependant, il n'est pas certain que les effets observés au cours du traitement subchronique de 6 jours soient transférables à un traitement chronique plus long où la souris serait constamment imprégnée du médicament en dose continue. Deuxièmement, comme les récepteurs nucléaires ont la capacité de mettre en œuvre deux mécanismes d'action, génomique et non génomique, nous pouvons penser que les effets aigus, subchroniques ou chroniques à long terme (avec une administration continue) peuvent présenter des différences majeures, car les actions génomiques contrôlent l'expression des gènes en influençant le taux de transcription et les actions non génomiques se produisent rapidement et indépendamment de la régulation transcriptionnelle. Tout d'abord, afin de relier les modifications avec les éléments mentionnés ci-dessus, puisque VO_2 et VCO_2 interviennent dans le calcul du RER (rapport d'échange respiratoire), l'étude de l'activation pharmacologique de FXR sur une plus longue période pourrait révéler un impact sur l'utilisation préférentielle des substrats. Par exemple, un RER plus faible peut suggérer une modification de l'utilisation des substrats : les acides gras sont métabolisés de préférence au glucose, ce qui diminue le RER.

Ensuite, une étude sur une plus longue période aurait probablement permis d'observer l'installation à la fois de conséquences directement liées à l'altération de l'axe TH-adrénergique sur le cœur ou le tissu adipeux blanc, mais aussi d'un phénotype métabolique particulier lié à la diminution de la dépense énergétique (obésité par exemple). La même stratégie pourrait être mise en œuvre avec des souris obèses induites par le régime alimentaire et traitées par un antagoniste ou un agoniste du FXR.

La modulation de l'activité du récepteur FXR central modifie les fonctionnalités du TAB : une piste thérapeutique potentielle ?

L'intérêt translationnel en question serait *in fine* de déterminer si FXR cérébral contribue à l'obésité. Ceci est corroboré par nos observations de remodelage histologique du TAB, il est bien connu que le blanchiment de ce type de tissu adipeux est lié au développement de l'obésité. Les modifications histologiques du TAB, en l'occurrence une clarification du TAB, en lien avec la modification d'expression de *Vegf*, peuvent faire évoquer un début de blanchiment (whitening) du TAB. A la suite des traitements pharmacologiques au GW4064 ou Tropicifexor, nous avons constaté une modification histologique du TAB. Ceci pourrait s'expliquer par une augmentation du volume des vacuoles lipidiques, les cellules apparaissant plus claires puisque les mitochondries sont en volume relatif diminué par rapport aux triglycérides. Par contre les vésicules ne sont pas fusionnées comme dans un adipocyte uniloculaire mature, renforçant l'idée selon laquelle nous sommes sur une étape de transition.

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'activation du TAB semble présenter des avantages métaboliques évidents, activant la thermogénèse qui est un des éléments de la dépense énergétique. Des stratégies thérapeutiques découlant de nos résultats de thèse seraient, en raison de la quantité relativement faible de TAB chez l'homme adulte, de réaliser en toute sécurité et de manière chronique l'expansion et l'activation du TAB dans la lutte contre l'obésité. À ce jour, il existe des méthodes naturelles pour activer le TAB chez l'homme : réduire la température ambiante de la pièce ou utiliser une combinaison refroidie (178). De manière pharmacologique, comme l'activation du TAB dépend de l'activation adrénergique de ses récepteurs de surface, les sympathomimétiques présentent également un intérêt dans l'activation du TAB chez l'homme (179). Nous pouvons également citer l'action des hormones thyroïdiennes (180) ou des agonistes de PPAR γ (181). Au vu de nos résultats, il semblerait intéressant d'effectuer un antagonisme du récepteur nucléaire FXR central afin d'avoir l'effet inverse que celui que nous décrivons, c'est-à-dire une augmentation d'expression d'UCP1 et des fonctionnalités du TAB. Cet antagonisme pourrait logiquement s'effectuer par une administration de TBMCA, mais, de manière plus sélective et plus puissante, par un agent pharmacologique spécialement développé pour cela, à l'image du Tropicifexor. Cette voie thérapeutique serait très intéressante, puisqu'elle n'entraînerait pas d'effets indésirables provoqués par les sympathomimétiques (tachycardie, hypertension). Un

autre problème potentiel lors d'une activation chronique du TAB de manière pharmacologique, à température ambiante ou au-dessus de la thermoneutralité, serait de savoir comment dissiper la chaleur pour éviter une hyperthermie, phénomène décrit par certains auteurs lors d'usages de drogues telles que les amphétamines (182). Les voies de recherche portant sur le récepteur nucléaire FXR central devront donc prendre en considération cet aspect, en essayant d'obtenir une activation du TAB la plus sélective et la plus sûre possible. L'activation chronique du TAB, entraînant une augmentation des dépenses énergétiques, est susceptible de provoquer une réponse hyperphagique compensatoire. Encore une fois, la recherche en pharmacologie de ce traitement médié par FXR central devra prendre en considération cet élément, en essayant de limiter autant que faire se peut ce mécanisme de compensation ou en imaginant une formule combinée avec une molécule réduisant l'appétit.

Enfin, il faut à garder à l'esprit que, dans un contexte où la balance de l'homéostasie énergétique est plutôt dans le sens d'un bilan énergétique négatif, c'est-à-dire une dépense énergétique exagérée entraînant anorexie et cachexie, il pourrait être utile de freiner l'activation du TAB. Le lien entre activation du TAB et le syndrome de cachexie associé au cancer a déjà été décrit (183), la réduction de la prise alimentaire et de l'appétit n'étant pas les seuls mécanismes conduisant à la perte de poids. Il a en effet été décrit dans ces contextes une altération de régulation de facteurs de transcription régulant les métabolismes des lipides et de la thermogénèse dans le TAB. A cela s'ajoute un phénomène bien connu, l'état inflammatoire du patient dans un contexte tumoral. La cytokine inflammatoire, IL-6, peut en effet favoriser la thermogénèse par une action directe sur le TAB ou indirectement via le système nerveux sympathique, et certaines études cliniques établissent un lien entre le cancer associé à la cachexie, les cytokines inflammatoires et la fièvre, par exemple chez les patients atteints de leucémie ou lymphome de type B. Des molécules telles que le Tropicexor, freinant l'activation du TAB, associées à des traitements généraux anti-inflammatoires, pourraient donc avoir leur place en oncologie (184, 185).

Compte tenu de l'expression de FXR au niveau cérébral, FXR pourrait exercer ses activités de régulation centrale de l'homéostasie énergétique par l'intermédiaire de sa liaison avec ses ligands endogènes que sont les acides biliaires.

Etude qualitative et quantitative du pool cérébral d'acides biliaires chez la souris.

Le protocole d'extraction mis au point pour cette étude suivi de la séparation et du dosage en LC/MS-MS permettent la séparation et le dosage théorique de 27 acides biliaires au niveau cérébral. Nos résultats montrent des rendements d'extraction très satisfaisants, allant de 73% pour le LCA jusque 130% pour le THDCA. Les rendements dont la valeur est supérieure à 100% peuvent s'expliquer par le fait que la valeur de l'ajout dosé (300nM) est théorique, ceci étant due à l'incertitude de mesure, et peut de ce fait varier légèrement, à la hausse ou à la baisse, entre les acides biliaires. De plus, le standard interne, permettant la quantification des acides biliaires, ajouté au début de l'extraction ou à la fin, est extrait de la même manière, les résultats obtenus dans ces deux conditions étant semblables et présentant une corrélation linéaire significative.

Dans la littérature, la présence d'acides biliaires au niveau cérébral a été mentionnée par certains auteurs (138, 155–157), ne retrouvant qu'un faible nombre d'acides biliaires libres. Des études antérieures au niveau de la plateforme d'analyse du CUMA ont eu pour objectif d'optimiser les performances analytiques, dont les buts principaux étaient : la séparation de tous les acides biliaires, l'obtention de pics les plus étroits possibles et un délai total d'analyse court. Sur les 27 acides biliaires séparables et quantifiables, nos résultats retrouvent une présence de 9 acides biliaires, libres ou conjugués, dans l'homogénat de tissu cérébral provenant des souris C57BL6J. Leurs concentrations, exprimées en fmol/mg, sont du même ordre de grandeur que celles quantifiées dans l'étude de Mano et al, chez le rat en condition physiologique. Ce nombre d'acides biliaires retrouvé, bien que plus important que ceux retrouvés dans d'autres publications, est peut-être sous-estimé en raison de la limite de quantification de la technique de dosage pour certaines espèces d'acides biliaires.

L'origine de ces acides biliaires à l'état physiologique reste encore inconnue, aucune publication n'ayant encore vraiment mis en évidence une synthèse intra-cérébrale d'acides biliaires. Cette présence peut en effet être due à un passage des acides biliaires circulants par voie sanguine par l'intermédiaire de la carotide, ou une traversée de la barrière hémato-encéphalique, voie de passage démontrée en conditions pathologique chez le rat dans des expériences mimant une cholestase (138). D'ailleurs, comme décrit précédemment, nous avons confirmé l'expression de BSEP au niveau du cerveau au cours de nos expérimentations en ICV. BSEP (Bile Salt Export Pump) étant un transporteur d'acides biliaires, une question intéressante serait de s'interroger sur son rôle sur le contrôle de base du métabolisme des

acides biliaires (186) : BSEP fonctionne dans quel sens ? Joue-t-il un rôle de pompe des ABs cérébraux vers le sang ou l'inverse ?

La synthèse intracérébrale d'acides biliaires est pourtant en théorie possible, car il existe les éléments nécessaires à la fabrication des acides biliaires dans le cerveau à partir du cholestérol. En effet, leur synthèse comprend une succession de réactions enzymatiques d'hydroxylation du cholestérol au niveau du réticulum endoplasmique, et de raccourcissement de sa chaîne latérale située sur le carbone en position 17, permettant l'obtention d'une molécule à 24 atomes de carbone. Les acides biliaires primaires sont définis comme étant les produits directement issus de ces modifications enzymatiques à partir du cholestérol, faisant intervenir des enzymes du complexe cytochrome P450, telles que Cyp7A1, Cyp8B1 et Cyp27A1. La présence de ces cytochromes au niveau cérébral a déjà été décrite par certains auteurs (156, 157) et vérifiée au cours de notre travail par un test d'efficacité en qPCR portant sur Cyp8B1 et Cyp27A1. De plus, nous avons comparé le pool cérébral d'acides biliaires à celui retrouvé au niveau sanguin dans une étude antérieure. Nous retrouvons deux profils différents, tant au niveau de la composition (proportions relatives, formes libres et conjuguées) qu'au niveau du rapport de concentrations, suggérant ainsi une potentielle synthèse intra-cérébrale plutôt qu'une infiltration d'origine sanguine. Les acides biliaires les plus représentés dans nos cerveaux de souris à l'état basal, sans stimulation pharmacologique, comprennent, selon cet ordre d'importance, TCA > TBMCA > DCA > CA. Les ABs CA, TCA, et DCA ont pharmacologiquement des affinités élevées pour le récepteur aux acides biliaires TGR5 mais des affinités très faibles pour FXR. Ceci sous-entend qu'à l'état basal, le récepteur TGR5 cérébral est préférentiellement activé par rapport à FXR. Nous retrouvons également un pourcentage conséquent en TBMCA, ayant des effets antagonistes vis à vis de FXR (114). Ce dernier résultat est en soi très intéressant, car la modulation des concentrations de ce dernier pourrait également expliquer une partie des résultats observés au cours de notre travail ($IC_{50} = 40 \mu M$). Enfin, il convient également de souligner que nos résultats de dosages d'acides biliaires n'ont été effectués que chez des souris mâles, il semble en effet exister une influence du genre concernant la composition en acides biliaires (187). De plus, les souris ont été mises à mort en journée : bien qu'elles aient accès à la nourriture quel que soit l'horaire, nous ne maîtrisons pas le jeun ou le post prandial dans nos dosages d'acides biliaires.

Une autre piste translationnelle soulignant la pertinence physiologique de nos observations seraient l'impact de la modulation pharmacologique centrale de FXR sur le métabolisme des acides biliaires. Bien qu'il ait été rapporté que les acides biliaires perméabilisent la barrière hémato-encéphalique après une ligature du canal biliaire (138) lorsque les niveaux sériques d'acides biliaires sont augmentés à des niveaux pathologiques, dans des conditions physiques normales, les acides biliaires sont très faibles dans la circulation car ils sont rapidement transportés dans le foie. Dans notre travail, nous avons constaté que, dans les conditions basales, la plupart des acides biliaires présents dans le cerveau des souris sont tauro-conjugués avec le TBMCA comme acide biliaire bien représenté, cet acide biliaire ayant un comportement antagoniste vis-à-vis du FXR, alors que les espèces agonistes sont finalement peu représentées. De manière intéressante, un traitement de 6 jours avec le GW4064 augmente significativement le CA (acide cholique) et plus largement les espèces tauro-conjuguées dans le sang et le cerveau, en particulier le TBMCA. Comme l'activation de FXR dans le foie est plutôt en faveur de la répression de la synthèse des acides biliaires, induisant l'expression de *SHP* qui un répresseur connu de l'expression de *CYP7a1* (188), cela renforce l'idée que les modulations observées des concentrations d'acides biliaires et plus largement l'ensemble des effets décrits ne sont pas dus à la stimulation du FXR périphérique mais plutôt du FXR central.

Le cerveau exerçant un contrôle neuronal, hormonal et circadien sur l'homéostasie des ABs et du microbiote (116), le dialogue entre le cerveau et son récepteur FXR, le foie et l'intestin avec comme messagers les acides biliaires, constitue une piste translationnelle intéressante à explorer dans le traitement des maladies métaboliques, à l'image de ce qui est décrit avec un autre groupe de biomolécules appelées entérosynes, de natures et d'origines diverses mais ayant la capacité de cibler des neurones entériques, de réguler leur activité et de contrôler les processus de communication entre l'intestin et le cerveau (189).

Il est important de souligner qu'un autre récepteur, le récepteur membranaire aux ABs : TGR5, est également exprimé dans le TAB mais aussi dans le cerveau. N'existe-il pas un biais et des effets croisés concernant nos résultats obtenus avec le GW4064 et les acides biliaires ? Nous avons vérifié que le récepteur FXR quant à lui n'était pas exprimé au sein du TAB par analyse Western Blot, confirmant des rapports précédents (190). De plus, le GW4064 n'a aucune activité sur TGR5, ce qui exclut des éventuels effets croisés (140).

De manière plus globale, il aurait été intéressant de supprimer toute expression de FXR dans les tissus adipeux par technique « adiponectin/Cre ; aP2-Cre », et de regarder les effets sur le TAB lors d'administration d'agoniste de FXR. Une même expérimentation pourrait être envisagée à l'aide de la neurotoxine 6 hydroxydopamine afin de supprimer les terminaisons nerveuses adrénérgiques.

Mais qu'en est-il de la modulation des ABs observée dans nos résultats ?

Une étude récente a rapporté que l'administration cérébrale de l'acide tauro-lithocholique (LCA) favorise l'oxydation des graisses, diminue la masse grasse associée à une augmentation de l'absorption des acides gras par le TAB et favorise le brunissement du tissu adipeux blanc sous-cutané (191). Comme le LCA est un agoniste spécifique du TGR5, sans activité sur FXR, ces observations suggèrent des fonctions opposées du récepteur membranaire TGR5 et du récepteur nucléaire FXR. Cette étude a également démontré que le GW4064 en ICV (10 μ M en concentration finale dans le liquide céphalo-rachidien) ne modulait pas le métabolisme énergétique. Leurs résultats opposés aux nôtres peuvent être expliqués par la dose utilisée, nous utilisons une dose trois fois supérieure à celle utilisée par Eggink et al. Un autre article de l'équipe de Castellanos-Jankiewicz (192) montre que l'activation hypothalamique de TGR5 par un mélange d'ABS augmente l'activité du système nerveux sympathique et de la dépense énergétique, alors que nos résultats démontrent que l'activation hypothalamique de FXR induit une diminution de l'activité du système nerveux sympathique conduisant à une diminution de la dépense énergétique. Le mélange d'ABS utilisé par ces auteurs est constitué de CA, TCA, GCA, DCA avec des affinités élevées pour TGR5 mais des affinités très faibles pour FXR. Cela implique que les effets observés dans cette étude ne sont probablement pas liés à FXR.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le travail réalisé au cours cette thèse de science s'inscrit dans le cadre d'un projet visant à étudier le rôle du récepteur nucléaire FXR dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique. Ce dernier a été très étudié depuis plusieurs années dans différents aspects du métabolisme en périphérie mais son rôle central est resté inconnu. Même si des arguments bibliographiques et expérimentaux pouvaient suggérer l'implication possible de FXR dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique, au début de ce travail très peu choses étaient connues concernant l'expression centrale de FXR et encore moins sur sa possible activation centrale. Notre étude a apporté la preuve de concept selon laquelle le récepteur FXR central est un régulateur majeur de l'homéostasie énergétique.

Une perspective fondamentale à ce projet, déjà amorcée et décrite au cours de ce travail, est la preuve formelle que les effets observés soient FXR dépendants. Afin de répondre à cet objectif ultime, un modèle conditionnellement et spécifiquement délété pour FXR au niveau neuronal a été développé par l'équipe du laboratoire. L'objectif de ce développement consiste à établir formellement le rôle de FXR cérébral, et plus précisément celui de l'hypothalamus, pour les effets observés sur l'homéostasie énergétique suite aux administrations ICV du GW4064. Pour ce faire, notre équipe a injecté par stéréotaxie au sein de l'hypothalamus médiobasal de souris FXR flox/flox un AAV2/9 codant pour la CRE recombinase couplée à la protéine fluorescente GFP. Afin de valider le modèle précédemment décrit, une vérification par PCR quantitative a été entreprise afin de vérifier la réalité de la délétion conditionnelle dans l'hypothalamus. Les résultats montrent une diminution de 30% de l'expression de FXR au sein du noyau arqué hypothalamique, chez les souris FXR flox/flox préalablement injectées au niveau de l'hypothalamus avec l'AAV CRE (AA9-CMV-CRE-GFP), par rapport aux souris contrôle ayant reçu un AAV contrôle. Même si la diminution n'est pas totale, ceci apporte un élément de preuve, validant ce modèle (figure 61).

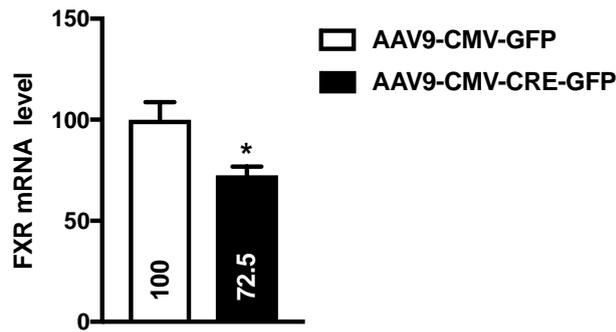


Figure 61: Expression de l'ARNm de FXR dans le noyau arqué dans le cadre du développement du modèle FXR-KO spécifique. Les niveaux d'ARNm indiqués ont été mesurés dans la structure éminence médiane/noyau arqué de l'hypothalamus. Les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline. Les résultats des souris FXR flox/flox préalablement injectées au niveau de l'hypothalamus avec l'AAV CRE sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec les souris ayant reçu un AAV contrôle, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student. *P < 0.05

Afin de renforcer la robustesse des résultats, un contrôle de zone a été réalisé en répétant cette étape de PCR dans une zone différente du cerveau, en l'occurrence le striatum. Les résultats ne montrent aucune différence significative entre les deux groupes de souris, validant donc la zonation de la délétion de FXR au sein de l'hypothalamus (figure 62).

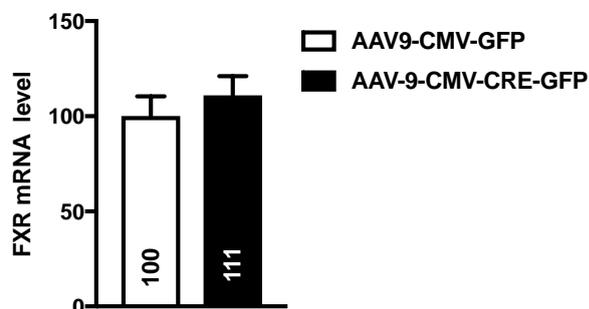


Figure 62: Expression de l'ARNm de FXR dans le striatum dans le cadre du développement du modèle FXR-KO spécifique. Les niveaux d'ARNm indiqués ont été mesurés dans le striatum. Les valeurs ont été normalisées par rapport à celles de la cyclophiline. Les résultats des souris FXR flox/flox préalablement injectées au niveau de l'hypothalamus avec l'AAV CRE sont exprimés (moyennes +/- SEM) par rapport à ceux obtenus avec les souris ayant reçu un AAV contrôle, dont le niveau d'expression a été fixé arbitrairement à 100%. Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test de Student.

Une fois ces contrôles effectués, notre équipe a caractérisé le phénotype de ce nouveau modèle en cages métaboliques, en l'absence de tout traitement activateur de FXR. En effet, puisque le SNC contient potentiellement des ligands endogènes de FXR, il est possible d'évaluer le rôle de l'activation tonique de FXR hypothalamique par ses ligands endogènes en comparant, au niveau basal, les différences éventuelles de l'homéostasie énergétique entre les

souris hypothalamus-floxées et les contrôles, avant injection de GW4064. Les deux groupes de souris précédents ont été placés en cages métaboliques pendant 5 jours au cours desquels ont été enregistrés les différents paramètres de l'homéostasie énergétique. L'ensemble des paramètres étudiés semble être impactée, avec notamment une diminution des dépenses énergétiques ainsi qu'une augmentation de la prise alimentaire (figure 63).

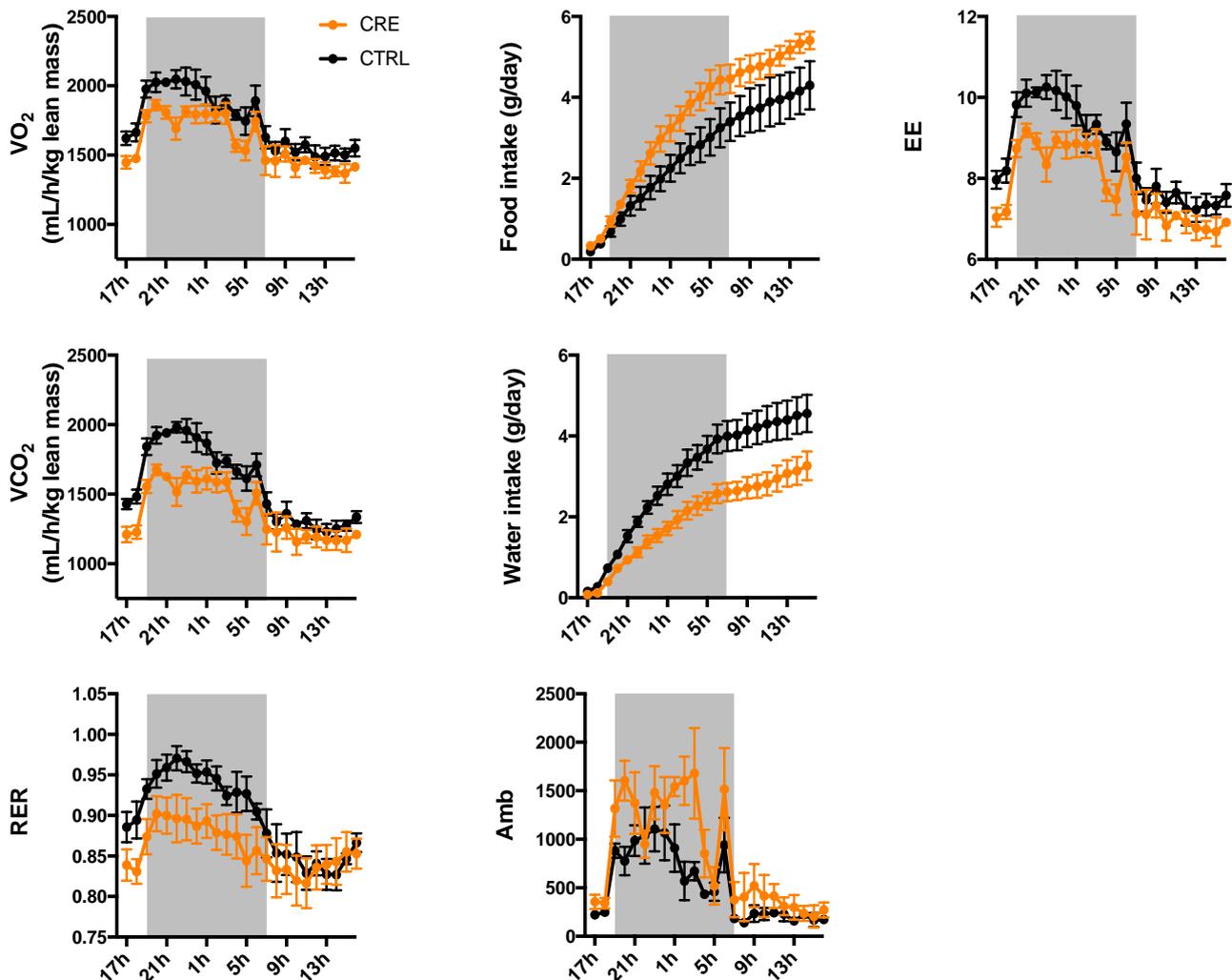


Figure 63 : Suivi des paramètres de l'homéostasie énergétique chez des souris FXR flox/flox préalablement injectées au niveau de l'hypothalamus avec l'AAV CRE. Données des cages métaboliques, représentation de la moyenne des données sur 5 jours: consommation en oxygène (VO₂), consommation en dioxyde de carbone (VCO₂), prise alimentaire (FI), hydratation (WI), dépenses énergétiques (EE), quotient respiratoire (RER), activité locomotrice (Amb). Les analyses statistiques ont été effectuées grâce à un test ANOVA two way, les données étant représentées en moyennes ± SEM.

Ces recherches issues du modèle spécifiquement invalidé pour FXR au niveau neuronal pourraient être poursuivies afin de répondre à l'objectif de « FXR-dépendance » des effets décrits dans ce manuscrit mais également pour continuer à décrire la physiologie de ce modèle en condition basale. De plus, il convient de souligner que ces résultats préliminaires liés à ce nouveau modèle ont été obtenus également lors de la crise sanitaire liée au coronavirus COVID19, ayant perturbé la poursuite des investigations.

Nos résultats ouvrent la voie à d'autres investigations sur le rôle régulateur du FXR dans la communication entre le cerveau et les organes périphériques et le contrôle du métabolisme énergétique. Des études sur le rôle de l'activation tonique de FXR hypothalamique par ses ligands endogènes dans des conditions physiologiques ou pathologiques (ex. cholestatique) sont justifiées. Ces ligands endogènes, les acides biliaires, pourraient également être investigués quant à leur origine cérébrale potentielle, avec pour pistes l'étude de la machinerie de synthèse des acides biliaires cérébraux à partir du catabolisme du cholestérol, l'expression des cytochromes, l'étude des oxystérols cérébraux etc...

Enfin, la détermination de la contribution de l'activation de FXR cérébral aux actions cliniques des ligands synthétiques de FXR, dont plusieurs sont actuellement en cours de développement pour le traitement des maladies métaboliques, telles que la stéatose hépatique non alcoolique, sera intéressante. L'injection ICV décrite au cours de ce travail étant invasive et difficilement transposable chez l'homme, nous pourrions imaginer des pistes de recherche et développement en pharmacologie/pharmacocinétique sur une autre voie d'administration, comme ce qui commence à être décrit sur la voie intra-nasale (193, 194).

Dans les organes périphériques, TGR5 et FXR pourraient exercer des actions opposées sur le contrôle cérébral de l'homéostasie énergétique pour contrôler finement, via le SNS, l'homéostasie énergétique, et notamment la dépense énergétique. Globalement, cela impliquerait que la prévention des troubles énergétiques serait obtenue en stimulant TGR5 et/ou en inactivant FXR hypothalamique.

ANNEXES

1. Article publié

Benjamin Deckmyn, Dorothée Domenger, Chloé Blondel, Sarah Ducastel, Emilie Nicolas, Emilie Dorchies, Emilie Caron, Julie Charton, Emmanuelle Vallez, Benoit Deprez, Jean-Sébastien Annicotte, Sophie Lestavel, Anne Tailleux, Christophe Magnan, Bart Staels and Kadiombo Bantubungi « **Farnesoid X Receptor Activation in Brain Alters Brown Adipose Tissue Function via the Sympathetic System** » *Front. Mol. Neurosci.* 14, 808603 (2022)

2. Publications et communications en lien avec le sujet

- **Congrès de la société francophone du diabète 2017, Poster : RÔLE DU RÉCEPTEUR NUCLÉAIRE FARNÉSOID X (FXR) DANS LA RÉPONSE HYPOTHALAMIQUE À L'INSULINE** S-E. Amini, **B. Deckmyn**, D. Domenger, J. Lesage, E. Dorchies, S. Humez, S. Lestavel, A. Muher-Tailleux, L. Buée, D. Blum, B. Staels, K. Bantubungi-Blum
- **Journée André Verbert 2018, communication orale : BRAIN ACTIVATION OF FXR AND ENERGY HOMEOSTASIS** **B. Deckmyn**



Farnesoid X Receptor Activation in Brain Alters Brown Adipose Tissue Function via the Sympathetic System

Benjamin Deckmyn^{1,2,3,4,5}, Dorothée Domenger^{1,2,3,4}, Chloé Blondel^{1,2,3,4}, Sarah Ducastel^{1,2,3,4}, Emilie Nicolas^{1,2,3,4}, Emilie Dorchies^{1,2,3,4}, Emilie Caron⁶, Julie Charton^{4,7,8}, Emmanuelle Vallez^{1,2,3,4}, Benoit Deprez^{4,7,8}, Jean-Sébastien Annicotte⁹, Sophie Lestavel^{1,2,3,4}, Anne Tailleux^{1,2,3,4}, Christophe Magnan^{10,11}, Bart Staels^{1,2,3,4*}† and Kadiombo Bantubungi^{1,2,3,4*†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Tiago F. Outeiro,
University Medical Center Göttingen,
Germany

Reviewed by:

Emmanuel Planel,
Laval University, Canada
Didier Vieau,
Université de Lille, France
Karelle Leroy,
Université Libre de Bruxelles, Belgium

*Correspondence:

Bart Staels
bart.staels@pasteur-lille.fr
Kadiombo Bantubungi
kadiombo.bantubungi@inserm.fr

† These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Brain Disease Mechanisms,
a section of the journal
Frontiers in Molecular Neuroscience

Received: 03 November 2021

Accepted: 07 December 2021

Published: 04 January 2022

Citation:

Deckmyn B, Domenger D,
Blondel C, Ducastel S, Nicolas E,
Dorchies E, Caron E, Charton J,
Vallez E, Deprez B, Annicotte J-S,
Lestavel S, Tailleux A, Magnan C,
Staels B and Bantubungi K (2022)
Farnesoid X Receptor Activation
in Brain Alters Brown Adipose Tissue
Function via the Sympathetic System.
Front. Mol. Neurosci. 14:808603.
doi: 10.3389/fnmol.2021.808603

¹EGID, U1011, University of Lille, Lille, France, ²Inserm, U1011, Lille, France, ³CHU Lille, Lille, France, ⁴Institut Pasteur de Lille, Lille, France, ⁵Laboratory of Lille Catholic Hospitals, Medical Biology Department, Lille Catholic University, Lille, France, ⁶Inserm UMR-S 1172, Lille, France, ⁷Inserm U1177, Lille, France, ⁸Drugs and Molecules for Living Systems, U1177, University of Lille, Lille, France, ⁹CNRS UMR 8199, Lille, France, ¹⁰CNRS UMR 8251, Paris, France, ¹¹University Paris Diderot, Paris, France

The nuclear bile acid (BA) receptor farnesoid X receptor (FXR) is a major regulator of metabolic/energy homeostasis in peripheral organs. Indeed, enterohepatic-expressed FXR controls metabolic processes (BA, glucose and lipid metabolism, fat mass, body weight). The central nervous system (CNS) regulates energy homeostasis in close interaction with peripheral organs. While FXR has been reported to be expressed in the brain, its function has not been studied so far. We studied the role of FXR in brain control of energy homeostasis by treating wild-type and FXR-deficient mice by intracerebroventricular (ICV) injection with the reference FXR agonist GW4064. Here we show that pharmacological activation of brain FXR modifies energy homeostasis by affecting brown adipose tissue (BAT) function. Brain FXR activation decreases the rate-limiting enzyme in catecholamine synthesis, tyrosine hydroxylase (TH), and consequently the sympathetic tone. FXR activation acts by inhibiting hypothalamic PKA-CREB induction of TH expression. These findings identify a function of brain FXR in the control of energy homeostasis and shed new light on the complex control of energy homeostasis by BA through FXR.

Keywords: FXR, brain, hypothalamus, energy homeostasis, brown adipose tissue

INTRODUCTION

Proper energy homeostasis is crucial to maintain health and avoid the development of metabolic disorders such as obesity, dyslipidemia and type 2 diabetes. The essential role of the CNS in the regulation of energy homeostasis is now well documented (Bantubungi et al., 2012; Kim et al., 2018). The CNS closely interacts with peripheral organs to gather information on its energy state and provides, in turn, signals to adapt biological responses. Among the different brain regions controlling energy homeostasis, the hypothalamus is the major center of convergence and integration of nutrient/hormonal signals and environmental cues, particularly through two types of neurons, pro-opio-melanocortin (POMC)-producing neurons and agouti-related protein

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. K. D. Hall, *et al.*, Energy balance and its components: implications for body weight regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**, 989–994 (2012).
2. P. B. Martínez de Morentin, M. López, “Mens Sana In Corpore Sano”: Exercise and Hypothalamic ER Stress. *PLoS Biol.* **8**, e1000464 (2010).
3. D. B. Savage, K. F. Petersen, G. I. Shulman, Disordered Lipid Metabolism and the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Physiol. Rev.* **87**, 507–520 (2007).
4. J. Park, T. S. Morley, M. Kim, D. J. Clegg, P. E. Scherer, Obesity and cancer—mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 455–465 (2014).
5. R. Roubenoff, *et al.*, Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J. Clin. Invest.* **93**, 2379–2386 (1994).
6. M. Petruzzelli, *et al.*, A Switch from White to Brown Fat Increases Energy Expenditure in Cancer-Associated Cachexia. *Cell Metab.* **20**, 433–447 (2014).
7. J. E. Morley, D. R. Thomas, M.-M. G. Wilson, Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**, 735–743 (2006).
8. S. Kir, *et al.*, Tumour-derived PTH-related protein triggers adipose tissue browning and cancer cachexia. *Nature* **513**, 100–104 (2014).
9. A. J. Hulbert, P. L. Else, Basal Metabolic Rate: History, Composition, Regulation, and Usefulness. *Physiol. Biochem. Zool.* **77**, 869–876 (2004).
10. A. Sampath Kumar, *et al.*, Correlation between basal metabolic rate, visceral fat and insulin resistance among type 2 diabetes mellitus with peripheral neuropathy. *Diabetes Metab. Syndr.* **13**, 344–348 (2019).
11. C. M. Patterson, B. E. Levin, Role of Exercise in the Central Regulation of Energy Homeostasis and in the Prevention of Obesity. *Neuroendocrinology* **87**, 65–70 (2008).
12. D. Ricquier, Fundamental mechanisms of thermogenesis. *C. R. Biol.* **329**, 578–586 (2006).
13. K.-S. Kim, R. J. Seeley, D. A. Sandoval, Signalling from the periphery to the brain that regulates energy homeostasis. *Nat. Rev. Neurosci.* **19**, 185–196 (2018).
14. K. Bantubungi, J. Prawitt, B. Staels, Control of metabolism by nutrient-regulated nuclear receptors acting in the brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **130**, 126–137 (2012).
15. J. N. Betley, *et al.*, Neurons for hunger and thirst transmit a negative-valence teaching signal. *Nature* **521**, 180–185 (2015).
16. Y. Chen, Y.-C. Lin, T.-W. Kuo, Z. A. Knight, Sensory detection of food rapidly modulates arcuate feeding circuits. *Cell* **160**, 829–841 (2015).
17. E. Rozengurt, C. Sternini, Taste receptor signaling in the mammalian gut. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**, 557–562 (2007).
18. C. E. Riera, *et al.*, The Sense of Smell Impacts Metabolic Health and Obesity. *Cell Metab.* **26**, 198–211.e5 (2017).
19. M. Peng, D. Coutts, T. Wang, Y. O. Cakmak, Systematic review of olfactory shifts related to obesity. *Obes. Rev.* **20**, 325–338 (2019).
20. M. Mas, M.-C. Brindisi, C. Chabanet, S. Nicklaus, S. Chabaron, Weight Status and Attentional Biases Toward Foods: Impact of Implicit Olfactory Priming. *Front. Psychol.* **10**, 1789 (2019).
21. J. Y. K. Chan, E. García-Esquinas, O. H. Ko, M. C. F. Tong, S. Y. Lin, The Association Between Diabetes and Olfactory Function in Adults. *Chem. Senses* **43**, 59–64 (2018).

22. E. Guyot, A. Dougkas, J. A. Nazare, S. Iceta, E. Disse, Is there a link between sensory alterations and modification in food preference following bariatric surgery? *Proc. Nutr. Soc.* **79** (2020).
23. S. Bouret, B. E. Levin, S. E. Ozanne, Gene-Environment Interactions Controlling Energy and Glucose Homeostasis and the Developmental Origins of Obesity. *Physiol. Rev.* **95**, 47–82 (2015).
24. M. Lutter, E. J. Nestler, Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. *J. Nutr.* **139**, 629–632 (2009).
25. V. Di Marzo, A. Ligresti, L. Cristino, The endocannabinoid system as a link between homeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation. *Int. J. Obes.* **33**, S18–S24 (2009).
26. V. Prevo, *et al.*, The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr. Rev.* **39**, 333–368 (2018).
27. M. W. Schwartz, S. C. Woods, D. Porte, R. J. Seeley, D. G. Baskin, Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661–671 (2000).
28. C. Sánchez-Lasheras, A. Christine Köhner, J. C. Brüning, Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Front. Neuroendocrinol.* **31**, 4–15 (2010).
29. R. D. Cone, Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* **8**, 571–578 (2005).
30. H. Kawano, S. Masuko, β -endorphin-, adrenocorticotrophic hormone- and neuropeptide y-containing projection fibers from the arcuate hypothalamic nucleus make synaptic contacts on to nucleus preopticus medianus neurons projecting to the paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. *Neuroscience* **98**, 555–565 (2000).
31. M. A. Cowley, *et al.*, Integration of NPY, AGRP, and Melanocortin Signals in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Neuron* **24**, 155–163 (1999).
32. C. Blouet, G. J. Schwartz, Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav. Brain Res.* **209**, 1–12 (2010).
33. A. V. Ferguson, K. J. Latchford, W. K. Samson, The paraventricular nucleus of the hypothalamus – a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction. *Expert Opin. Ther. Targets* **12**, 717–727 (2008).
34. B. K. Anand, J. R. Brobeck, Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J. Biol. Med.* **24**, 123–140 (1951).
35. C. B. Saper, J. Lu, T. C. Chou, J. Gooley, The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci.* **28**, 152–157 (2005).
36. H. Münzberg, Differential leptin access into the brain — A hierarchical organization of hypothalamic leptin target sites? *Physiol. Behav.* **94**, 664–669 (2008).
37. R. B. Simerly, Hypothalamic substrates of metabolic imprinting. *Physiol. Behav.* **94**, 79–89 (2008).
38. A. S. Garfield, *et al.*, Dynamic GABAergic afferent modulation of AgRP neurons. *Nat. Neurosci.* **19**, 1628–1635 (2016).
39. J. K. Jeong, J. G. Kim, B. J. Lee, Participation of the central melanocortin system in metabolic regulation and energy homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3799–3809 (2014).
40. R. D. Cone, Studies on the Physiological Functions of the Melanocortin System. *Endocr. Rev.* **27**, 736–749 (2006).
41. K. G. Mountjoy, M. T. Mortrud, M. J. Low, R. B. Simerly, R. D. Cone, Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1298–1308 (1994).
42. D. Huszar, *et al.*, Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice. *Cell* **88**, 131–141 (1997).

43. N. Balthasar, *et al.*, Divergence of Melanocortin Pathways in the Control of Food Intake and Energy Expenditure. *Cell* **123**, 493–505 (2005).
44. C. C. Cheung, D. K. Clifton, R. A. Steiner, Proopiomelanocortin Neurons Are Direct Targets for Leptin in the Hypothalamus. *Endocrinology* **138**, 4489–4492 (1997).
45. M. W. Schwartz, *et al.*, Leptin Increases Hypothalamic Pro-opiomelanocortin mRNA Expression in the Rostral Arcuate Nucleus. *Diabetes* **46**, 2119–2123 (1997).
46. A. Breit, *et al.*, The Natural Inverse Agonist Agouti-related Protein Induces Arrestin-mediated Endocytosis of Melanocortin-3 and -4 Receptors. *J. Biol. Chem.* **281**, 37447–37456 (2006).
47. W. A. J. Nijenhuis, J. Oosterom, R. A. H. Adan, AgRP(83–132) Acts as an Inverse Agonist on the Human-Melanocortin-4 Receptor. *Mol. Endocrinol.* **15**, 164–171 (2001).
48. M. M. I. Abdalla, Central and peripheral control of food intake. *Endocr. Regul.* **51**, 52–70 (2017).
49. R. Chandra, R. A. Liddle, Cholecystokinin: *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* **14**, 63–67 (2007).
50. G. L. Edwards, E. E. Ladenheim, R. C. Ritter, Dorsomedial hindbrain participation in cholecystokinin-induced satiety. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **251**, R971–R977 (1986).
51. M. Liu, *et al.*, Intestinal satiety protein apolipoprotein AIV is synthesized and regulated in rat hypothalamus. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **280**, R1382–R1387 (2001).
52. C.-M. Lo, *et al.*, Interaction of apolipoprotein AIV with cholecystokinin on food intake. *Appetite* **49**, 309 (2007).
53. T. E. Adrian, *et al.*, Distribution and postprandial release of porcine peptide YY. *J. Endocrinol.* **113**, 11–14 (1987).
54. D. Larhammar, Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul. Pept.* **65**, 165–174 (1996).
55. R. L. Batterham, *et al.*, Gut hormone PYY3-36 physiologically inhibits food intake. *Nature* **418**, 650–654 (2002).
56. H. Lin, X. Zhao, L. Wang, H. Wong, Fat-induced ileal brake in the dog depends on peptide YY. *Gastroenterology* **110**, 1491–1495 (1996).
57. P. T. Pfluger, *et al.*, Effect of Human Body Weight Changes on Circulating Levels of Peptide YY and Peptide YY3–36. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 583–588 (2007).
58. R. C. Spiller, *et al.*, The ileal brake--inhibition of jejunal motility after ileal fat perfusion in man. *Gut* **25**, 365–374 (1984).
59. D. J. Drucker, M. A. Nauck, The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *The Lancet* **368**, 1696–1705 (2006).
60. J. J. Holst, The Physiology of Glucagon-like Peptide 1. *Physiol. Rev.* **87**, 1409–1439 (2007).
61. R. Verhaeghe, *et al.*, Gastric Bypass Increases Postprandial Insulin and GLP-1 in Nonobese Minipigs. *Eur. Surg. Res.* **52**, 41–49 (2014).
62. M. Daoudi, *et al.*, PPAR β/δ Activation Induces Enteroendocrine L Cell GLP-1 Production. *Gastroenterology* **140**, 1564–1574 (2011).
63. S. Ducastel, *et al.*, The nuclear receptor FXR inhibits Glucagon-Like Peptide-1 secretion in response to microbiota-derived Short-Chain Fatty Acids. *Sci. Rep.* **10**, 174 (2020).
64. M.-S. Trabelsi, *et al.*, Farnesoid X receptor inhibits glucagon-like peptide-1 production by enteroendocrine L cells. *Nat. Commun.* **6**, 7629 (2015).
65. W. A. Banks, The blood–brain barrier as a regulatory interface in the gut–brain axes. *Physiol. Behav.* **89**, 472–476 (2006).

66. C. Sánchez-Lasheras, A. Christine Könnner, J. C. Brüning, Integrative neurobiology of energy homeostasis-neurocircuits, signals and mediators. *Front. Neuroendocrinol.* **31**, 4–15 (2010).
67. C. D. Morrison, G. J. Morton, K. D. Niswender, R. W. Gelling, M. W. Schwartz, Leptin inhibits hypothalamic *Npy* and *AgRP* gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **289**, E1051–E1057 (2005).
68. C. F. Elias, *et al.*, Leptin Activates Hypothalamic CART Neurons Projecting to the Spinal Cord. *Neuron* **21**, 1375–1385 (1998).
69. M. van Houten, E. L. Schiffrin, J. F. E. Mann, B. I. Posner, R. Boucher, Radioautographic localization of specific binding sites for blood-borne angiotensin II in the rat brain. *Brain Res.* **186**, 480–485 (1980).
70. M. C. Vogt, J. C. Brüning, CNS insulin signaling in the control of energy homeostasis and glucose metabolism – from embryo to old age. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 76–84 (2013).
71. S. C. Woods, E. C. Lotter, L. D. McKay, D. Porte, Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* **282**, 503–505 (1979).
72. A. J. Sipols, D. G. Baskin, M. W. Schwartz, Effect of Intracerebroventricular Insulin Infusion on Diabetic Hyperphagia and Hypothalamic Neuropeptide Gene Expression. *Diabetes* **44**, 147–151 (1995).
73. J. C. Brüning, Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction. *Science* **289**, 2122–2125 (2000).
74. L. Plum, Central insulin action in energy and glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* **116**, 1761–1766 (2006).
75. D. E. Cummings, *et al.*, A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans. *Diabetes* **50**, 1714–1719 (2001).
76. M. A. Cowley, *et al.*, The Distribution and Mechanism of Action of Ghrelin in the CNS Demonstrates a Novel Hypothalamic Circuit Regulating Energy Homeostasis. *Neuron* **37**, 649–661 (2003).
77. M. van den Top, K. Lee, A. D. Whyment, A. M. Blanks, D. Spanswick, Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat. Neurosci.* **7**, 493–494 (2004).
78. É. Szentirmai, L. Kapás, J. M. Krueger, Ghrelin microinjection into forebrain sites induces wakefulness and feeding in rats. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R575–R585 (2007).
79. T. Sakurai, *et al.*, Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell* **92**, 573–585 (1998).
80. J. Fadel, A. Y. Deutch, Anatomical substrates of orexin–dopamine interactions: lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience* **111**, 379–387 (2002).
81. T. Nakamachi, *et al.*, Regulation by Orexin of Feeding Behaviour and Locomotor Activity in the Goldfish. *J. Neuroendocrinol.* **18**, 290–297 (2006).
82. S. D. Jordan, A. C. Könnner, J. C. Brüning, Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3255–3273 (2010).
83. M. L. J. Ashford, P. R. Boden, J. M. Treherne, Glucose-induced excitation of hypothalamic neurones is mediated by ATP-sensitive K⁺ channels. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **415**, 479–483 (1990).

84. T. K. T. Lam, G. J. Schwartz, L. Rossetti, Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat. Neurosci.* **8**, 579–584 (2005).
85. P. Seoane-Collazo, *et al.*, Hypothalamic-autonomic control of energy homeostasis. *Endocrine* **50**, 276–291 (2015).
86. C. Han, M. W. Rice, D. Cai, Neuroinflammatory and autonomic mechanisms in diabetes and hypertension. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **311**, E32–E41 (2016).
87. M. C. dos S. Moreira, *et al.*, Does the sympathetic nervous system contribute to the pathophysiology of metabolic syndrome? *Front. Physiol.* **6** (2015).
88. P. Valensi, Autonomic nervous system activity changes in patients with hypertension and overweight: role and therapeutic implications. *Cardiovasc. Diabetol.* **20**, 170 (2021).
89. M. Razzoli, *et al.*, Stress-induced activation of brown adipose tissue prevents obesity in conditions of low adaptive thermogenesis. *Mol. Metab.* **5**, 19–33 (2016).
90. L. W. Swanson, P. E. Sawchenko, Hypothalamic Integration: Organization of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.* **6**, 269–324 (1983).
91. M. Harms, P. Seale, Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* **19**, 1252–1263 (2013).
92. C. L. Coolbaugh, B. M. Damon, E. C. Bush, E. B. Welch, T. F. Towse, Cold exposure induces dynamic, heterogeneous alterations in human brown adipose tissue lipid content. *Sci. Rep.* **9** (2019).
93. C. Porter, *et al.*, Human and Mouse Brown Adipose Tissue Mitochondria Have Comparable UCP1 Function. *Cell Metab.* **24**, 246–255 (2016).
94. B. Cannon, Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol. Rev.* **84**, 277–359 (2004).
95. L. P. Kozak, R. Anunciado-Koza, UCP1: its involvement and utility in obesity. *Int. J. Obes.* **32**, S32–S38 (2008).
96. S. Moreno, S. Farioli-Vecchioli, M. P. Cerù, Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid x receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience* **123**, 131–145 (2004).
97. A. L. Bookout, *et al.*, Anatomical Profiling of Nuclear Receptor Expression Reveals a Hierarchical Transcriptional Network. *Cell* **126**, 789–799 (2006).
98. F. Gofflot, *et al.*, Systematic Gene Expression Mapping Clusters Nuclear Receptors According to Their Function in the Brain. *Cell* **131**, 405–418 (2007).
99. S. R. Sisley, *et al.*, Hypothalamic Vitamin D Improves Glucose Homeostasis and Reduces Weight. *Diabetes* **65**, 2732–2741 (2016).
100. C. Knauf, *et al.*, Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α -Null Mice Have Increased White Adipose Tissue Glucose Utilization, GLUT4, and Fat Mass: Role in Liver and Brain. *Endocrinology* **147**, 4067–4078 (2006).
101. K. K. Ryan, *et al.*, A role for central nervous system PPAR- γ in the regulation of energy balance. *Nat. Med.* **17**, 623–626 (2011).
102. R. M. Huber, *et al.*, Generation of multiple farnesoid-X-receptor isoforms through the use of alternative promoters. *Gene* **290**, 35–43 (2002).
103. P. Lefebvre, B. Cariou, F. Lien, F. Kuipers, B. Staels, Role of Bile Acids and Bile Acid Receptors in Metabolic Regulation. *Physiol. Rev.* **89**, 147–191 (2009).
104. C. Mazuy, A. Helleboid, B. Staels, P. Lefebvre, Nuclear bile acid signaling through the farnesoid X receptor. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 1631–1650 (2015).
105. T. Q. de Aguiar Vallim, E. J. Tarling, P. A. Edwards, Pleiotropic Roles of Bile Acids in Metabolism. *Cell Metab.* **17**, 657–669 (2013).
106. M. Ploton, *et al.*, The nuclear bile acid receptor FXR is a PKA- and FOXA2-sensitive activator of fasting hepatic gluconeogenesis. *J. Hepatol.* **69**, 1099–1109 (2018).

107. B. Cariou, B. Staels, FXR: a promising target for the metabolic syndrome? *Trends Pharmacol. Sci.* **28**, 236–243 (2007).
108. K. Ma, P. K. Saha, L. Chan, D. D. Moore, Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J. Clin. Invest.* **116**, 1102–1109 (2006).
109. M. Watanabe, *et al.*, Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J. Clin. Invest.* **113**, 1408–1418 (2004).
110. M. Abdelkarim, *et al.*, The Farnesoid X Receptor Regulates Adipocyte Differentiation and Function by Promoting Peroxisome Proliferator-activated Receptor- and Interfering with the Wnt/ -Catenin Pathways. *J. Biol. Chem.* **285**, 36759–36767 (2010).
111. J. Prawitt, S. Caron, B. Staels, Glucose-lowering effects of intestinal bile acid sequestration through enhancement of splanchnic glucose utilization. *Trends Endocrinol. Metab.* **25**, 235–244 (2014).
112. M. Makishima, *et al.*, Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science* **284**, 1362–1365 (1999).
113. G. Porez, J. Prawitt, B. Gross, B. Staels, Bile acid receptors as targets for the treatment of dyslipidemia and cardiovascular disease: Thematic Review Series: New Lipid and Lipoprotein Targets for the Treatment of Cardiometabolic Diseases. *J. Lipid Res.* **53**, 1723–1737 (2012).
114. S. I. Sayin, *et al.*, Gut Microbiota Regulates Bile Acid Metabolism by Reducing the Levels of Tauro-beta-muricholic Acid, a Naturally Occurring FXR Antagonist. *Cell Metab.* **17**, 225–235 (2013).
115. T. Inagaki, *et al.*, Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab.* **2**, 217–225 (2005).
116. J. M. Ferrell, J. Y. L. Chiang, Bile acid receptors and signaling crosstalk in the liver, gut and brain. *Liver Res.* **5**, 105–118 (2021).
117. G. Mithieux, Brain, liver, intestine: a triumvirate to coordinate insulin sensitivity of endogenous glucose production. *Diabetes Metab.* **36**, S50–S53 (2010).
118. R. Kohli, R. J. Seeley, The search for mechanisms underlying bariatric surgery. *Nat. Rev. Endocrinol.* **9**, 572–574 (2013).
119. K. K. Ryan, *et al.*, FXR is a molecular target for the effects of vertical sleeve gastrectomy. *Nature* **509**, 183–188 (2014).
120. A. K. McGavigan, *et al.*, TGR5 contributes to glucoregulatory improvements after vertical sleeve gastrectomy in mice. *Gut* **66**, 226–234 (2017).
121. L. Ding, *et al.*, Vertical sleeve gastrectomy activates GPBAR-1/TGR5 to sustain weight loss, improve fatty liver, and remit insulin resistance in mice. *Hepatology* **64**, 760–773 (2016).
122. K. Einarsson, *et al.*, Bile acid sequestrants: mechanisms of action on bile acid and cholesterol metabolism. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **40 Suppl 1**, S53–58 (1991).
123. G. Brufau, *et al.*, Improved glycemic control with colestevam treatment in patients with type 2 diabetes is not directly associated with changes in bile acid metabolism. *Hepatology* **52**, 1455–1464 (2010).
124. A. Perino, K. Schoonjans, TGR5 and Immunometabolism: Insights from Physiology and Pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **36**, 847–857 (2015).
125. C. Thomas, *et al.*, TGR5-Mediated Bile Acid Sensing Controls Glucose Homeostasis. *Cell Metab.* **10**, 167–177 (2009).
126. E. P. M. Broeders, *et al.*, The Bile Acid Chenodeoxycholic Acid Increases Human Brown Adipose Tissue Activity. *Cell Metab.* **22**, 418–426 (2015).
127. D. A. Briere, *et al.*, Novel Small Molecule Agonist of TGR5 Possesses Anti-Diabetic Effects but Causes Gallbladder Filling in Mice. *PLOS ONE* **10**, e0136873 (2015).

128. H. Duan, *et al.*, Discovery of Intestinal Targeted TGR5 Agonists for the Treatment of Type 2 Diabetes. *J. Med. Chem.* **58**, 3315–3328 (2015).
129. S.-H. Koo, Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin. Mol. Hepatol.* **19**, 210 (2013).
130. Y. Ma, Y. Huang, L. Yan, M. Gao, D. Liu, Synthetic FXR Agonist GW4064 Prevents Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. *Pharm. Res.* **30**, 1447–1457 (2013).
131. J. R. Crouse, Hypertriglyceridemia: A contraindication to the use of bile acid binding resins. *Am. J. Med.* **83**, 243–248 (1987).
132. I. Pineda Torra, *et al.*, Bile Acids Induce the Expression of the Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α Gene via Activation of the Farnesoid X Receptor. *Mol. Endocrinol.* **17**, 259–272 (2003).
133. H. Hirokane, M. Nakahara, S. Tachibana, M. Shimizu, R. Sato, Bile Acid Reduces the Secretion of Very Low Density Lipoprotein by Repressing Microsomal Triglyceride Transfer Protein Gene Expression Mediated by Hepatocyte Nuclear Factor-4. *J. Biol. Chem.* **279**, 45685–45692 (2004).
134. N. Jiao, *et al.*, Suppressed hepatic bile acid signalling despite elevated production of primary and secondary bile acids in NAFLD. *Gut* **67**, 1881–1891 (2018).
135. V. Nobili, *et al.*, Hepatic farnesoid X receptor protein level and circulating fibroblast growth factor 19 concentration in children with NAFLD. *Liver Int.* **38**, 342–349 (2018).
136. B. Lelouvier, *et al.*, Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients: A pilot analysis: Lelouvier *et al.* *Hepatology* **64**, 2015–2027 (2016).
137. P. Puri, *et al.*, The presence and severity of nonalcoholic steatohepatitis is associated with specific changes in circulating bile acids. *Hepatology* **67**, 534–548 (2018).
138. V. Tripodi, M. Contin, M. A. Fernández, A. Lemberg, Bile acids content in brain of common duct ligated rats. *Ann. Hepatol.* **11**, 930–934 (2012).
139. S. Yoshimoto, *et al.*, Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature* **499**, 97–101 (2013).
140. P. R. Maloney, *et al.*, Identification of a Chemical Tool for the Orphan Nuclear Receptor FXR. *J. Med. Chem.* **43**, 2971–2974 (2000).
141. S. Mudaliar, *et al.*, Efficacy and Safety of the Farnesoid X Receptor Agonist Obeticholic Acid in Patients With Type 2 Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **145**, 574-582.e1 (2013).
142. B. A. Neuschwander-Tetri, *et al.*, Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet* **385**, 956–965 (2015).
143. K. Patel, *et al.*, Cilofexor, a Nonsteroidal FXR Agonist, in Patients With Noncirrhotic NASH: A Phase 2 Randomized Controlled Trial. *Hepatology* **72**, 58–71 (2020).
144. D. C. Tully, *et al.*, Discovery of Tropifexor (LJN452), a Highly Potent Non-bile Acid FXR Agonist for the Treatment of Cholestatic Liver Diseases and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *J. Med. Chem.* **60**, 9960–9973 (2017).
145. P. Schwabl, *et al.*, The Non-Steroidal FXR Agonist Cilofexor Improves Portal Hypertension and Reduces Hepatic Fibrosis in a Rat NASH Model. *Biomedicines* **9**, 60 (2021).
146. C. Gege, E. Hambruch, N. Hambruch, O. Kinzel, C. Kremoser, “Nonsteroidal FXR Ligands: Current Status and Clinical Applications” in *Bile Acids and Their Receptors*, S. Fiorucci, E. Distrutti, Eds. (Springer International Publishing, 2019), pp. 167–205.
147. J. Prawitt, *et al.*, Farnesoid X Receptor Deficiency Improves Glucose Homeostasis in Mouse Models of Obesity. *Diabetes* **60**, 1861–1871 (2011).
148. Y. Zhang, *et al.*, Loss of FXR Protects against Diet-Induced Obesity and Accelerates Liver Carcinogenesis in *ob / ob* Mice. *Mol. Endocrinol.* **26**, 272–280 (2012).

149. M. Watanabe, *et al.*, Lowering Bile Acid Pool Size with a Synthetic Farnesoid X Receptor (FXR) Agonist Induces Obesity and Diabetes through Reduced Energy Expenditure. *J. Biol. Chem.* **286**, 26913–26920 (2011).
150. N. J. Wood, Beneficial effects of bariatric surgery are mediated by FXR signalling. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 267–267 (2014).
151. B. Cariou, *et al.*, FXR-deficiency confers increased susceptibility to torpor. *FEBS Lett.* **581**, 5191–5198 (2007).
152. F. Huang, *et al.*, Deletion of mouse FXR gene disturbs multiple neurotransmitter systems and alters neurobehavior. *Front. Behav. Neurosci.* **9** (2015).
153. M. Bjursell, *et al.*, Ageing Fxr Deficient Mice Develop Increased Energy Expenditure, Improved Glucose Control and Liver Damage Resembling NASH. *PLoS ONE* **8**, e64721 (2013).
154. C. Huang, *et al.*, Identification of functional farnesoid X receptors in brain neurons. *FEBS Lett.* **590**, 3233–3242 (2016).
155. N. Mano, Presence of protein-bound unconjugated bile acids in the cytoplasmic fraction of rat brain. *J. Lipid Res.* **45**, 295–300 (2003).
156. N. Mano, Bioconversion of 3 -hydroxy-5-cholenoic acid into chenodeoxycholic acid by rat brain enzyme systems. *J. Lipid Res.* **45**, 1741–1748 (2004).
157. M. Quinn, Bile in the Brain? A Role for Bile Acids in the Central Nervous System. *J. Cell Sci. Ther.* **03** (2013).
158. Y. Zhang, C. D. Klaassen, Effects of feeding bile acids and a bile acid sequestrant on hepatic bile acid composition in mice. *J. Lipid Res.* **51**, 3230–3242 (2010).
159. W. Zhang, S. Bi, Hypothalamic Regulation of Brown Adipose Tissue Thermogenesis and Energy Homeostasis. *Front. Endocrinol.* **6**, 136 (2015).
160. I. Shimizu, *et al.*, Vascular rarefaction mediates whitening of brown fat in obesity. *J. Clin. Invest.* **124**, 2099–2112 (2014).
161. M. Harms, P. Seale, Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat. Med.* **19**, 1252–1263 (2013).
162. Y.-C. Shi, *et al.*, Arcuate NPY Controls Sympathetic Output and BAT Function via a Relay of Tyrosine Hydroxylase Neurons in the PVN. *Cell Metab.* **17**, 236–248 (2013).
163. K. M. Piech-Dumas, A. W. Tank, CREB mediates the cAMP-responsiveness of the tyrosine hydroxylase gene: use of an antisense RNA strategy to produce CREB-deficient PC12 cell lines. *Mol. Brain Res.* **70**, 219–230 (1999).
164. L. Yang, G. S. McKnight, Hypothalamic PKA regulates leptin sensitivity and adiposity. *Nat. Commun.* **6** (2015).
165. S. Herzig, *et al.*, CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* **413**, 179–183 (2001).
166. S. C. Pandey, Anxiety and alcohol abuse disorders: a common role for CREB and its target, the neuropeptide Y gene. *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 456–460 (2003).
167. O. Chávez-Talavera, A. Tailleux, P. Lefebvre, B. Staels, Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* **152**, 1679-1694.e3 (2017).
168. G. Lusk, Animal calorimetry: Twenty-Fourth Paper. Analysis of the oxidation of mixtures of carbohydrate and fat. *J. Biol. Chem.*, 41–42 (1924).
169. A. Asakawa, *et al.*, Characterization of the effects of pancreatic polypeptide in the regulation of energy balance. *Gastroenterology* **124**, 1325–1336 (2003).
170. P. Li, *et al.*, Melanocortin 3/4 receptors in paraventricular nucleus modulate sympathetic outflow and blood pressure: Melanocortin and sympathetic activity. *Exp. Physiol.* **98**, 435–443 (2013).

171. S. O. Mack, M. Wu, P. Kc, M. A. Haxhiu, Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates cardiorespiratory responses via oxytocinergic innervation of neurons in pre-Botzinger complex. *J. Appl. Physiol.* **102**, 189–199 (2006).
172. S. Seok, *et al.*, Transcriptional regulation of autophagy by an FXR–CREB axis. *Nature* (2014) <https://doi.org/10.1038/nature13949> (April 19, 2018).
173. M. Billinger, *et al.*, Do beta-adrenergic blocking agents increase coronary flow reserve? *J. Am. Coll. Cardiol.* **38**, 1866–1871 (2001).
174. L. Ek, B. Åblad, Effects of three beta adrenergic receptor blockers on myocardial oxygen consumption in the dog. *Eur. J. Pharmacol.* **14**, 19–28 (1971).
175. S. A. Lang, M. B. Maron, S. A. Signs, Oxygen consumption after massive sympathetic nervous system discharge. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **256**, E345–E351 (1989).
176. K. K. A. Witte, The effects of and blockade on ventilatory responses to exercise in chronic heart failure. *Heart* **89**, 1169–1173 (2003).
177. I. Mahú, *et al.*, Brain-Sparing Sympathofacilitators Mitigate Obesity without Adverse Cardiovascular Effects. *Cell Metab.* **31**, 1120-1135.e7 (2020).
178. K. A. Virtanen, *et al.*, Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1518–1525 (2009).
179. A. M. Cypess, *et al.*, Activation of Human Brown Adipose Tissue by a β 3-Adrenergic Receptor Agonist. *Cell Metab.* **21**, 33–38 (2015).
180. C. A. Heinen, *et al.*, Effects of intravenous thyrotropin-releasing hormone on 18F-fluorodeoxyglucose uptake in human brown adipose tissue: a randomized controlled trial. *Eur. J. Endocrinol.* **179**, 31–38 (2018).
181. M. S. Coelho, *et al.*, GQ-16, a TZD-Derived Partial PPAR γ Agonist, Induces the Expression of Thermogenesis-Related Genes in Brown Fat and Visceral White Fat and Decreases Visceral Adiposity in Obese and Hyperglycemic Mice. *PLOS ONE* **11**, e0154310 (2016).
182. M. Sanchez-Alavez, *et al.*, ROS and Sympathetically Mediated Mitochondria Activation in Brown Adipose Tissue Contribute to Methamphetamine-Induced Hyperthermia. *Front. Endocrinol.* **4** (2013).
183. M. Tsoi, *et al.*, Activation of Thermogenesis in Brown Adipose Tissue and Dysregulated Lipid Metabolism Associated with Cancer Cachexia in Mice. *Cancer Res.* **72**, 4372–4382 (2012).
184. R. Kurzrock, The role of cytokines in cancer-related fatigue. *Cancer* **92**, 1684–1688 (2001).
185. R. Sharma, *et al.*, Inflammatory (B) symptoms are independent predictors of myelosuppression from chemotherapy in Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) patients – analysis of data from a British National Lymphoma Investigation phase III trial comparing CHOP to PMitCEBO. *BMC Cancer* **9**, 153 (2009).
186. K. L. Mertens, A. Kalsbeek, M. R. Soeters, H. M. Eggink, Bile Acid Signaling Pathways from the Enterohepatic Circulation to the Central Nervous System. *Front. Neurosci.* **11** (2017).
187. L. Sheng, *et al.*, Gender Differences in Bile Acids and Microbiota in Relationship with Gender Dissimilarity in Steatosis Induced by Diet and FXR Inactivation. *Sci. Rep.* **7**, 1748 (2017).
188. G. Li, *et al.*, Farnesoid X Receptor Activation Mediates Head-to-Tail Chromatin Looping in the *Nr0b2* Gene Encoding Small Heterodimer Partner. *Mol. Endocrinol.* **24**, 1404–1412 (2010).
189. C. Knauf, A. Abot, E. Wemelle, P. D. Cani, Targeting the Enteric Nervous System to Treat Metabolic Disorders? “Enterosynes” as Therapeutic Gut Factors. *Neuroendocrinology* **110**, 139–146 (2020).

190. M. Watanabe, *et al.*, Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* **439**, 484–489 (2006).
191. H. M. Eggink, *et al.*, Chronic infusion of tauroolithocholate into the brain increases fat oxidation in mice. *J. Endocrinol.* **236**, 85–97 (2018).
192. A. Castellanos-Jankiewicz, *et al.*, Hypothalamic bile acid-TGR5 signaling protects from obesity. *Cell Metab.* **33**, 1483-1492.e10 (2021).
193. J. T. Wang, *et al.*, Enhanced Delivery of Neuroactive Drugs via Nasal Delivery with a Self-Healing Supramolecular Gel. *Adv. Sci.* **8**, 2101058 (2021).
194. H. D. Kao, A. Traboulsi, S. Itoh, L. Dittert, A. Hussain, Enhancement of the systemic and CNS specific delivery of L-dopa by the nasal administration of its water soluble prodrugs. *Pharm. Res.* **17**, 978–984 (2000).

