UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale de Biologie Santé de Lille

THESE

Pour l'obtention du grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Discipline : Neurosciences

ROLE DES NEURONES A OCYTOCINE DANS LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME MELANOCORTINERGIQUE ET NOUVELLES PERSPECTIVES SUR LES MODELES MURINS DU SYNDROME DE PRADER-WILLI

Présentée et soutenue publiquement le 10 septembre 2024

Par Pierre-Yves BARELLE

JURY

Présidente

Pr. Stefania MACCARI : Professeur de l'Université de Lille, CNRS, UMR 8576

Rapporteurs

Dr. Sophie CROIZIER : Assistante Professeur de l'Université de Lausanne, Center For Integrative Genomics

Dr. Carmelo QUARTA : Chargé de Recherche de l'Université de Bordeaux, INSERM, U897

Examinateurs

Dr. Françoise MUSCATELLI : Directrice de Recherche de l'Université de Aix-Marseille CNRS, UMR1249

Pr. Anne-Simone PARENT : Professeur de l'Université de Liège, GIGA Neurosciences.

Dr. Philippe CIOFI : Chargé de Recherche de l'Université de Bordeaux, INSERM, U1215

Directeur de thèse

Dr. Sebastien BOURET : Directeur de Recherche de l'Université de Lille, INSERM, UMR-S1172

REMERCIEMENTS

Aux membres de mon jury :

Mesdames et Messieurs, très estimés membres de mon jury,

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté d'être les rapporteurs et examinateurs de ce manuscrit et vous suis reconnaissant de siéger dans ce jury lors de ma soutenance de thèse. Chers Philippe, Françoise et Anne-Simone, merci pour votre suivi, vos conseils et votre présence au cours de ces 4 années. Pouvoir échanger avec vous a été pour moi un des moments les plus stimulants de ma thèse.

A mon Directeur de Thèse :

Cher Sebastien,

Nous y voilà finalement, au terme de ces 5 années passées ensemble. Je voulais vous remercier de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné l'opportunité de travailler avec vous. Vous avez toujours été un soutien constant pour moi et je vous en remercie. Sans votre bonne humeur et votre optimisme, car il en a fallu pour traverser ces années mouvementées, nous n'aurions pas été bien loin dans cette entreprise. Je vous remercie pour tous nos échanges et votre aide précieuse, qui ont rendu ces années de recherche passionnantes. Merci de votre soutien et de votre compréhension de mes projets professionnels, ainsi que de m'avoir donné l'opportunité de pouvoir réaliser des missions d'enseignement. Soyez assuré de mon éternel respect et de toute ma gratitude.

A mes collègues :

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Vincent Prévot, qui fut le premier à me recevoir et à me faire confiance. Merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse dans votre équipe.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe Lille Neuroendocrinologie pour m'avoir accueilli et soutenu. Merci d'avoir fait du laboratoire un second foyer. Merci à l'équipe de Sébastien : Amine, Claire et Leti, pour votre aide, vos conseils et pour tous les bons moments passés ensemble. Merci au Docteur Virginie Mattot pour nos discussions du midi et pour votre optimisme contagieux.

Un remerciement tout particulier aux membres de la Crypte : Amandine, Gaspard, Ophélie, Fatima, Jessica et Nabil. Avec vous, j'ai partagé les joies et les tristesses de la vie de doctorant. J'ai eu la chance de vous avoir comme collègues et comme amis. Je vous remercie du fond du cœur pour tous ces moments inoubliables passés en votre compagnie et pour ceux à venir.

Je remercie également l'ensemble du personnel administratif et technique. Merci Karime, Thomas et Laïfa pour votre soutien, votre bonne humeur et pour nous permettre de travailler dans de bonnes conditions. Merci Marion, Nathalie et Sophie pour votre flexibilité et votre compréhension. Merci Jean-Petit pour les chocolats. Et surtout, un grand merci à Céline, qui, dans les moments les plus difficiles, a toujours été une main tendue et une oreille attentive.

Je remercie également les Docteurs Ariane Sharif, Odile Viltart et Lucas Dezorzi pour l'opportunité qu'ils m'ont donnée de pouvoir réaliser des activités d'enseignement. Merci pour votre confiance, votre aide et d'avoir partagé avec moi votre savoir.

A ma famille et amis :

Merci à mes parents pour tout... Papa, maman, vous avez tellement sacrifié pour mon frère et moi. Sans votre aide au quotidien, passée, présente et future, je ne serais jamais arrivé là. Soyez bien conscients de tout l'amour que je vous porte. Merci à mon petit frère, Léo, pour toutes ces années passées avec toi, pour ta confiance et tes appels du soir. Merci également à l'ensemble de ma famille pour leur soutien sans faille et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail. Merci à Loïc, mon cousin.

Je tiens à remercier tous mes amis, qui m'ont toujours donné un support émotionnel et dont l'amitié n'a jamais failli au cours de ces années. À Nathan, Paul, Célien, Constance, Simon, Alexis, François et Suri, je vous remercie de votre soutien et pour tous ces moments de joie que vous m'avez donnés.

Je remercie Julie, ma conjointe. Merci pour tout l'amour que tu me donnes chaque jour, merci d'avoir cru en moi depuis le début, merci pour ta patience et ton écoute, pour toutes tes petites attentions et ton soutien permanent. Je n'y serais jamais arrivé sans toi, je t'aime de tout mon cœur.

Pour finir, j'aimerais remercier ma grand-mère Nelly. Mamie, je me souviens encore avec nostalgie du temps où tu m'aidais à faire mes devoirs, de ces après-midis devant « c'est pas sorcier » et des sorties au musée et à l'aquarium. Merci d'avoir cultivé chez moi la curiosité et le goût du savoir. J'aurais aimé que tu puisses lire ce travail que je te dédie. Tu me manques.

RESUME

Titre : Role des neurones a ocytocine dans le developpement du systeme melanocortinergique et nouvelles perspectives sur les modèles murins du syndrome de Prader-Willi

Le syndrome de Prader-Willi (SPW) est une maladie résultante de l'absence de sept gènes d'origine paternelle qui se manifeste par un développement complexe marqué par un spectre de traits phénotypiques tout au long de la vie. Malgré de nombreux essais cliniques, il n'existe pas de traitements efficaces pour le SPW, principalement en raison d'une compréhension limitée de ses mécanismes physiopathologiques et du manque de modèles adaptés. Parmi les gènes inactivés dans le SPW, *NECDIN* et *MAGEL2* sont particulièrement intéressants. Les modèles murin KO pour ces gènes présentent des phénotypes distincts mais ne parviennent pas à reproduire l'ensemble du phénotype du SPW. *NECDIN* et *MAGEL2* appartiennent à la famille MAGE. Leurs fonctions moléculaires et leurs profils d'expression suggèrent une compensation de l'un par l'autre. L'objectif général de cette thèse est d'explorer les mécanismes génétiques et neurodéveloppementaux du SPW. Le premier objectif est de caractériser le phénotype d'un nouveau modèle murin, appelé *Madin* KO, présentant une délétion des gènes *MAGEL2* et *NECDIN*. À travers cette double délétion, nous souhaitions abolir les mécanismes compensatoires entre ces deux gènes pour mieux reproduire le phénotype et les interactions génétiques impliquées dans le SPW. Les souris *Madin* KO présentent un retard de croissance et de puberté ainsi que des difficultés respiratoires et de succion, ressemblant au stade précoce du SPW. Elles combinent également les phénotypes métaboliques et comportementaux retrouvés dans les modèles simples KO et présentent une altération de la maturation de l'ocytocine (OT) associée à un développement perturbé du système mélanocortinergique, deux systèmes neuronaux connus pour jouer un rôle critique dans la régulation de la prise alimentaire. L'OT joue un rôle essentiel dans la régulation du comportement alimentaire et des interactions sociales, des éléments impactant les personnes atteintes du SPW. L'OT est devenue une voie thérapeutique prometteuse, grâce à des travaux rapportant un effet bénéfique de l'OT sur la régulation de l'appétit, en particulier lorsqu'elle est administrée tôt chez les patients atteints du SPW. Il est reconnu qu'une mauvaise programmation des systèmes neurobiologiques au cours de périodes critiques peut entraîner des troubles métaboliques et comportementaux à l'âge adulte. De plus, les souris *Magel2* et *Madin* KO présentent des altérations dans le développement du système mélanocortinergique. Ces observations suggèrent que l'OT pourrait jouer un rôle dans le développement des circuits issus de neurones à proopiomélanocortine (POMC) et agouti-related peptide (AgRP). Par conséquent, le second objectif de cette thèse est d'étudier l'influence des neurones à OT sur le développement du système mélanocortinergique et de déterminer s'il existe une période critique pour ces effets. Nos résultats montrent que la chémoinhibition des neurones à OT durant la première semaine post-natale, mais pas à l'adolescence ni à l'âge adulte, altère la mise en place des projections des neurones à POMC et d'AgRP spécifiquement vers le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Cet effet est dépendant de la libération par exocytose et médié par la signalisation de l'OT : la destruction génétique des composants du complexe SNARE dans les neurones à OT ou l'inhibition pharmacologique des récepteurs à l'OT altère également le développement des circuits mélanocortinergiques. Enfin, la chémoactivation des neurones OT chez les souris *Magel2* KO restaure les projections des neurones à POMC, indiquant que les dysfonctionnements de cette signalisation contribuent aux perturbations neurodéveloppementales observées chez ces souris. Collectivement, nos travaux ont permis de caractériser un nouveau modèle plus représentatif du SPW et de souligner un rôle nouveau de l'OT dans le développement des réseaux hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire durant la première semaine de vie postnatale.

ABSTRACT

Title: Role of oxytocin neurons in the development of the melanocortin system and new perspectives on mouse models of Prader-Willi syndrome

Prader-Willi syndrome (PWS) is a disorder resulting from the absence of seven paternally inherited genes, resulting in a spectrum of phenotypic traits throughout life. Despite numerous clinical trials, there are no effective treatments for PWS, mainly due to a limited understanding of its pathophysiological mechanisms and the lack of suitable models. Among the genes inactivated in PWS, *NECDIN* and *MAGEL2* are of particular interest. KO mouse models for either of these genes show distinct phenotypes, but fail to reproduce the full PWS phenotype. *NECDIN* and *MAGEL2* belong to the MAGE family, and their molecular functions and expression profiles suggest compensation of one by the other. The overall goal of this thesis is to explore the genetic and neurodevelopmental mechanisms of PWS. The first objective is to characterize the phenotype of a new mouse model of PWS, called *Madin* KO, presenting a deletion of both *MAGEL2* and *NECDIN* genes. Through this double deletion, we aimed at abolishing the compensatory mechanisms between these two genes to better mimic the phenotype and genetic interactions involved in PWS. *Madin* KO mice display delayed growth and puberty, as well as respiratory and sucking difficulties, resembling the early stage of PWS. They also combine the metabolic and behavioral phenotypes found in single KO models and show impaired oxytocin (OT) maturation associated with disrupted development of the melanocortinergic system, two neuronal systems known to play a critical role in regulating food intake. OT plays an essential role in the regulation of eating behavior and social interactions, each of which impacting life of individuals with PWS. OT has emerged as a promising avenue for PWS research, with work reporting a beneficial effect of OT treatment on appetite regulation, particularly when administered during early in life. It is well known that abnormal programming of neurobiological systems during critical periods of life could lead to metabolic and behavioral disorders in adulthood. Furthermore, *Magel2* and *Madin* KO mice show alterations in the development of the melanocortinergic system. These observations suggest that OT may play a role in the development of proopiomelanocortin (POMC) and agouti-related peptide (AgRP) circuits. Therefore, the second aim of this thesis is to study the influence of OT neurons on the development of the melanocortinergic system and to determine whether there is a critical period for these effects. Our results show that the chemoinhibition of OT neurons during the first postnatal week, but not during adolescence or adulthood, alters the development of neural projections from POMC and AgRP neurons specifically to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. This effect is dependent on exocytosis release and mediated by OT signaling: genetic destruction of the SNARE complex in OT neurons or pharmacological inhibition of OTR alters the development of melanocortinergic circuits. Finally, chemoactivation of OT neurons in the *Magel2* KO model restores projections from POMC neurons, indicating that dysfunctions in OT signaling contribute to the neurodevelopmental disturbances observed in PWS models. Collectively, our work helped characterize an animal model more relevant to PWS and revealed a novel role for OT in influencing the development of hypothalamic circuits controlling food intake during a neonatal critical period.

SOMMAIRE

ABREVIATIONS **1**

LISTE DES FIGURES **4**

INTRODUCTION **5**

1. LE SYNDROME DE PRADER-WILLI **5**

1.1. EPIDEMIOLOGIE ET ETIOLOGIE 5
1.2. DESCRIPTION CLINIQUE ET SYMPTOMES 7
1.2.1. Phase anténatale *7*
1.2.2. Phase néonatale *8*
1.2.3. Petite enfance *8*
1.2.4. Enfance et adolescence *9*
1.2.5. Âge adulte *9*
1.3. DIAGNOSTIC 10
1.4. TRAITEMENT 11
1.4.1. Symptômes comportementaux *11*
1.4.2. Retard de croissance *11*
1.4.3. Retard pubertaire *11*
1.4.4. Poids et troubles du comportement alimentaire *12*
1.5. PHYSIOPATHOLOGIE 12

2. MODELES ANIMAUX DU SPW **13**

2.1. MODELE DE PERTE DE FONCTION *MKRN3* 14
2.2. MODELE DE PERTE DE FONCTION *SNURF/SNRPN* 15
2.3. MODELE DE PERTE DE FONCTION DE *SNORD116* 16
2.4. MODELE DE PERTE DE FONCTION *MAGEL-2* 18
2.5. MODELE DE PERTE DE FONCTION *NECDIN* 20
2.6. RESUME DES LIMITATIONS DES MODELES MURINS DU SPW 22

3. LA PISTE DE L'HYPOTHALAMUS **23**

3.1. ROLE DE L'HYPOTHALAMUS DANS LA REGULATION DE LA CROISSANCE 26
3.2. ROLE DE L'HYPOTHALAMUS DANS LA REGULATION DE LA FONCTION DE REPRODUCTION 27
3.3. ROLE DE L'HYPOTHALAMUS DANS LA REGULATION DE LA BALANCE ENERGETIQUE ET LE CONTROLE DU METABOLISME 30
3.3.1 L'ARH *31*
3.3.2. Contrôle hormonal *34*
3.3.4. Développement du système régulant la prise alimentaire. *39*
3.3.5. Altération du système mélanocortinergique dans le SPW *44*
3.4. CONCLUSION SUR LE ROLE DE L'HYPOTHALAMUS 45

4. LE SYSTEME OCYTOCINERGIQUE **46**

4.1. PERCEPTIVE HISTORIQUE ET GENERALITES 46
4.1.1. Historique *46*
4.1.2. Structure *47*
4.1.3. Génétique *47*
4.1.4. Synthèse *49*
4.1.5. Développement des neurones à ocytocine *50*
4.2. ROLES DE L'OCYTOCINE 54
4.2.1. Implication de l'ocytocine dans les comportements sociaux *54*
4.2.3. Implication de l'ocytocine dans les fonctions de la reproduction *59*

4.2.4. Implication de l'ocytocine dans les fonctions de la mémoire *64*
4.2.5. Implication de l'ocytocine dans le contrôle de la prise alimentaire et la dépense énergétique *65*
4.3. ALTERATION DU SYSTEME OCYTOCINERGIQUE DANS LE SYNDROME DE PRADER-WILLI 71
4.4. THERAPIE PAR INJECTION INTRANASALE D'OCYTOCINE ET SYNDROME DE PRADER-WILLI 72
4.4.1. Injection intranasale d'OT chez l'adolescent et l'adulte *73*
4.4.2. Injection intranasale d'OT chez l'enfant *74*
4.4.3. Injection intranasale d'OT chez le nourrisson *75*
5. LIENS ENTRE L'OCYTOCINE ET LE SYSTEME MELANOCORTINERGIQUE : HYPOTHESE DES EFFETS NEURODEVELOPPEMENTAUX DE L'OCYTOCINE 77

OBJECTIFS 79

RESULTATS 82

1. CARACTERISATION PHENOTYPIQUE D'UN NOUVEAU MODELE DE SOURIS DU SYNDROME DE PRADER-WILLI AVEC INVALIDATION GENETIQUE DE *MAGEL2* ET DE *NECDIN* 82
Préambule *82*
Résultats remarquables *85*
2. LA LIBERATION VESICULAIRE DE L'OCYTOCINE FAVORISE LE DEVELOPPEMENT DU CIRCUIT MELANOCORTINERGIQUE AU COURS D'UNE PERIODE CRITIQUE NEONATALE 154
Préambule *154*
Résultats remarquables *195*

DISCUSSION 198

CONCLUSION 212

VALORISATION DE LA THESE ET ACTIVITES SUPPLEMENTAIRES 214

1. PUBLICATIONS 214
2. PRESENTATIONS EN CONGRES 215
2.1 Orales *215*
2.3 Affichées *215*
3. ENCADREMENTS TECHNIQUES D'ETUDIANTS 215
4. ENSEIGNEMENTS 216
5. MEDIATIONS SCIENTIFIQUES : 217

BIBLIOGRAPHIE 218

ABSTRACT 244

RESUME 245

ABREVIATIONS

ACB	Noyau accumbens
ACTH	Hormone adrénocorticotrope
AgRP	*Agouti-related peptide*
AHA	Aire antérieur hypothalamique
Akt	Protéine kinase B
ARH	Noyau arqué
ARN(m)	Acides ribonucléiques (messagers)
ATP10A	*Phospholipid-transporting atpase VA*
BLA	Amygdale basolatérale
BNTS	Noyau du lit de la stria terminalis
CART	*Cocaine-and-amphetamine-related transcript*
Cas9	CRISPR associated protein 9
CCK	Cholécystokinine
CEA	Amygdale centrale
CGI-C	Iimpression clinique globale de changement
ChR2	Channelrhodopsine-2
Cre	Enzyme recombinase de tyrosine dérivée du bactériophage P1
CREB	*C-AMP Response Element-binding protein*
CRH	Corticolibérine
CRISPR	*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
Dil	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DMH	Noyau dorso-médian
DMV	Noyau dorsal du nerf vague
DREADD	*Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*
DUM	Disomie uniparentale maternelle
E (x)	Jour de vie embryonnaire (x)
EOPS	Exempt d'organismes pathogènes spécifiés
ERK	*Extracellular signal-regulated kinases*
FISH	Hybridation in situ en fluorescence
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GABA	Acide gamma-aminobutyrique
GH	Hormone de croissance
GHIH	Somatostatine
GHRH	Hormone de libération de l'hormone de croissance
GI	Gastro-intestinaux
GLP-1	Peptide-1 de type glucagon
GnRH	Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
HHS	Hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HPG	Hypothalamo-hypophyso-gonadique
HPT	Hypothalamo-hypophyso-thyroïdien

iBOT	*Ot-Cre ::BoNT/B*
ICV	Intra cerebro-ventriculaire
IHC	Immunohistochimie
ipGTT	Test de tolérance au glucose injecté en intrapéritonéal
IPW	Gène à empreinte dans la région du syndrome de Prader-Willi
KISS1	Kisspeptine
KISS1R	*Kiss1-derived peptide receptor*
KO	*Knockout* (invalidation génique)
LacZ	Gène structurel de l'opéron lactose
LepRb	Récepteur de la leptine isoforme longue
LH	Hormone lutéinisante
LHA	Aire hypothalamique lateral
LoxP	Séquences palindromiques de 13 pb encadrant une région d'espacement de 8 pb
LPO	Aire préoptique latérale
LTP	Potentialisation à long terme
Madin	*Magel2* et *Necdin* double KO
MAGE	*Melanoma-associated antigen*
MageD1	*Melanoma-associated antigen D1*
MAGEL2	*Melanoma Antigen-subfamily like 2*
MC3R	*Melanocortin 3 receptor*
MC4R	*Melanocortin 4 receptor*
MC5R	*Melanocortin 5 receptor*
MCH	*Melanin-concentrating hormone*
MEA	Amygdale médiale
MKRN3/ZFP127	*Makorin Ring Finger Protein 3 / Zinc finger protein 127*
MPA	Aire préoptique médiane
MSH	*Melanocyte-stimulating hormone*
MSX	Répresseurs transcriptionnels à homéodomaine
MTII	Melanotan-II
nNOS	Oxyde nitrique synthase neuronal
NO	Monoxyde d’azote
NPY	Neuropeptide Y
NTS	Noyau tractus solitarius
OB	Bulbe olfactif
OT	Ocytocine
OTR	Récepteur à l’ocytocine
OTRA	Modèle pharmacologique d'inhibition des neurones à OT
P(x)	Jour de vie post-natal (x)
PeA	Aire périventriculaire antérieure
PeL	Aire périventriculaire tubérale
PeP	Aire periventriculaire posterieur
PePO	Aire préoptique périventriculaire
PFC	Cortex préfrontal
Pgk	Protéine kinase G

PHA	Aire hypothalamique posterieur
POMC	*Pro-opiomélanocortine*
PVH	Noyau paraventriculaire
PWscr	Région critique pour le syndrome de Prader-Willi
RCH	Aire rétrochiasmatique
REM	Sommeil paradoxal
RP3V	Aire périventriculaire rostrale
SCH	Noyau suprachiasmatique
Slc6a4	*Solute carrier family 6 member 4*
SMN	*Survival of motor neuron*
SNARE	*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein receptor*
SNORD	*Small nucleolar RNA*
SNRPN	*Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*
SNURF	*Snrpn upstream open reading frame*
SON	Noyau supra optique
SPW	Syndrome de Prader-Willi
SRS	Echelle de réactivité sociale
STAT3	*Signal transducer and activator of transcription 3*
SYS	Syndrome de Schaaf-Yang
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
TA	Aire tubérale
TDHA	Troubles de déficit de l'attention et d'hyperactivité
TRH	Thyréolibérine
TSA	Troubles du spectre autistique
TSH	Hormone stimulant la thyréostimuline
UBE3A	*Ubiquitin-protein ligase E3A*
UI	Unité internationale
VMH	Noyau ventro-médian
VP	Vasopressine
VTA	Aire tegmentale ventrale
WT	Souris de type sauvage

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Génétique du syndrome de Prader-Willi 6

Figure 2 : Evolution chronologique des symptômes du syndrome de Prader-Willi 7

Figure 3 : Carte génétique de la région synténique du syndrome de Prader-Willi sur le chromosome 7B/C de la souris.. 14

Figure 4 Organisation de l'hypothalamus. 24

Figure 5**:** Schéma des communications entre l'hypothalamus et hypophyse. 25

Figure 6 : Organisation des projections Agrp et Pomc dans l'hypothalamus médio-basal..... 38

Figure 7 : Périodes importantes du développement hypothalamique..... 43

Figure 8: Structure chimique de l'ocytocine. 47

Figure 9 : Organisation de la structure des gènes de l'ocytocine (OT) et de la vasopressine (VP) 48

Figure 10 : Développement postnatal des neurones à OT chez la souris exprimant le mTmG..... 50

Figure 11 : Schéma des projections des neurones à OT dans le cerveau de souris 52

Figure 12 : Région cérébrale du rongeur exprimant l'OTR. 53

Figure 13 : Objectifs de la thèse. 81

Figure 14 : Représentation graphique des conclusions de l'article 1. 153

Figure 15 : Représentation graphique des conclusions de l'article 2 197

Figure 16 : Gènes communs régulés à la baisse chez les patients atteints du syndrome de Prader-Willi et dans le modèle murin *Madin* KO 204

Figure 17 : L'inhibition chimiogénétique des neurones à ocytocine pendant la période juvénile et adulte induit des perturbations métaboliques chez les souris mâles..... 209

Figure 18 : Comparaison des zones labyrintique des placentas de souris *Magel2* KO et control..... 211

INTRODUCTION

1. Le Syndrome de Prader-Willi

1.1. Epidémiologie et étiologie

Le syndrome de Prader-Willi (SPW) est une affection génétique rare résultant d'anomalies spécifiques sur le chromosome 15 (15q11-13) (Figure 1, A). Décrit pour la première fois en 1956 par les médecins suisses Andrea Prader, Alexis Labhart et Heinrich Willi à l'Hôpital pédiatrique de Zurich (Prader, 1956), le SPW est caractérisé par divers symptômes physiques, mentaux et comportementaux. La prévalence de cette maladie est estimée à environ 1 cas pour 20 000 à 25 000 naissances, avec une variation allant de 1 sur 8 000 à 1 sur 30 000 selon différentes études. En 2016, on comptait environ 400 000 personnes atteintes de ce syndrome dans le monde, dont 2000 en France (Prader-Willi France, n.d.). Généralement due à des anomalies génétiques accidentelles et sporadiques, il est très rare que la maladie se manifeste à travers plusieurs générations dans une même famille. La maladie affecte indistinctement les enfants des deux sexes, ne montre pas de préférence pour une ethnie particulière et n'est pas héréditaire.

Dans le SPW, la majorité des cas (98%) résulte d'une anomalie génétique survenue durant le développement embryonnaire de l'enfant. Cependant, la région 15q11-q13 de ce chromosome est sujette à un phénomène particulier connu sous le nom d'empreinte génomique, où l'expression des gènes varie selon le parent à l'origine de l'allèle. En temps normal, les gènes situés dans la région 15q11-q13 du chromosome hérité du père sont actifs, tandis que les mêmes gènes sur le chromosome hérité de la mère sont sujet à méthylation les rendant inactifs ou « silencieux ». Cependant, chez les individus atteints du SPW, les gènes de cette région sur le chromosome paternel ne sont pas fonctionnels ou sont absents. Ce dysfonctionnement génétique peut survenir selon 4 mécanismes différents (Figure 1, B) :

1. La délétion de la région paternelle 15q11-q13 : C'est la cause la plus commune qui concerne 60-70% des cas, où tout ou une partie du chromosome paternel est absente.
2. La disomie uniparentale maternelle (DUM) : Dans 25-35% des cas, l'enfant hérite de deux copies du chromosome 15 de la mère et aucune du père. Cela entraîne l'absence de l'expression des gènes de la région 15q11-q13.

3. La mutation ou dysfonction de l'empreinte génétique : Dans 5% des cas, un défaut dans le mécanisme d'empreinte peut rendre les gènes paternels inactifs même s'ils sont physiquement présents.
4. La translocation ou réarrangement chromosomique : dans de très rares cas, un morceau de chromosome 15 peut être mal placé ou attaché à un autre chromosome, affectant la fonction des gènes.

Environ 20 gènes de la région 15q11-q13 sont soumis à ce phénomène d'empreinte et sont impliqués dans l'étiologie du SPW, dont les gènes *MKRN3*, *MAGEL2*, *NECDIN*, *SNURF-SNRPN* et *SNORD116* (Figure 1, A). Bien que des progrès significatifs aient été réalisés dans l'identification des gènes associés au SPW, le mécanisme exact par lequel l'absence d'expression de ces gènes conduit aux symptômes associés au SPW n'est pas encore compris.

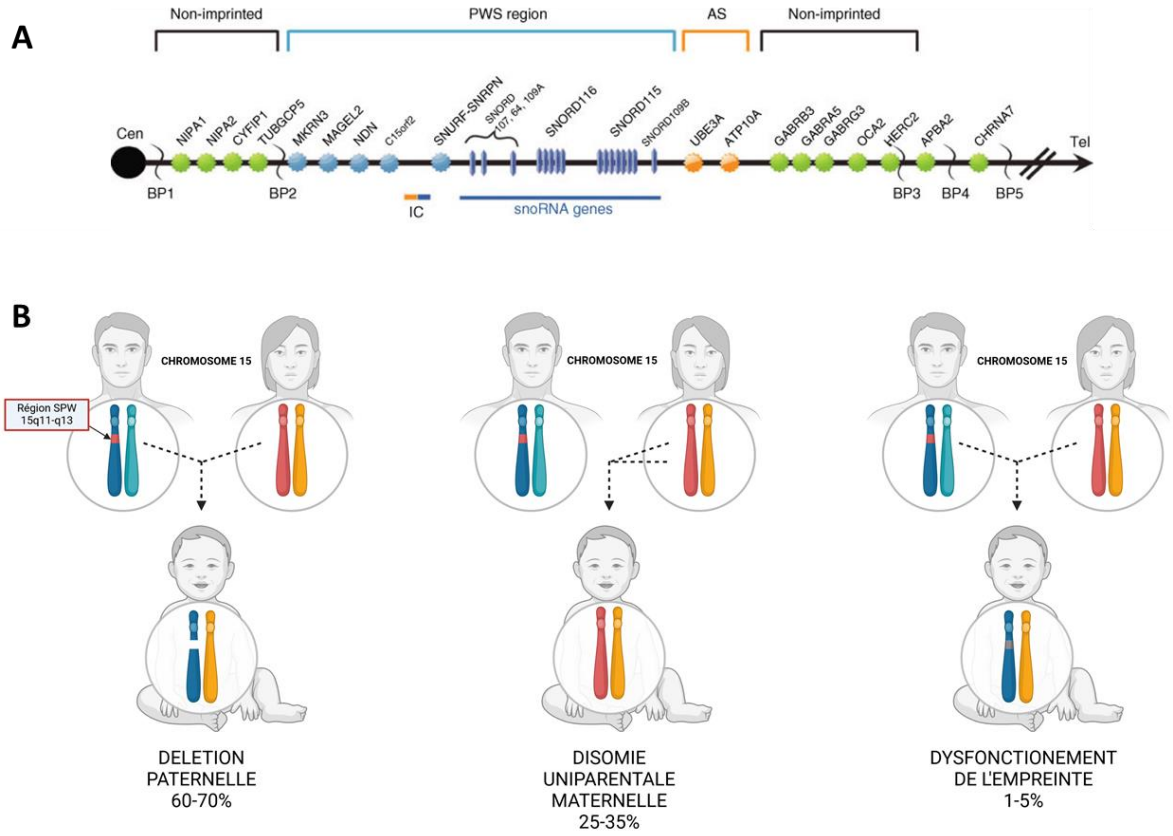


Figure 1 : Génétique du syndrome de Prader-Willi. A Résumé de la carte génétique et d'expression de la région chromosomique 15q11.2-q13. La région du syndrome de Prader-Willi (en bleu) comporte cinq gènes à copie unique exprimés uniquement par le père (région PWS) qui codent pour des polypeptides (*MKRN3*, *MAGEL2*, *NECDIN*, *SNURF-SNRPN* et *SNORD*) et une famille de six gènes snoRNA exprimés uniquement par le père. *UBE3A* et *ATP10A* (en orange) sont liés au syndrome d'Angelman et ne sont exprimés que dans l'allèle maternel. Adapté de (Cassidy, 2012) **B** Représentation schématique des dysfonctionnements des mécanismes génétiques conduisant au SPW. Fait avec BioRender.com

1.2. Description clinique et symptômes

Le SPW se caractérise par un large éventail de symptômes qui évoluent au cours du développement de l'individu et qui sont souvent divisés en 5 phases distinctes de la vie embryonnaire à l'âge adulte (Goldstone et al., 2008). Cette évolution séquentielle peut être décrite comme suit (Figure 2) :

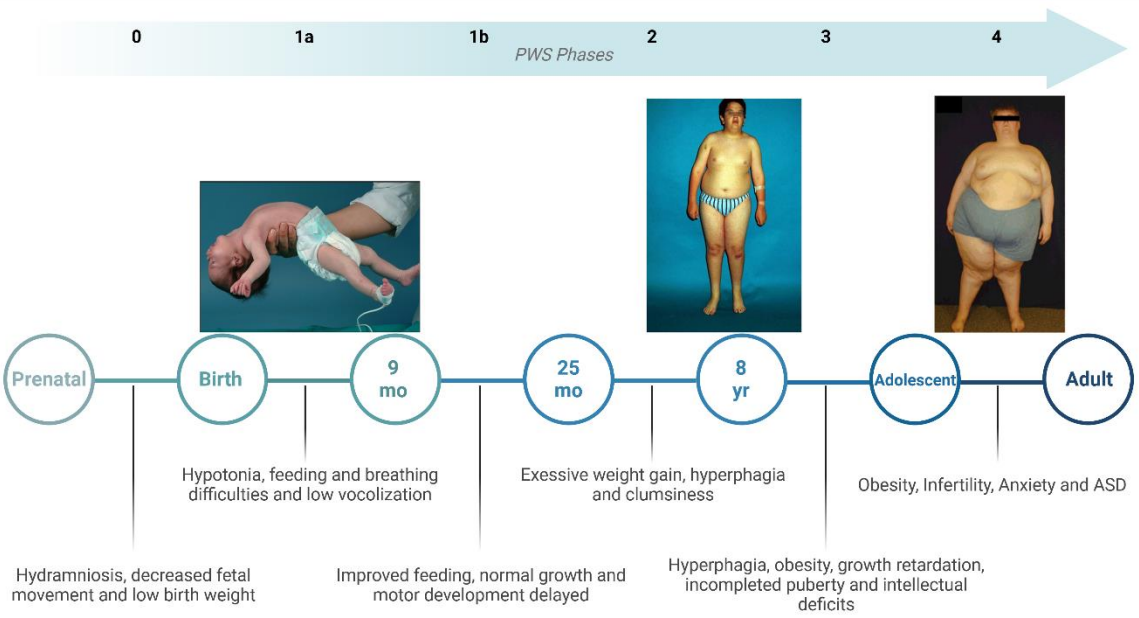


Figure 2 : **Evolution chronologique des symptômes du syndrome de Prader-Willi.** Photos de gauche à droite : Hypotonie chez un enfant atteint du syndrome de Prader-Willi (Munné-Miralvés et al., 2020), Caractéristiques physiques d'un adolescent atteint du Syndrome de Prader-Willi (Munné-Miralvés et al., 2020). Un homme de 19 ans avec un contrôle alimentaire inadéquat (indice de masse corporelle (IMC) = 67 ; Z score = +3,49) présentant un habitus corporel typique du syndrome de Prader-Willi (SPW) avec de la graisse répartie principalement au niveau de l'abdomen, des hanches et des cuisses. La publication de ces photographies a fait l'objet d'un consentement éclairé. Adapté de (Cassidy, 2012). Créé avec BioRender.com

1.2.1. Phase anténatale

Certaines manifestations du SPW peuvent être déjà présentes : diminution des mouvements du fœtus avec parfois un excès de liquide amniotique (hydramnios) et un petit poids à la naissance (Whittington et al., 2008).

1.2.2. Phase néonatale

À la naissance et pendant la période néonatale, jusqu'à 2 ans, les enfants atteints du SPW sont souvent décrits comme des « bébés mous » en raison de leur hypotonie musculaire (faiblesse musculaire) sévère. Cette hypotonie est associée à des troubles de la succion et de la déglutition entraînant des difficultés pour se nourrir et la plupart du temps une mauvaise prise de poids dans les premiers mois de vie. La plupart des nourrissons nécessitent une alimentation assistée, parfois par sonde gastrique, pour assurer une nutrition adéquate. Les bébés atteints du SPW sont remarquables par leur silence (les bébés pleurent mais sans cris). Les troubles de succion et la faiblesse des cris évoluent généralement en problèmes d'élocution (dysarthrie) et de mastication vers 2 ans. Le développement moteur des enfants est généralement retardé, avec l'acquisition de la marche se faisant souvent vers l'âge de 2 ans. Des infections respiratoires pendant l'enfance sont communes et liées à une faiblesse des muscles respiratoires et à des troubles de la respiration d'origine neurologique (Festen et al., 2007). Des traits caractéristiques du visage sont également présents (front étroit, yeux en amande, lèvre supérieure fine), associés à des pieds et des mains plus petits que la moyenne (acromicrie) (Angulo et al., 2015; Hurren and Flack, 2016).

1.2.3. Petite enfance

À mesure que l'enfant grandit, les problèmes d'alimentation s'améliorent puis peuvent s'inverser. Les enfants atteints du SPW prennent rapidement du poids puis développent un appétit excessif et ont tendance à trop manger (hyperphagie) (McAllister et al., 2011). Si l'apport calorique n'est pas soigneusement contrôlé, les enfants atteints du SPW ont un risque accru de développer de l'obésité. Lorsqu'ils commencent à devenir autonomes, la recherche de nourriture peut devenir une obsession et des traits comportementaux tels que l'entêtement, mensonges, vols, crises de colère, et des comportements obsessionnels-compulsifs peuvent également apparaître. L'hypotonie musculaire diminue généralement dans les premières années de vie mais il persiste une fatigue lors d'efforts physiques. Cette fatigue peut contribuer également à une certaine maladresse pour la réalisation d'actions demandant précision ou minutie.

1.2.4. Enfance et adolescence

Pendant cette période, l'appétit insatiable est toujours présent et des déficits intellectuels et les retards de développement deviennent plus évidents. Les enfants peuvent présenter des difficultés d'apprentissage, des troubles d'expression orale et une déficience intellectuelle légère à modérée (Whittington et al., 2004). Les problèmes comportementaux peuvent persister ou s'intensifier, et se manifestent principalement sous forme de crise de colère et/ou d'obsession et de rigidité. Les crises sont souvent violentes et déclenchées par de la frustration vis à vis de la nourriture ou par des changements générateurs de stress dans l'environnement. Des traits du spectre autistique sont parfois observés, les enfants ayant tendance à avoir des comportements obsessionnels, à être attachés à des rituels et des manies répétitives. Des troubles du sommeil apparaissent également durant cette période. Le développement pubertaire est absent ou incomplet : chez les garçons, les testicules peuvent rester dans l'abdomen, au lieu de descendre dans les bourses (cryptorchidie) et le pénis est anormalement petit (micropénis). Chez les filles, le clitoris et les petites lèvres sont peu développés, les règles sont retardées, irrégulières et de faible abondance, ou absentes. Un faible taux d'hormones sexuelles (œstrogènes chez la femme et testostérone chez l'homme) et également fréquent (Crinò et al., 2003). Un retard de croissance dû à un déficit en hormone de croissance entraîne, le plus souvent, une petite taille chez les enfants atteints de SPW (Burman et al., 2001).

1.2.5. Âge adulte

A l'âge adulte, l'appétit peut ne plus être insatiable mais les adultes atteints de SPW continuent de lutter contre l'obésité et ses complications associées, telles que le diabète, les maladies cardiovasculaires et œdèmes lymphatiques (lymphœdèmes). L'obésité est le principal facteur de morbidité chez ces patients (Proffitt et al., 2019; Schrander-Stumpel et al., 2004). Les défis intellectuels et comportementaux (colères, anxiété) persistent souvent et peuvent être invalidants pour l'insertion socioprofessionnelle, bien que certains individus puissent vivre de manière relativement indépendante avec un soutien approprié. Le désir de vie affective est très fort chez les personnes avec un SPW malgré une absence constatée de fertilité chez les hommes et quelques très rares cas de fertilité chez les femmes. 4 cas de grossesses ont été observés dans le monde fin 2020, deux enfants sur les quatre présentaient un syndrome d'Angelman, les deux autres ne présentaient pas d'anomalie génétique. Par contre, dans les quatre cas, les mamans n'ont pas été en mesure ni de nourrir leur enfant, ni de l'élever (Akefeldt et al., 1999; Greco et al., 2021; Schulze et al., 2001). Par ailleurs, la ménopause est souvent plus précoce, s'accompagnant d'une fragilité osseuse (ostéoporose) et d'un risque accru de fractures.

Bien que la plupart des patients présentent ce tableau clinique, il est à noter que la présence et la sévérité des symptômes varie grandement d'un patient à l'autre et dépend en partie du type d'altération génétique de la séquence 15q11-q13. Les patients atteints de DUM étant par exemple beaucoup plus à risque de développer des troubles du spectre de l'autisme ou des troubles psychotiques à l'adolescence (Boer et al., 2002). D'autres symptômes existent également en proportion plus faible au sein de la population des patients atteints du SPW. On peut citer par exemple des troubles de la vision (myopie, strabisme, astigmatisme, hypermétropie), des troubles dentaires et salivaires, une fragilité de la peau, une hyperghrélinémie et des problèmes de thermorégulation.

1.3. Diagnostic

Historiquement basé sur les critères décrits par Prader, Labhart et Willi (taille, retard mental, obésité, acromirie), le diagnostic du SPW a maintenant évolué pour mieux refléter son tableau clinique large, fixé par Holm et collègues (Holm et al., 1993). Le diagnostic du SPW se base premièrement sur un examen clinique dépendant de l'âge du patient. Les principaux évocateurs du diagnostic sont l'hypotonie, visible à la naissance, et les troubles comportementaux et de l'obésité et des retards de croissance, visibles pendant l'enfance et l'adolescence. La confirmation du diagnostic peut se faire par deux tests simples qui ne nécessitent qu'une prise de sang :

- Un test basé sur la technique de FISH (hybridation *in situ* fluorescente) qui permet d'établir définitivement le diagnostic de la délétion de la séquence 15q11-q13, dans 60-70% des cas, mais qui ne permet pas d'identifier les autres types de SPW.
- Une technique de biologie moléculaire qui consiste à étudier la méthylation de la région 15q permet d'identifier tous les types de SPW et constitue le test privilégié pour le diagnostic. Si un test de méthylation est effectué en premier, des tests supplémentaires peuvent être nécessaires pour déterminer si le SPW est causé par une délétion paternelle, une DUM ou une dysfonction d'empreinte.
- Un diagnostic anténatal par la technique FISH peut, dans des situations exceptionnelles, être proposé en cas de mouvement fœtaux anormaux ou d'hydramnios, auquel cas le test est réalisé sur des prélèvements du liquide amniotique (amniocentèse). Cependant, la découverte d'un SPW anténatal est généralement faite par hasard lors d'une amniocentèse réalisée pour une autre cause comme la recherche d'autre anomalie génétique plus courante.

1.4. Traitement

Il n'existe à ce jour aucun traitement pour le SPW, l'état actuel des connaissances scientifiques sur le développement de la maladie étant encore très limité. Cependant, des stratégies particulières existent et permettent d'améliorer la qualité de vie de la majorité des patients atteints du SPW et de leur permettre de vivre en relative autonomie. La prise en charge des patients commence dès la naissance et doit suivre l'évolution de la pathologie. L'implication active des parents est une nécessité et ceux-ci doivent également être accompagnés pour aider au mieux leur enfant.

1.4.1. Symptômes comportementaux

La physiothérapie dès la petite enfance favorise le développement des capacités motrices. L'anticipation des besoins de soutien éducatif et orthophonique est nécessaire. Des thérapies de gestion du comportement peuvent être proposées. En cas de problèmes graves, des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine peuvent être utilisés. Notamment lors de psychoses pouvant apparaitre à l'adolescence.

1.4.2. Retard de croissance

Des traitements à l'hormone de croissance (GH) sont utilisés aujourd'hui de façon standardisée pour ses effets bénéfiques sur la normalisation de la taille. Ce traitement permet également d'améliorer l'agilité et l'activité physique. Il n'y a actuellement pas d'indication de ce traitement chez les adultes, même si des études tendent à montrer que la poursuite à l'âge adulte du traitement pourrait être bénéfique pour un meilleur contrôle de l'indice de masse corporelle.

1.4.3. Retard pubertaire

Des traitements de substitution aux hormones sexuelles peuvent être envisagés pour permettre une puberté complète. Chez le garçon, ce traitement se fait par injection de testostérone et peut être associé à une chirurgie d'abaissement testiculaire. Chez la fille, le traitement aux œstrogènes et aux progestatifs peut être maintenu jusqu'à la ménopause pour lutter contre l'ostéoporose.

1.4.4. Poids et troubles du comportement alimentaire

Les problèmes de poids et de régulation des comportements alimentaires constituent des symptômes centraux et parmi les plus complexes du SPW. Ils ne sont pas seulement les plus difficiles à gérer, mais aussi les plus dangereux pour la santé des patients. Ces symptômes sont remarquables tant par leur intensité que par leur évolution au cours du développement du patient, et malheureusement, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents restent peu compris.

Les stratégies de traitement actuelles se concentrent principalement sur des solutions palliatives, notamment l'établissement d'un régime alimentaire spécialement adapté aux différentes phases du SPW. Dès la naissance, le régime vise à compenser les insuffisances nutritionnelles dues aux problèmes de succion. Plus tard et pour le reste de la vie, l'objectif se déplace vers le contrôle de l'hyperphagie pour prévenir l'obésité et les comorbidités qui y sont associées. Cependant, ces régimes alimentaires stricts peuvent souvent exacerber les symptômes comportementaux, en particulier en augmentant les sentiments de privation qu'ils engendrent chez les patients.

À ce jour, il n'existe pas d'autre traitement de substitution efficace pour ces aspects du SPW, et la gestion des symptômes reste un défi majeur pour les parents, les soignants et les professionnels de santé. Des recherches sont donc nécessaires pour mieux comprendre ces mécanismes et développer des thérapies plus efficaces et moins restrictives.

1.5. Physiopathologie

Les mécanismes physiopathologiques à l'origine du SPW restent en grande partie mystérieux à ce jour. La complexité de ce syndrome est exacerbée par le grand nombre de gènes impliqués, la variabilité des symptômes, et sa relative rareté, ce qui rend son étude clinique particulièrement ardue. Pour ces raisons, il est devenu essentiel de développer des modèles animaux pour approfondir notre compréhension de cette maladie.

2. Modèles animaux du SPW

Le modèle murin a rapidement capté l'attention des chercheurs. Les souris possèdent une région sur leur chromosome 7, spécifiquement la zone 7C, quasiment identique à la région humaine 15q11-q13. Cette zone chez la souris contient les gènes principaux du SPW homologues à ceux trouvés chez l'humain, qui sont également soumis au phénomène d'empreinte génétique. La conservation de l'organisation, de la structure et de l'empreinte des gènes entre l'humain et la souris implique probablement une fonction physiologique identique et font donc du modèle murin un outil approprié pour mieux comprendre le SPW (Bervini and Herzog, 2013).

Dès le début des années 90, deux modèles murins du SPW ont été développés. Le premier modèle a été produit par DUM (Cattanach et al., 1992) et le second par la délétion des séquences codant pour l'ensemble des gènes soumis à l'empreinte paternelle (Gabriel et al., 1999) (Figure 3.1). Ces modèles ont révélé des symptômes néonataux similaires à ceux observés chez les humains, tels qu'une faible activité de succion et un retard de croissance. Toutefois, un problème majeur est apparu : les souriceaux issus de ces modèles mouraient rapidement, généralement entre deux et huit jours après la naissance. Cette mortalité précoce limite considérablement l'utilité de ces modèles pour étudier l'ensemble de la pathogenèse du SPW, car elle empêche l'observation des effets à long terme et des symptômes qui apparaissent plus tard dans le développement. Pour pallier à ce problème, des modèles murins de perte de fonction des différents gènes encodés par la séquence 15q11-q13, *MKRN3*, *MAGEL2*, *NECDIN*, *SNORD116* et *SNURF-SNRPN* (Angulo et al., 2015; Hurren and Flack, 2016), ont été générés. La perte de chacun de ces gènes contribue différentiellement au phénotype SPW ; cependant, la signification de chacun n'est pas complètement comprise (Kummerfeld et al., 2021).

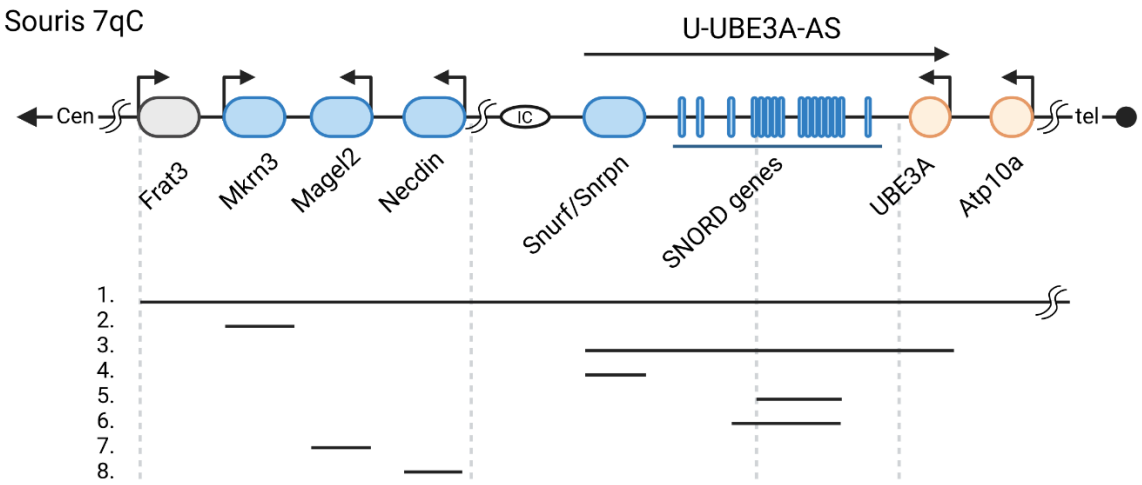


Figure 3 : Carte génétique de la région synténique du syndrome de Prader-Willi sur le chromosome 7B/C de la souris. (1) Suppression de l'ensemble de la région homologue du SPW (Gabriel et al., 1999). (2) Suppression de Mkrn3 (Li et al., 2020). (3) Suppression de *Snrpn* à *Ube3a* (Tsai et al., 1999b). (4) Suppression de Snrpn pour une revue extensive voir (Kummerfeld et al., 2021). (5-6) Suppression du groupe de gènes *Snord116* (Ding et al., 2008 ; Skryabin et al., 2007). (7) Suppression du gène *Magel2* (Kozlov et al., 2007 ; Schaller et al., 2010). (8) Suppression du gène *Necdin* (Gerard et al., 1999 ; Kuwako et al., 2005 ; Muscatelli et al., 2000 ; Tsai et al., 1999a). Créé avec BioRender.com à partir des travaux de (Bervini and Herzog, 2013; Kummerfeld et al., 2021).

2.1. Modèle de perte de fonction *Mkrn3*

MKRN3 (*Makorin RING-finger Protein 3*), initialement connu sous le nom de *Zfp127*, est impliqué dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HPG), remplissant une fonction essentielle dans le contrôle du moment de l'apparition de la puberté chez les mammifères. Ce gène code pour une protéine de 544 acides aminés qui fonctionne comme une ubiquitine ligase E3 putative et joue un rôle dans l'inhibition de la libération de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH), retardant ainsi le processus pubertaire (Abreu et al., 2013).

Dans le but de mieux comprendre le rôle de MKRN3 dans le SPW, des souris *knock-out* (KO) de l'allèle paternel ont été créées (Figure 3.2). Les observations de ces études ont révélé des différences distinctes dans le développement physique et la maturation reproductive chez les souris MKRN3 KO paternel *Mkrn3*$^{m+/p-}$. Les souris mâles *Mkrn3*$^{m+/p-}$ ont présenté une réduction de poids corporel du 15e jour postnatal (P15) au 60e jour (P60) par rapport à leurs homologues de type sauvage. Les souris femelles *Mkrn3*$^{m+/p-}$ présentaient un schéma de prise de poids biphasique : elles étaient plus lourdes que les femelles de type sauvage de P15 à P40, mais de P45 à P60, leur prise de poids a ralenti par rapport aux types sauvages. De plus, les souris KO mâles et femelles ont présenté un début de puberté plus précoce, attribué à une production accrue de GnRH, et les croisements de ces souris avec des femelles type sauvage

produit des petits dans les ratios mendéliens attendus, indiquant une fertilité et une viabilité normales des souris mutantes (Li et al., 2020).

Malgré ces résultats significatifs chez la souris, *Mkrn3* ne semble pas être un facteur majeur dans la pathogenèse chez la souris car il ne récapitule aucun des phénotypes reproductifs et métaboliques spécifique du SPW. Cependant, ces résultats améliorent notre compréhension des mécanismes régulant la puberté et peuvent aider à élucider les défauts moléculaires associés à l'hypogonadisme dans le SPW.

2.2. Modèle de perte de fonction *Snurf/Snrpn*

Le gène *SNURF/SNRPN* code pour deux protéines issues d'un transcrit bicistronique et joue un rôle complexe dans les troubles génétiques tels que le SPW. Hautement conservé chez l'Humain et la souris, le transcrit de ce gène s'étend sur 10 exons ; les exons 1 à 3 codent pour la protéine *Snurf* et les exons 4 à 10 codent pour un composant du complexe *SmN* (Glenn et al., 1996; Gray et al., 1999). Bien que la fonction spécifique de *Snurf* reste floue, le *SmN* est crucial pour le développement de la colonne vertébrale et du cortex cérébral et peut influencer des processus d'épissage alternatifs (Lee et al., 2014; Li et al., 2016)

Pour approfondir les fonctions de *SNURF/SNRPN* dans le SPW, plusieurs modèles de souris avec des délétions ciblées dans la région codante *Snurf/Snrpn* ont été développés (Figure 3.3). Les modèles avec de petites délétions ne présentaient pas de différences phénotypiques notables par rapport aux souris de type sauvage, présentant une fertilité et un développement typiques (Tsai et al., 1999b; Yang et al., 1998). En revanche, un modèle avec une délétion plus étendue de l'exon 2 *Snrpn* au gène *Ube3a* a présenté des déficits de développement importants. Ces souris présentaient un retard de croissance sévère, une hypotonie et de faibles réflexes de succion, avec seulement 20 % environ survivant jusqu'au sevrage, mimant ainsi la phase néonatale du SPW. Cependant, celle qui ont survécu ne présentaient pas d'obésité et conservaient un poids corporel inférieur à celui de leurs homologues de type sauvage (Tsai et al., 1999b).

Ces informations soulignent que même si la délétion de *SNURF/SNRPN* mime en partie le SPW, il n'est pas suffisant pour comprendre l'intégralité du développement physiopathologique du syndrome. Son rôle exact pourrait faire partie d'une interaction génétique plus large au sein de la région critique du SPW, suggérant une base génétique complexe pour le syndrome qui s'étend au-delà d'un seul gène ou d'une seule région.

2.3. Modèle de perte de fonction de *SNORD116*

Le gène *SNORD116* fait partie de la famille des gènes *SNORD* qui contient chez l'Humain les gènes *SNORD107, 64, 108, 109A/B, 116 et 115*. Ces *SNORD*s sont généralement produits à partir d'introns d'un long transcrit non-codant appelé *U-UBE3A-AS*. Les gènes *SNORD* sont relativement bien conservés chez la souris à l'exception des *SNORD108* et *109A/B* qui sont absents. L'expression de ces gènes chez la souris est limitée aux neurones, tandis que chez l'Humain, bien qu'ils soient principalement exprimés dans le cerveau, certains se retrouvent aussi dans d'autres tissus (Galiveti et al., 2014). L'intérêt pour *SNORD116* s'est intensifié en raison de sa présence répétée et significative au sein du locus 15q11-q13 (Cavaillé, 2017). Pour explorer le rôle fonctionnel de *SNORD116*, dans le SPW, deux modèles de perte de fonction ont été générés :

Modèle de délétion PWScr : Ce modèle comprend une délétion génomique d'environ 300 kb qui englobe le cluster *Snord116* et des gènes *Ipw-A* (Skryabin et al., 2007) (Figure 3.5). Les souris issues de ce modèle, désignées PWScr$^{m+/p-}$, présentent, malgré un développement embryonnaire normal, un retard de croissance notable dès le cinquième jour postnatal, qui persiste à l'âge adulte (1 an). Ce phénomène semble être lié à des capacités d'alimentation réduites peu après la naissance et est associé à une augmentation de 15% de la mortalité postnatale. Cependant, à l'âge adulte, les souris survivantes ne développent pas d'obésité et ne semblent pas présenter de problèmes de fertilité (Skryabin et al., 2007). Des études d'imagerie ont révélé une réduction du volume de la matière grise dans des régions clés comme l'hippocampe ventral et le septum. Sur le plan neurologique, il a été observé une diminution de 60 % du nombre des neurones exprimant l'orexine ainsi qu'une perturbation du sommeil REM, ce qui pourrait expliquer certains des troubles du sommeil associés au SPW. En outre, plus de 4 000 gènes présentent une expression différentielle dans l'hypothalamus de ces souris, affectant la neurotransmission, l'organisation synaptique et les voies des cytokines (Pace et al., 2020).

Modèle de délétion *Snord116*del : Ce modèle présente une délétion légèrement plus grande d'environ 350 kb qui supprime un segment en amont par rapport au modèle de PWScr, incluant le cluster de *Snord116* (Ding et al., 2008) (Figure 3.6). Les souris portant cette délétion paternelle, *Snord116*del$^{m+/p-}$, montrent également un retard de croissance dès le deuxième jour postnatal et ne développent pas d'obésité. De plus, il est intéressant de noter que sous un régime riche en graisses, ces souris présentent des pourcentages de graisse corporelle significativement inférieurs à ceux des WT après quatre mois. Malgré cette résistance à l'obésité, les premières

études indiquaient une augmentation relative de la prise alimentaire après ajustement au poids corporel, ce qui était interprété comme une hyperphagie (Ding et al., 2008). Cette observation a ensuite été complétée par des découvertes d'une régulation énergétique nycthémérale altérée. En effet à l'âge adulte, les souris *Snord116*del$^{m-/p-}$ montraient des niveaux d'activité réduits pendant la phase sombre de 12 heures et à l'inverse une dépense énergétique accrue pendant la phase lumineuse associée à des modifications des taux d'échanges respiratoires, résultant d'une augmentation de l'oxydation des graisses plutôt que des glucides. De plus, ces souris démontrent une tolérance au glucose et une sensibilité à l'insuline améliorées à mesure qu'elles vieillissent (Powell et al., 2013; Qi et al., 2016). Ceci est couplé à une réduction notable de l'expression des gènes critiques du développement pancréatique et une diminution de la taille des îlots pancréatiques, affectant ainsi la production et la sécrétion d'insuline (Burnett et al., 2017).

Les modèles de souris portant des délétions du gène *Snord116* ont apporté des informations précieuses sur les conséquences fonctionnelles de la perte de fonction des SNORD dans le contexte du SPW. En particulier, *SNORD116* semble jouer un rôle crucial dans les troubles du sommeil observés chez les patients atteints de SPW. Toutefois, malgré leur pertinence pour étudier certains aspects neurologiques et comportementaux du SPW, ces modèles ne parviennent pas à reproduire le phénotype métabolique d'obésité typique des patients et même inversement, les souris avec délétion de *Snord116* présentent plutôt une résistance à l'obésité. Cependant, une étude récente a montré que la suppression de l'expression de *Snord116* spécifiquement dans l'hypothalamus médio-basal chez les souris adultes, entraîne une hyperphagie entre 9 et 10 semaines après l'interruption, avec un sous-ensemble d'animaux développant une obésité marquée. Ce phénotype particulier souligne la complexité des mécanismes régulateurs impliqués dans le SPW et suggère que d'autres facteurs génétiques ou épigénétiques pourraient contribuer de manière plus significative aux manifestations métaboliques de la maladie (Polex-Wolf et al., 2018) .

2.4. Modèle de perte de fonction *Magel-2*

MAGEL2, ou *Melanoma Antigen-subfamily like 2*, est un gène sans intron. Il code pour une protéine de 529 acides aminés chez l'Humain (525 chez la souris), qui présente une similarité de séquence d'environ 51% avec *NECDIN*. Cette protéine agit comme un amplificateur de ligase E3 ubiquitine, jouant un rôle clé dans le trafic des protéines endosomales du rétromère (Doyle et al., 2010; Lee et al., 2000). Chez l'Humain, les mutations inactivatrices du gène *MAGEL2* sont associées au syndrome de Schaaf-Yang (SYS), qui partage plusieurs symptômes avec le SPW, tels que l'hypotonie néonatale, des difficultés d'alimentation, un retard de développement, l'hypogonadisme, et des déficiences intellectuelles, souvent accompagnées de traits liés aux troubles du spectre autistique (TSA) (McCarthy et al., 2018; Schaaf et al., 2013). La protéine MAGEL2 est exprimée dans l'hypothalamus et joue un rôle dans le développement du cerveau, potentiellement important pour la différenciation ou la maintenance neuronale ainsi que la croissance axonale (Lee et al., 2000; Maillard et al., 2016; Meziane et al., 2015). Elle est également impliquée dans la régulation des rythmes circadiens et est associée au risque de TSA (Meziane et al., 2015; Schaaf et al., 2013). Plusieurs modèles de souris déficientes en *Magel2* ont apporté des informations essentielles sur les fonctions physiologiques de ce gène et son implication dans les symptômes associés au SPW (Figure 3.7) :

Modèle *Magel2*$^{m+/p-}$: Ce premier modèle a été généré par remplacement de la partie C-terminale du gène *Magel2* par un rapporteur *LacZ* induisant la perte de fonction de la protéine Magel2, cependant le promoteur et la partie terminale du gène reste intacte (Kozlov et al., 2007). Les souris issues de cette lignée présentent une mortalité postnatale d'environ 10%, ainsi qu'un retard de croissance conduisant à une légère diminution du poids corporel jusqu'au sevrage (vers P28). Après le sevrage, ces souris atteignent un poids corporel similaire à celui de leurs contrôles de type sauvage, bien que présentant un pourcentage de graisse corporelle plus élevé et une masse maigre ainsi que des fibres musculaires et une masse osseuse diminuées (Baraghithy et al., 2019; Bischof et al., 2007; Kozlov et al., 2007). Les souris *Magel2*$^{m+/p-}$ présentent des perturbations dans la régulation du glucose et du cholestérol, des signes de résistance à l'insuline et à la leptine, une réponse altérée à la ghréline, des concentrations élevées d'adiponectine et de corticostérone, un dysfonctionnement de l'axe de l'hormone de croissance, et un signal de mélanocortine altéré associé à une diminution de l'expression de l'ocytocine (OT), dopamine, sérotonine et orexine (Ates et al., 2019; Bischof et al., 2007; Kozlov et al., 2007; Luck et al., 2016; Maillard et al., 2016; Mercer et al., 2013; Mercer and Wevrick, 2009; Oncul et al., 2018; Wijesuriya et al., 2017). Le comportement alimentaire est également modifié

chez ces souris, avec des augmentations notables de la taille des portions et de la durée des repas (Igarashi et al., 2017). Les souris *Magel2*$^{m+/p-}$ tendent à être moins actives (Kozlov et al., 2007; Mercer and Wevrick, 2009) et elles manifestent une anxiété accrue et des troubles du comportement social (Fountain et al., 2017) . Chez les femelles, un retard dans le début de la puberté et des cycles oestraux irréguliers sont observé, tandis que les mâles présentent une diminution de la préférence olfactive pour les odeurs féminines et une baisse significative des niveaux de testostérone (Mercer and Wevrick, 2009).

Modèle *Magel2*$^{tm1.1Mus}$: Ce second modèle, créé sur un fond génétique 129Sv/Pas et par la suite rétrocroisé sur C57Bl6/J, a été généré par délétion du promoteur et de 75% de partie codante du gène *Magel2*. Les souris issues de cette lignée ont montré une mortalité accrue (~50%) due à une activité de succion faible ou absente (Schaller et al., 2010). Les mutants présentaient également des déficiences dans le comportement social et les capacités d'apprentissage (Meziane et al., 2015), ainsi que des troubles dans la production de neuropeptides hypothalamiques comme l'OT et l'orexine-A (Meziane et al., 2015). De plus, ces souris ne développent pas d'obésité à l'âge adulte mais présentent des troubles de la fertilité au-delà de 1 an.

Modèle de troncature du gène *Magel2*, trMagel2 : Les souris hétérozygotes portant le gène *Magel2* tronqué n'affichaient aucun phénotype notable immédiatement après la naissance. Cependant les souris *Magel2*$^{m+/p-tr}$ étaient plus légères que les souris type sauvage mais rattrapaient rapidement ce retard de poids après 8 semaines (Ieda et al., 2020).

En conclusion, les souris dépourvues de *Magel2* miment certains aspects fondamentaux des premiers stades du SPW mais aucun de ces modèles n'a développé les symptômes plus graves des stades ultérieurs du SPW, tels que l'obésité sévère combinée à l'hyperphagie. Cependant, le rôle de *Magel2* dans les voies de synthèse de plusieurs hormones et neurotransmetteurs au niveau de l'hypothalamus suggère qu'il contribue de manière importante aux mécanismes physiopathologiques des symptômes associés au SPW et au SYS.

2.5. Modèle de perte de fonction *Necdin*

Le gène *NECDIN* code pour une protéine de 321 acides aminés faisant partie de la famille MAGE et partage 51% de similarité avec *MAGEL2*. Il est impliqué dans la survie cellulaire, le maintien du rythme circadien, la migration et la croissance neuronale (Lu et al., 2020; Tennese et al., 2008). Les symptômes neurologiques observés chez les patients atteints du SPW suggèrent un rôle fonctionnel du *NECDIN* dans la pathophysiologie de cette maladie. Plusieurs modèles de perte de fonction du gène *NECDIN* ont été générés pour tenter de comprendre son rôle dans le développement pathologique du SPW (Figure 3.8).

Modèle *Necdin*^{tm1Alb} : Dans ce premier modèle, la région codante et le promoteur de *Necdin* ont été remplacés par un rapporteur β-galactosidase. Les souris résultantes, dépourvues de l'expression de *Necdin*, ne présentaient aucun phénotype typique du SPW. Elles étaient viables et fertiles, avec un poids corporel similaire aux souris de type sauvage et ne développaient pas d'obésité jusqu'à l'âge de 10 mois (Tsai et al., 1999a)

Modèle *Necdin*^{tm2Stw} : Le second modèle a été produit par fusion des 31 premiers codons de *Necdin* avec un rapporteur *LacZ* (Gérard et al., 1999). Les descendants hétérozygotes, en particulier les souris mâles, présentaient une mortalité postnatale variable due à des problèmes respiratoires, allant de 25% à 95% et ce de façon dépendante de la souche d'origine FVB ou C57BL/6 (Ren et al., 2003; Zanella et al., 2008). Les souris survivantes ne présentaient aucun phénotype détectable, ne développaient pas d'obésité jusqu'à 10 mois d'âge et étaient fertiles.

Modèle *Necdin*$^{tm1.1Mus}$: Le troisième modèle de souris KO pour le gène *Necdin* a été créé en remplaçant le promoteur et les deux tiers de la séquence codante N-terminale par une cassette Neo encadrée de sites *LoxP* (Muscatelli et al., 2000). Cette cassette a été ensuite excisée par croisement avec des femelles C57Bl6/J exprimant la recombinase *Cre*. Les nouveau-nés hétérozygotes ont présenté un taux de mortalité de 21 à 31 % causé par des problèmes respiratoires (Muscatelli et al. 2000). Les souris survivantes étaient fertiles, affichaient un développement normal et ne développaient pas d'obésité à l'âge adulte. Les souris *Necdin*$^{m+/p-}$ ont montré une diminution notable des neurones produisant de l'OT et de la GnRH dans l'hypothalamus. Les souris déficientes pour *Necdin* présentaient un rythme circadien stable, des capacités motrices normales et ne montraient pas de comportement anxieux, mais excellaient dans les tests d'apprentissage spatiaux et de mémoire. De manière remarquable, le comportement de grattage cutané était nettement augmenté chez les souris *Necdin*$^{m+/p-}$ par rapport aux contrôles de type sauvage. Les souris *Necdin*$^{m+/p-}$ ont également montré une forte

augmentation de l'expression de *Slc6a4* (transporteur de la sérotonine), conduisant à une augmentation de la recapture de la sérotonine et donc à une diminution des niveaux de sérotonine extracellulaire, provoquant des difficultés respiratoires (Matarazzo et al., 2013; Rieusset et al., 2013).

Modèle *Necdin*^{tm1Ky} : Ce modèle utilisait une cassette Pgk/NeoR insérée dans le gène *Necdin* pour interrompre sa séquence codante (Kuwako et al., 2005). Les souriceaux hétérozygotes *Necdin*$^{m+/p-}$ n'ont montré aucune augmentation de la mortalité postnatale, étaient fertiles et se reproduisaient selon le ratio mendélien normal. De façon intéressante, les souris *Necdin*$^{m+/p-}$ présentent une meilleure tolérance à la douleur entre 2 et 4 semaines de vie post-natale. De plus le déficit en *Necdin* déclenchait, au stade embryonnaire E12,5, l'apoptose dans les ganglions de la racine dorsale en développement et conduisait à une réduction significative du nombre total de neurones à la naissance. Une hypotonie légère et une mauvaise tolérance à l'hypercapnie ont été également rapporté pour les petits *Necdin*$^{m+/p-}$ âgés de moins de 2 semaines (Wu et al., 2020).

Modèle *Necdin*-KO : Récemment, un modèle de souris déficient en *Necdin* a été généré en utilisant l'édition génomique CRISPR/Cas9, avec une délétion de 1349 pb dans le gène *Necdin* sur une souche C57BL/6. L'absence de la protéine *Necdin* déstabilisait un composant clé de l'horloge circadienne, entraînant des altérations de l'expression des gènes de l'horloge par rapport aux souris de type sauvage (WT) et un rythme circadien instable (Lu et al., 2020).

Ces modèles de souris *Necdin* ont réussi à reproduire à la fois les phénotypes liés aux troubles respiratoires et du sommeil du SPW, ce qui les rend intéressants pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques, étant donné que la défaillance respiratoire est la cause la plus courante de décès chez les nourrissons et les enfants diagnostiqués avec le SPW (Butler et al., 2017). Cependant, ces modèles ne reproduisent toujours pas l'obésité sévère combinée à l'hyperphagie caractéristique des stades les plus avancés du SPW et ne constituent donc toujours pas un modèle parfait pour la compréhension de la physiopathologie de ce syndrome.

2.6. Résumé des limitations des modèles murins du SPW

En résumé, la création de modèles de souris représentant avec précision le SPW est un défi en raison de la complexité de la région génétique 15q11.2–q13, qui s'étend sur plus de 1,5 Mb et qui contient plusieurs gènes. Malgré des recherches approfondies menées au cours des deux dernières décennies, nous manquons toujours d'un modèle de perte totale de fonction dans la région 15q11.2-q13 viable. Les modèles de perte de fonctions des gènes individuels de cette région contribuent de manière variable au phénotype SPW et leurs rôles spécifiques ne sont pas entièrement compris (Kanber et al., 2009). Actuellement, il manque un modèle animal complet qui reflète l'ensemble des symptômes du SPW, en particulier la deuxième phase caractérisée par l'obésité et l'hyperphagie. Les preuves étayant un phénotype d'obésité hyperphagique apparaissant à l'âge adulte dans les modèles murins ne sont pas concluantes et des résultats contradictoires ont été rapportés. Pourtant, cette lacune dans la modélisation est critique car l'obésité et ces comorbidités restent les facteurs de risque les plus importants pour la santé des personnes atteintes du SPW (Proffitt et al., 2019).

L'absence d'un phénotype d'obésité robuste dans les modèles peut être due aux interactions entre plusieurs gènes au sein de la région PWS et, par conséquent, l'inactivation d'un seul gène peut ne pas reproduire efficacement la maladie. Pour résoudre ce problème, de nouveaux modèles sont nécessaires pour explorer diverses combinaisons de délétions de gènes au sein du locus SPW afin de déterminer si les interactions entre ces gènes peuvent conduire à un phénotype qui ressemble davantage au SPW humain. *MAGEL2* et *NECDIN* présentent un intérêt particulier dans cette recherche, étant donné leur homologie de séquence et leurs modèles similaires d'expression cérébrale, ce qui suggère des mécanismes compensatoires potentiels en cas de suppression. **Par conséquent, une première partie de ma thèse vise à caractériser le phénotype d'un nouveau modèle de souris avec des délétions de *Magel2* et *Necdin* afin de déterminer si leur perte combinée reflète plus précisément le phénotype du SPW.**

3. La piste de l'hypothalamus

Les caractéristiques phénotypiques du SPW ainsi que les altérations hormonales et neuronales retrouvées dans les modèles animaux ont rapidement orienté l'attention de la communauté scientifique vers une région spécifiques du cerveau : l'hypothalamus.

L'hypothalamus joue un rôle central dans le maintien de l'homéostasie du corps en agissant comme le principal relai entre le système nerveux central et le système endocrinien. Situé sous le thalamus, juste au-dessus du chiasma optique, l'hypothalamus s'étend de la lame terminale jusqu'à la zone périaqueducale. Il est traversé par le troisième ventricule, dont il forme une partie des parois latérales. L'hypothalamus est composé de divers groupements de cellules organisées en noyaux et en aires réparties en quatre zones principales le long d'un axe antéro-postérieur : la région antérieure, la région médiane, et la région postérieure.

La région préoptique : ou région pré-chiasmatique, en référence à sa position en avant du chiasma optique. Elle contient entre autres les parties antérieures des noyaux supra optiques (SON) et suprachiasmatiques (SCH), les aires pré-optique latéral, médiane et périventriculaire (LPO, MPA, PePO) Ainsi que l'ensemble des noyaux préoptiques (Figure 4).

La région antérieure : ou près-chiasmatique**,** en référence à sa position en arrière du chiasma optique. Elle contient entre autres les parties postérieures des noyaux SON et SCH et les noyaux paraventriculaires (PVH). Elle contient les aires rétro-chiasmatique et antérieur hypothalamique (RCH, AHA) ainsi que les parties antérieures des aires périventriculaire et hypothalamique latérale (PeA, LHA) (Figure 4).

La région tubérale : en référence à sa position au-dessus de l'infundibulum, elle contient entre autres les noyaux dorso-médian (DMH), ventro-médian (VMH), et arqués (ARH) Elle contient la partie médiane de la LHA, l'aire tubérale (TA) et l'aire périventriculaire tubérale (PeL) (Figure 4).

La région postérieure : ou mamillaires qui contient le complexe nucléaire des corps mamillaires, l'aire hypothalamique postérieur (PHA) et la partie postérieure des aires LHA et périventriculaire (PeP) (Figure 4).

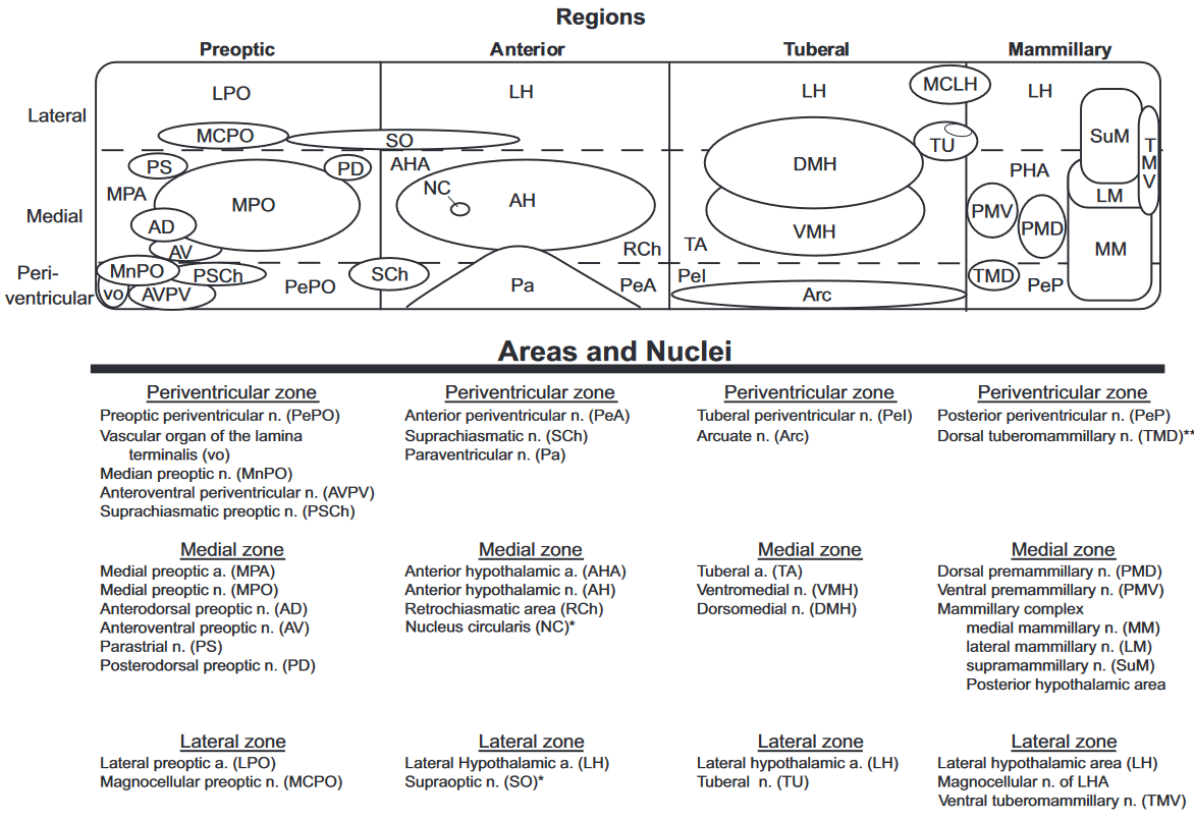


Figure 4 Organisation de l'hypothalamus. Représentation schématique de l'organisation morphologique de l'hypothalamus pour montrer une vue simplifiée de ses zones, régions, aires et noyaux. Abréviations : a, aire ; n, noyau. Notes : *, le n. supraoptique et le n. circulaire sont mieux considérés comme une partie déplacée de la zone périventriculaire ; **, malgré la localisation du TMD dans la zone périventriculaire, les connexions et la fonction présumée des deux parties du n. tubéro-mammillaire sont plus étroitement liées à la zone latérale. Figure de (Simerly, 2015)

L'hypothalamus est le principal organe neuroendocrinien du système nerveux central et régule diverses fonctions physiologiques à travers son interaction directe, via l'infundibulum, avec l'hypophyse. Cet axe hypothalamo-hypophysaire est essentiel pour la coordination de la réponse hormonale du corps à l'environnement. L'hypothalamus interagit avec l'hypophyse pour moduler les réponses physiologiques par deux voies principales :

- Une voie indirecte ou axe hypothalamo-adénohypophysaire.

Dans cette voie, les neurones hypothalamiques sécrètent des neurohormones au niveau de l'éminence médiane, un organe circum-ventriculaire situé à la base de l'hypothalamus. Ces hormones sont ensuite transportées via la circulation porte hypothalamo-hypophysaire jusqu'à l'hypophyse antérieure (adénohypophyse) où elles régulent, à leur tour, l'activité sécrétoire hormonale des cellules adénohypophysaires dans la circulation générale (Figure 5).

- La voie directe ou axe hypothalamo-neurohypophysaire.

Dans cette voie, les neurones de l'hypothalamus envoient directement des projections vers l'hypophyse postérieure (neurohypophyse). Ces neurones sécrètent directement leurs neurohormones dans la circulation sanguine générale au niveau de la neurohypophyse (Figure 5).

La fonction de l'hypothalamus ne se limite pas à la régulation hormonale, il influence également un ensemble de régions de l'encéphale via des projections neuronales notamment vers les structures du système limbique (thalamus, hippocampe et amygdale) et du système nerveux autonome (noyaux du tractus solitaire NTS, pont et bulbe rachidien).

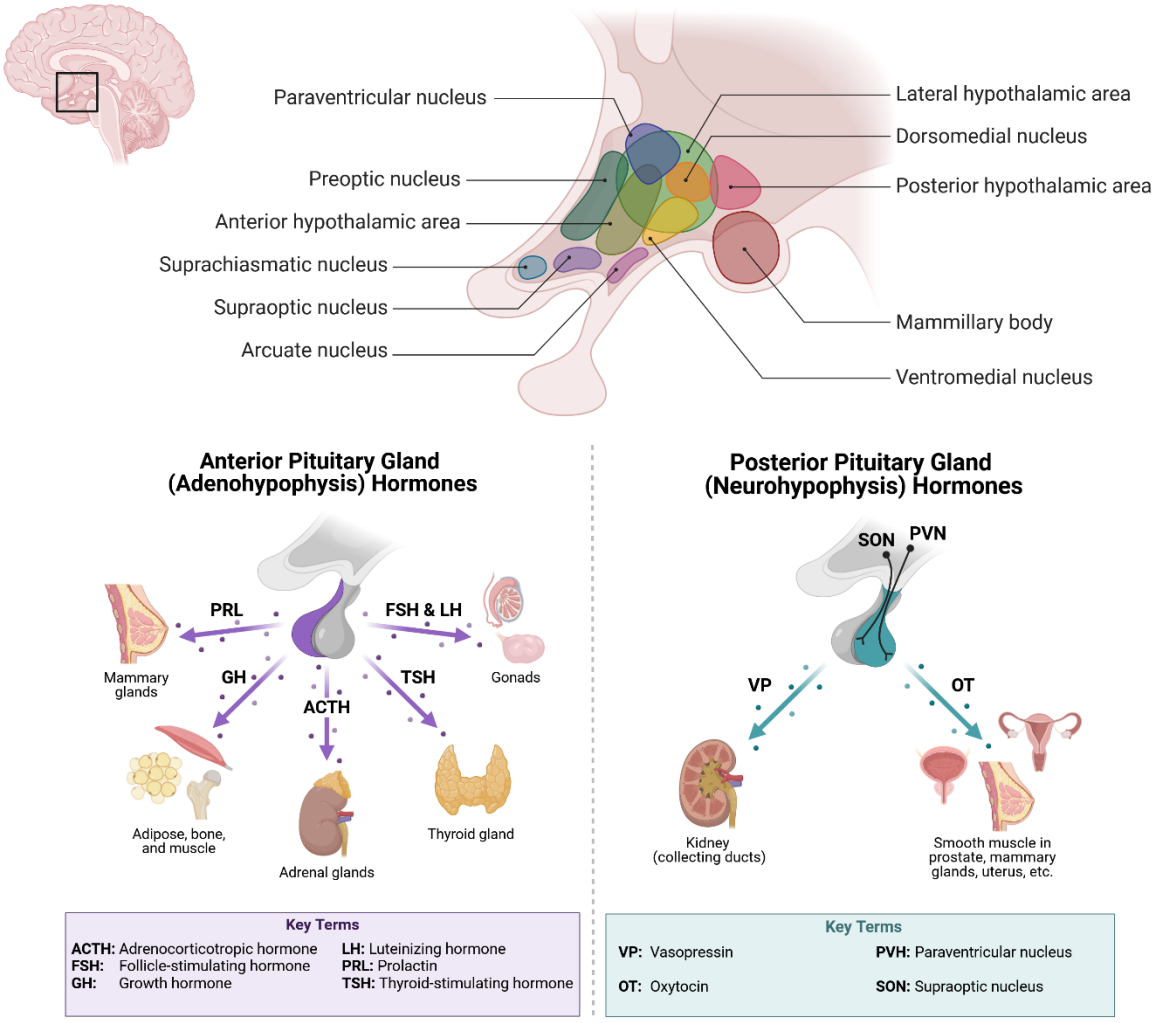


Figure 5: Schéma des communications entre l'hypothalamus et hypophyse. Panel du haut, représentation schématique de l'organisation des principales structures hypothalamique humain. Panel du bas, représentation schématique des fonctions de l'hypophyse.

L'implication de l'hypothalamus dans le SPW est particulièrement pertinente en raison de son rôle dans le contrôle des grandes fonctions physiologiques telles que la régulation du comportement alimentaire, la croissance, la mise en place de la puberté et la fonction de reproduction, domaines directement liés aux symptômes observés chez les patients atteints de ce syndrome. De plus il a été montré que les volumes de l'hypothalamus et de l'hypophyse des patients SPW étaient significativement réduits (Brown et al., 2022; Lukoshe et al., 2017). Par conséquent, une attention particulière portée aux dysfonctionnements hypothalamiques est indispensable pour comprendre non seulement les troubles alimentaires associés au SPW, mais aussi les autres symptômes divers qui caractérisent ce syndrome et qui peuvent être liés à des dysfonctionnements hypothalamiques.

3.1. Rôle de l'hypothalamus dans la régulation de la croissance

Comme nous l'avons vu précédemment, le déficit en GH observé chez les personnes atteintes du SPW est depuis longtemps un sujet d'intérêt et de préoccupation clinique. Des études indiquent que la plupart des patients atteints du SPW présentent un déficit notable de la sécrétion de GH, qui tend à s'aggraver avec l'âge (Burman et al., 2001) .Ce déficit a des implications critiques sur la croissance et le développement, ce qui fait de la supplémentation en GH un des éléments essentiels du traitement des enfants atteints (Butler et al., 2016; Eiholzer and l'Allemand, 2000)

La cause sous-jacente de déficit en GH reste un sujet de débat. De nombreuses études semblent cependant pointer vers un dysfonctionnement de l'hypothalamus (Goldstone et al., 2008; Holm et al., 1993; Prader, 1956). L'hypothalamus contrôle la sécrétion de la GH par l'hypophyse antérieure grâce à l'interaction de deux peptides (Figure 5) : l'hormone de libération de l'hormone de croissance (GHRH), produite par les neurones de l'ARH, et l'hormone d'inhibition de l'hormone de croissance (GHIH), également connue sous le nom de somatostatine, produite par les neurones de la zone périventriculaire de l'hypothalamus.

Ces deux neurohormones, la GHRH et la somatostatine, sont libérées dans la circulation portale hypothalamo-hypophysaire et atteignent l'hypophyse antérieure, où elles ont des effets opposés sur la sécrétion de GH. La GHRH favorise la libération de GH par les cellules somatotropes de l'hypophyse, tandis que la somatostatine l'inhibe. Cette interaction est à l'origine de la sécrétion pulsatile de la GH, qui est essentielle à son action efficace dans l'organisme. Des niveaux élevés de GH et de somatomédines circulantes (médiateurs de la GH)

augmentent la libération de somatostatine, fournissant un mécanisme de rétroaction négative qui tempère la sécrétion de GH.

Des données de la littérature ont démontré que l'expression des gènes *Necdin* et *Magel2* était surreprésentée dans les neurones exprimant la somatostatine (Higgs et al., 2022). Dans le cas du SPW, la perte d'expression de *Necdin* et *Magel2* ainsi que le dysfonctionnement hypothalamique présumé impliquent probablement des perturbations dans la synthèse, la sécrétion ou l'action de ces hormones qui pourrait perturber le mécanisme de régulation normal de la GH, soit en modifiant les schémas de sécrétion de la GHRH ou de la somatostatine, soit en affectant leur action au niveau de l'hypophyse. Ces perturbations affecteraient la pulsatilité et la régulation normale de la sécrétion de GH et entraîneraient une réduction de la sécrétion de GH, ce qui contribuerait aux retards de croissance associés au syndrome.

3.2. Rôle de l'hypothalamus dans la régulation de la fonction de reproduction

L'hypothalamus et plus particulièrement l'axe HPG est un centre névralgique pour la régulation des fonctions de reproduction et le déclenchement de la puberté, orchestrant une cascade d'événements hormonaux, neuronaux et comportementaux cruciaux pour la maturité sexuelle et la fertilité.

Le fonctionnement de cet axe est centré sur une hormone clef, la gonadolibérine (GnRH). Durant le développement embryonnaire, les neurones à GnRH migrent de la placode olfactive à travers le cerveau antérieur pour s'implanter dans la région préoptique de l'hypothalamus. De là, ils projettent leurs axones vers la zone externe de l'éminence médiane, relâchant de manière pulsatile la GnRH dans le système porte hypophysaire. Cette sécrétion de GnRH orchestre la production des gonadotrophines par l'hypophyse (Figure 5), notamment l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH), qui à leur tour stimulent les gonades pour produire des stéroïdes sexuels. Ces stéroïdes jouent un rôle critique dans le développement des caractères sexuels secondaires et exercent un rétrocontrôle indirect sur la libération de GnRH (Abreu et al., 2013; Abreu and Kaiser, 2016; Herbison, 2016; Naulé et al., 2020).

Chez l'humain, l'axe HPG est actif durant la gestation et peu après la naissance. Ce phénomène connu sous le nom de minipuberté, essentiel pour l'initiation du développement des organes génitaux masculins et la maturation des follicules ovariens chez les filles. Cette activation précoce est cruciale pour établir la réponse future des gonadotrophines à la GnRH. Cependant, celle-ci n'est que transitoire : dès six mois chez les garçons et entre trois à quatre

ans chez les filles, une inhibition active de la sécrétion de GnRH et de l'axe HPG se met en place, et persiste à travers l'enfance. Aux abords de la puberté, cette inhibition est progressivement levée par un mécanisme encore incompris, entraînant une augmentation de la libération pulsatile de GnRH jusqu'à atteindre des niveaux adultes, permettant ainsi l'entrée dans une phase reproductive pleinement active (Dulka and Moenter, 2017; Palmert and Boepple, 2001)

Au niveau de l'hypothalamus, l'activité des neurones à GnRH est influencée par des populations de neurones sensibles aux hormone stéroïdiennes, notamment les populations produisant la kisspeptine, la neurokinine B, le monoxide d'azote, le glutamate et le GABA. La kisspeptine en particulier joue un rôle pivot dans la régulation de la GnRH et la mise en place de la puberté (Barroso et al., 2019; McCann et al., 1998; Terasawa et al., 2018). Chez les rongeurs, les neurones à kisspeptine se localisent principalement dans deux zones de l'hypothalamus : l'aire périventriculaire rostrale (RP3V) et l'ARH. La population du RP3V est impliquée dans la production des pics de l'hormone LH chez les femelles, tandis que la population de l'ARH active le générateur de pulsations de GnRH chez les deux sexes. La kisspeptine, encodée par le gène *KISS1*, se lie à son récepteur KISS1R au niveau du corps cellulaire et des dendrons des neurones à GnRH, amplifiant sa libération. La proportion des neurones GnRH répondant à la kisspeptine augmente significativement avec la puberté, passant de 25 % chez les jeunes à plus de 90 % chez les adultes (Clarkson and Herbison, 2006; Han et al., 2005; Herbison et al., 2010) et les mutations des gènes *KISS1* ou *KISS1R* chez l'Humain entraînent une absence de puberté due à un déficit marqué en GnRH, soulignant ainsi le rôle essentiel de la kisspeptine pour l'activation des neurones à GnRH (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007; de Roux et al., 2003).

Les dysfonctionnements de l'axe HPG sont souvent associés à l'hypogonadisme et aux troubles de la puberté. Des altérations associées à chaque niveau de cette axe HPG sont retrouvées dans le SPW. Historiquement, Prader, Labhardt et Willi ont décrit une puberté retardée et incomplète chez ces patients dès 1956, associée à de faibles taux de testostérone (Prader, 1956). Des études supplémentaires ont démontré une minipuberté normale chez les garçons, avec des niveaux dans la moyenne basse de LH, FSH et testostérone dans les premiers mois de vie (Fillion et al., 2006). Cependant, à l'approche de la puberté, les taux de LH et de FSH restent faibles, et bien que les taux de testostérone augmentent, ils demeurent insuffisants pour induire une puberté normale (Eiholzer et al., 2006). La supplémentation en hormones stéroïdiennes chez les patients SPW existe mais est encore sujette à débat : bien qu'elle soit considérée comme bénéfique pour améliorer la qualité de vie, elle est aussi considérée comme

potentialisateur probable de crise chez les patients traités. Néanmoins, ces observations démontrent que l'axe HPG pourrait jouer un rôle central dans la physiopathologie du SPW et contribuerait significativement aux troubles de la puberté et à l'hypogonadisme caractéristique du syndrome (Noordam et al., 2021).

La compréhension des atteintes mécanistiques de l'axe HPG dans le SPW reste limitée, en partie dû au fait que cet aspect de la physiologie n'ait pas fait l'objet de rapports détaillés pour la plupart des modèles animaux. Cependant les modèles existants, tels que ceux basés sur le gène *Necdin* et *Mkrn3*, ont tout de même suggéré quelques pistes mécanistiques de ces anomalies. Les animaux *Necdin ko* présentent un défaut partiel de migration des neurones à GnRH dans l'hypothalamus, spécifiquement au niveau de la région préoptique (Miller et al., 2009; Muscatelli et al., 2000). Necdin est aussi fortement exprimée dans les neurones à GnRH et est également supposée activer la transcription de la GnRH en empêchant sa répression par le MSX (Miller et al., 2009). D'un autre côté, la perte de fonction de *MKRN3* a été identifiée comme la cause génétique la plus courante de la puberté précoce centrale (Abreu et al., 2013; Macedo et al., 2014; Schreiner et al., 2014). En effet, l'expression de *Mkrn3* dans le noyau arqué des souris est élevée avant la puberté et diminue avant l'initiation de la puberté, pour atteindre des niveaux très bas à l'âge adulte (Abreu et al., 2013). Il a été donc suggéré que MKRN3 pourrait inhiber les facteurs stimulateurs de la sécrétion de GnRH lors de la puberté. En effet, MKRN3 est exprimé dans les neurones à kisspeptine de l'ARH chez la souris, où il réprime l'activité du promoteur de KISS1 et par conséquent diminue l'activation des neurones à GnRH par la kisspeptine (Abreu et al., 2020, 2013).

Ces découvertes fournissent un indice sur les dysfonctionnements potentiels de l'axe HPG dans le SPW, suggérant que la perte des fonctions de régulation de *Necdin* et *Mkrn3* au niveau des neurones à GnRH et kisspeptine entraînerait la puberté anormale et l'infertilité spécifique au SPW.

3.3. Rôle de l'hypothalamus dans la régulation de la balance énergétique et le contrôle du métabolisme

Le rôle central de l'hypothalamus dans la régulation du métabolisme a été mis en lumière par des expériences de lésions au milieu du 20e siècle. La première étude *princept*, menée par Hetherington et Ranson en 1940, a montré qu'une lésion physique de la région médiane de l'hypothalamus, incluant les noyaux DMH, VMH, ARH et LHA, provoquait chez le rat une augmentation rapide du poids et de la masse adipeuse (Hetherington and Ranson, 1940). Ces résultats ont été parmi les premiers à suggérer que l'hypothalamus contenait des noyaux spécifiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme. Peu après, Anand et Brobeck ont démontré qu'une lésion ciblée au niveau de la LHA chez le chat entraînait une réduction drastique de la prise alimentaire, conduisant à la mort de l'animal par dénutrition (Anand and Brobeck, 1951). Ces premières observations ont conduit à la formulation du concept d'un centre régulateur double de la prise alimentaire dans l'hypothalamus. La partie latérale de l'hypothalamus (incluant la LHA) a été identifiée comme un centre stimulant l'appétit, tandis que la région ventromédiale de l'hypothalamus (incluant l'ARH, le VMH et le DMH) était perçue comme un centre inhibant la prise alimentaire.

Dès 1970, Roger Gold, a ajouté une nuance supplémentaire en démontrant que des lésions ciblant spécifiquement le PVH pouvaient également induire de l'hyperphagie (Gold, 1970; Gold et al., 1977). Ces études de lésion spécifique ont également remis en question le rôle du VMH en tant que centre régulateur de l'appétit. Elles suggèrent ainsi que l'augmentation rapide du poids et de la masse adipeuse induite par les altérations réalisées par Hetherington et Ranson, ne pouvait pas être provoquée par la seule lésion du VMH et devait donc par conséquent être spécifique aux autres noyaux de la région ventromédiale (Gold, 1973). Pour finir, les expériences menées par Debon, puis Olney sur la souris, impliquant des injections de fortes doses de monosodium glutamate, ont induit un phénotype d'obésité rapide, associé plus spécifiquement à une lésion de l'ARH (Debons et al., 1962; Olney, 1969).

Ces découvertes ont révélé que le contrôle de l'appétit et du métabolisme par l'hypothalamus implique un ensemble de noyaux, chacun jouant des rôles complémentaires et opposés dans la régulation sur la prise alimentaire et du métabolisme.

3.3.1 L'ARH

L'ARH joue un rôle central dans la régulation de la balance énergétique. Il est situé dans la partie la plus ventrale de l'hypothalamus médial, juste au-dessus de l'éminence médiane, jouxtant les parois latérales à la base du troisième ventricule (Figure 5). Sa position stratégique au sein de l'hypothalamus en fait un carrefour important, le plaçant à l'interface entre le système porte hypophysaire, le compartiment ventriculaire cérébral, et le reste de l'hypothalamus (Figure 4). Cette position centrale, sa proximité avec le système porte et ses interactions privilégiées avec les cellules spécialisées formant la barrière du troisième ventricule, appelées tanycytes, font de l'ARH un carrefour important apte à intégrer les signaux périphériques et centraux essentiels pour la régulation de la balance énergétique (Schwartz et al., 2000) (Figure 6).

L'ARH contient, entre autres, deux populations de neurones, dits de premier ordre, aux effets antagonistes sur la modulation de l'appétit et l'homéostasie énergétique. La première population de neurones est constituée de neurones anorexigéniques exprimant la pro-opiomélanorotcine (POMC), un précurseur polypeptidique de nombreux peptides incluant les *melanocyte-stimulating hormones* (α-MSH, β-MSH, et γ-MSH), l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) et la β-Endorphin. La deuxième population de neurones est constituée de neurones orexigéniques, co-sécrètant l'*agouti-related peptide* (AgRP) et le neuropeptide Y (NPY) (Figure 6).

3.3.1.1. Les neurones à POMC

Les neurones à POMC, principalement situés dans l'ARH (Jacobowitz and O'Donohue, 1978), jouent un rôle crucial dans la régulation métabolique. L'importance de ces neurones a été mise en évidence par de nombreuses observations cliniques et expériences précliniques menées entre la fin du 20e siècle et le début du 21e siècle. Chez l'humain, bien que rare, plusieurs cas d'obésité sévère ont été directement liés à des mutations du gène codant pour la POMC (Krude et al., 1998). Chez la souris, la suppression de ce gène (souris *Pomc*-KO) entraîne un phénotype obèse, avec une prise alimentaire accrue et un métabolisme ralenti (Challis et al., 2004; Yaswen et al., 1999).

En 2011, Aponte et collaborateurs ont développé une technique optogénétique utilisant un virus dépendant de la recombinase Cre pour exprimer la channelrhodopsin-2 (ChR2), activée par la lumière, dans des souris génétiquement modifiées (*Pomc*-cre). Cette approche a permis l'activation ciblée des neurones à POMC dans l'ARH, entraînant une réduction de la prise alimentaire proportionnelle à la fréquence de l'activation lumineuse (Williams and Elmquist,

2011). Des études utilisant l'hybridation *in situ* chez les rongeurs ont révélé que le jeûne, qu'il soit aigü ou chronique, provoque une diminution des niveaux d'ARNm de la *Pomc* dans l'ARH. Ces effets sont réversibles avec la réalimentation, démontrant que l'expression de la *Pomc* dans l'ARH varie selon l'état énergétique de l'organisme (Swart et al., 2002) et est influencée négativement par de la présence de signaux de fin de repas, tels que la présence de nutriments (glucose) et l'action de certaines hormones comme l'insuline et la leptine (Shen et al., 2017; Woods et al., 1998).

La POMC est un polypeptide précurseur de nombreux peptides et n'est pas sécrété lui-même. Les premières études pharmacologiques, réalisées via l'injection intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v.) d'α-MSH, un produit du clivage du POMC, ou de son analogue synthétique, le melanotan-II (MTII), ont montré une diminution de la prise alimentaire et une perte de poids significative lors de traitements chroniques chez le rongeur (Fan et al., 1997). De plus, des études réintroduisant de l'α-MSH dans les souris *Pomc*-KO ont permis de restaurer une balance énergétique normale, réduisant ainsi leur masse corporelle (Yaswen et al., 1999). Ces résultats suggèrent que, au niveau central, l'α-MSH est le principal médiateur des effets anorexigènes associés à l'activation des neurones à POMC. L'α-MSH interagit principalement avec ses récepteurs hypothalamiques à la mélanocortine, MC3R et MC4R. Il est intéressant de noter que les modèles murins *Mc3r* KO, *Mc4r* KO et *Mc3r*/*Mc4r* double KO développent tous une obésité et une hyperglycémie comparable à celle observée chez les souris *Pomc*-KO (Chen et al., 2000; Huszar et al., 1997), soulignant que l'action anorexigène de l'α-MSH est principalement due à l'interaction avec ses récepteurs MC3R et MC4R (Harno et al., 2018). De plus, Aponte et al. ont démontré que la stimulation des neurones à POMC chez les souris Ay, où la protéine agouti exprimée de manière ectopique bloque les récepteurs de la mélanocortine, n'entraîne pas de réduction de l'alimentation, soulignant que l'hypophagie médiée par les neurones à POMC nécessite la signalisation active des récepteurs de la mélanocortine (Aponte et al., 2011).

Les neurones à POMC co-expriment également un autre neuropeptide anorexigène, la CART (*cocaine-and-amphetamine-related transcript*). Certaines études indiquent que l'administration centrale de CART chez les rongeurs diminue la prise alimentaire et inhibe l'effet orexigène du NPY (Kristensen et al., 1998; Lambert et al., 1998), tandis que d'autres montrent que l'injection de CART dans l'ARH augmente la prise de nourriture (Abbott et al., 2001), suggérant l'existence de plusieurs populations neuronales exprimant le CART avec des rôles distincts dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Murphy, 2005).

3.3.1.2. Les neurones à AgRP et NPY

L'AgRP fut découverte sur un modèle de souris obèse, hyperphagique et avec un pelage jaune, dont le phénotype est dû à la surexpression de la protéine agouti, dans l'ensemble de l'organisme (Shutter et al., 1997). Au sein du SNC, l'AgRP est exclusivement synthétisée par des neurones de l'ARH (Christian Broberger et al., 1998). Contrairement aux neurones à POMC, les neurones à AgRP sont activés et l'expression d'*Agrp* est augmentée en conditions de faible disponibilité énergétique, comme lors d'un jeûne de 24h ou d'une restriction calorique (Palou et al., 2009; Swart et al., 2002). Ils s'opposent activement à l'action des neurones à POMC par deux voies complémentaires. Premièrement par la sécrétion de l'AgRP, un peptide de 132 acides aminés, qui agit comme un antagoniste et agoniste inverse des récepteurs à la mélanocortine MC3R et MC4R (Adan and Kas, 2003; Fong et al., 1997; Haskell-Luevano and Monck, 2001). En bloquant l'activité de l'α-MSH, l'AgRP inhibe son effet anorexigène, favorisant ainsi l'augmentation de la prise alimentaire et la réduction de la dépense énergétique. Des études sur des modèles murins ont démontré l'impact significatif de l'AgRP sur le poids corporel. La surexpression de l'AgRP chez la souris a montré qu'elle peut induire une obésité marquée (Ollmann et al., 1997). De plus, l'administration *icv* d'AgRP a révélé que ce neuropeptide stimule la prise alimentaire et réduit simultanément la dépense énergétique (Rossi et al., 1998). Deuxièmement, les neurones à AgRP inhibent directement l'activité sécrétrice des neurones à POMC via des synapses au GABA (Atasoy et al., 2012). Ces observations indiquent que l'AgRP est un régulateur puissant de l'appétit et de la balance énergétique, agissant en opposition directe aux effets de l'α-MSH (Nijenhuis et al., 2001).

95% des neurones exprimant l'AgRP coexpriment le NPY. Le NPY est considéré comme le peptide aux effets orexigènes le plus puissant. Des études utilisant des modèles murins ont démontré le rôle orexigénique du NPY. L'injection de NPY en *icv* initie la prise d'un repas, dont la taille et la durée sont plus importantes que la normale (Stanley and Leibowitz, 1985). Par ailleurs, l'injection chronique de NPY chez le rat induit une obésité (Zarjevski et al., 1993). Les souris surexprimant le NPY développent très rapidement une hyperphagie, qui conduit à une obésité sévère (Ruohonen et al., 2012; Tiesjema et al., 2009). À l'inverse, les modèles murins qui n'expriment pas le NPY manifestent une hypophagie (Sindelar et al., 2005).

3.3.2. Contrôle hormonal

Les neurones à POMC et à AgRP jouent des rôles cruciaux et opposés dans la régulation de la prise alimentaire en maintenant un équilibre dynamique essentiel pour une homéostasie énergétique optimale. Ils émettent des projections vers des neurones dits de second ordre, situés dans le PVH ainsi que vers d'autres noyaux hypothalamiques comme la LHA et le noyau DMH pour transmettre les signaux périphériques vers ces noyaux et aires (Figure 6) (Berthoud, 2002; DeFalco et al., 2001; Myers and Olson, 2012; Parker and Bloom, 2012). En effet, l'ARH est stratégiquement placé près du système porte et interagit via les tanycytes avec le troisième ventricule, permettant à ces neurones de détecter rapidement les variations des nutriments disponibles, tels que les niveaux de glucose, et de réagir aux hormones régulant le métabolisme (Figure 6). Cette proximité favorise l'intégration efficace des signaux périphériques et centraux, vitale pour la régulation de la balance énergétique (Schwartz et al., 2000). Par exemple, une augmentation des niveaux de glucose peut activer les neurones à POMC, renforçant l'effet coupe-faim, tandis qu'une diminution peut activer les neurones à AgRP, stimulant l'appétit (Parton et al., 2007) (Figure 6).

D'un autre coté, la leptine stimule l'activité des neurones à POMC tout en inhibant celle des neurones à AgRP (Korner et al., 2001), favorisant ainsi la réduction de l'appétit lorsque les réserves énergétiques sont suffisantes. Lorsque les réserves énergétiques sont faibles, les taux circulants de leptine diminuent, réduisant ainsi l'activité des neurones à POMC et augmentant celle des neurones à AgRP (Cowley et al., 2001).

La ghréline, connue comme l'hormone de la faim, joue un rôle opposé à celui de la leptine. Elle est sécrétée par l'estomac lorsqu'il est vide et stimule directement les neurones à AgRP, augmentant l'appétit et la prise alimentaire. La ghréline peut inhiber simultanément les neurones à POMC, renforçant ainsi son effet orexigène lors de jeûnes prolongés (Wren et al., 2001) (Figure 6).

L'insuline, quant à elle, agit en synergie avec la leptine. Émise par le pancréas en réponse à une élévation du glucose sanguin, elle renforce l'activité des neurones à POMC, favorisant la satiété et la diminution de l'appétit, tout en inhibant les neurones à AgRP (Brüning et al., 2000) (Figure 6). Cette action coordonnée aide à réguler l'homéostasie glucose-lipidique et à maintenir un poids corporel stable.

3.3.3.1. La LHA

Les neurones à POMC et à AgRP provenant de l'ARH innervent et interagissent avec les neurones à orexine et *melanin-concentrating hormone* (MCH) de la LHA (Figure 6)(C. Broberger et al., 1998a; Elias et al., 1998). Les neurones exprimant la MCH et l'orexine jouent des rôles complémentaires et interconnectés dans la modulation du comportement alimentaire et les rythmes circadiens. En effet, la délétion du gène codant pour la *Mch* entraine une hypophagie chez les souris conduisant à un phénotype mince (Shimada et al., 1998). De même, l'invalidation du gène codant l'*orexine* s'accompagne d'une diminution de la prise de nourriture chez la souris (Hara et al., 2001). Les neurones à orexine, en particulier, sont directement influencés par la lumière et participent à l'alignement du cycle veille-sommeil avec les cycles environnementaux de lumière et d'obscurité. L'orexine est également impliquée dans l'induction de l'activité locomotrice en anticipation de la prise alimentaire (Akiyama et al., 2004; Mieda et al., 2004). Les neurones à POMC et à AgRP jouent au niveau de la LHA un rôle modulateur, influençant l'activité des neurones à MCH et à orexine et par conséquent, modulent les comportements liés à l'alimentation et à l'éveil en intégrant les signaux de faim avec ceux du rythme circadien. En effet, l'injection centrale d'AgRP chez des souris nourries *ad libitum* stimule l'expression de la *Mch*, sans effet sur l'expression de l'*orexine*. D'autre part, l'injection i.c.v. d'α-MSH inhibe l'expression de l'*orexine* sans modifier celle de la *Mch* dans la LHA (Hanada et al., 2000). De même, les souris qui présentent une délétion du gène codant pour la *Pomc* présentent une surexpression de l'*orexine* dans la LHA (López et al., 2007). La LHA participe également à la prise alimentaire médiée par la signalisation dépendante du NPY. L'administration de NPY dans la LHA, augmente de prise alimentaires, même en l'absence de vrais besoins énergétiques (Stanley et al., 1993).

3.3.3.2. Le VMH

Le VMH contient très peu de fibres immunoréactives pour l'AgRP et à la POMC, bien que les dendrites du VMH restent en contact avec ces fibres issues de l'ARH (Figure 6)(C. Broberger et al., 1998b; Fu and van den Pol, 2008). Néanmoins, les récepteurs aux mélanocortines MC3R et MC4R y sont exprimés, suggérant une implication potentielle du VMH dans le contrôle de la balance énergétique dépendante du système mélanocortinergique. Cependant, chez des souris obèses *Mc3r* KO, la restauration de ce récepteur dans le VMH a montré un effet modeste sur l'obésité mais a contribué positivement à la normalisation de l'homéostasie du glucose (Begriche et al., 2011). Ces données suggèrent que le VMH jouerait un rôle plus important dans la régulation de l'homéostasie du glucose. En accord avec cette hypothèse, des lésions du VMH

conduisent à une hyperglycémie quelques minutes après la lésion, et ce de manière indépendante de la prise alimentaire (Berthoud and Jeanrenaud, 1979; Han et al., 1972). De plus, le VMH contient des neurones sensibles au glucose, jouant ainsi un rôle intégrateur dans le maintien des concentrations de glucose stables dans le corps (Routh, 2010).

3.3.3.3. Le DMH

A l'opposé du VMH, le DMH reçoit un grand nombre de projections issues des neurones à POMC et AgRP provenant de l'ARH (Figure 6). En revanche, le DMH ne semble pas en condition physiologique normale, exprimer le récepteur MC4R de manière significative. Cependant, dans certaines conditions d'hyperphagie, comme durant la lactation, les neurones du DMH peuvent exprimer le NPY (Figure 6). Dans ces conditions, les projections axonales provenant de l'ARH se retrouvent très souvent à proximité de ces neurones exprimant le NPY et les injections d'agonistes du MC4R dans le DMH réduisent la prise alimentaire et l'expression du NPY (Chen et al., 2004). Dans d'autres conditions d'hyperphagies, comme chez les souris obèses *Mc4r*-KO, on retrouve également cette nouvelle expression du *Npy* au niveau du DMH, ce qui pourrait suggérer une interaction indirecte par d'autres mécanismes ou récepteurs. L'action de la POMC et de l'AgRP dans le DMH semble en partie médiée par cette population de neurones à NPY. En effet les KO spécifiques des neurones NPY dans le DMH entraînent une réduction de la masse grasse lors d'un régime riche en graisse et une augmentation de la thermogénèse et de la température corporelle (Chao et al., 2011). A l'inverse, la surexpression du *Npy* au niveau du DMH provoque une hyperphagie ainsi qu'une obésité (Yang et al., 2009). En résumé, les neurones à POMC et à AgRP régulent la capacité du DMH à influencer la prise alimentaire, la dépense énergétique, et la thermogenèse.

3.3.3.4. Le PVH

Le PVH est un des noyaux qui reçoit la plus forte densité de fibres issues des neurones à POMC et AgRP et montre une forte expression du récepteur MC4R (Figure 6) (Mountjoy et al., 1994). Les neurones à POMC et à AgRP sont au contact de plusieurs populations de neurones anorexigéniques au sein du PVH. Celles-ci produisent notamment la thyréolibérine (TRH) (Fekete et al., 2000), la corticolibérine (CRH) et l'OT (Figure 6)(Valassi et al., 2008).

La TRH est une hormone tripeptidique qui stimule la libération de l'hormone stimulant la thyréostimuline (TSH) par l'hypophyse antérieure, qui à son tour stimule la production des hormones thyroïdiennes, thyroxine (T4) et triiodothyronine (T3), par la thyroïdie. Ces hormones régulent des fonctions cruciales telles que le rythme cardiaque, la température corporelle, ainsi que la croissance et le développement, formant ainsi l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien (HPT) (Fisher et al., 1982; Hulbert, 2000; Morreale de Escobar et al., 2004).

La CRH est un peptide qui induit la libération de l'ACTH par l'hypophyse, déclenchant la sécrétion de corticostéroïdes, comme le cortisol, par les glandes surrénales. Cette cascade est au cœur de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS), un mécanisme essentiel de la réponse au stress. L'injection centrale de TRH ou de CRH chez le rat diminue sa prise alimentaire et son poids corporel (Valassi et al., 2008).

L'ocytocine, quant à elle est surtout connue dans un large éventail de comportements que je développe dans une partie ultérieure. De même, l'injection centrale d'OT en *icv* inhibe la prise de nourriture (Arletti et al., 1989).

Dans le PVH, les signaux métaboliques détectés par les neurones à POMC et à AgRP sont intégrés dans les fonctions des axes HPT et HHS, ainsi que dans le système ocytocinergique, jouant un rôle clé dans le relayage des informations relatives au contrôle du métabolisme. Par exemple, l'injection d'α-MSH ou un jeûne peut augmenter l'expression de l'ARNm de la *Trh* dans le PVH, tandis que l'administration d'AgRP ou du NPY la diminue (Valassi et al., 2008). Les neurones à OT sont activés par l'injection d'α-MSH et les neurones à AgRP inhibent l'action de l'α-MSH sur ses récepteurs dans le PVH, non seulement par compétition aux récepteurs de la mélanocortine, mais aussi par un mécanisme inhibiteur direct. Ce dernier se manifeste par des synapses GABAergiques sur les neurones à OT du PVH, modulant ainsi négativement l'effet des neurones à POMC (Atasoy et al., 2012).

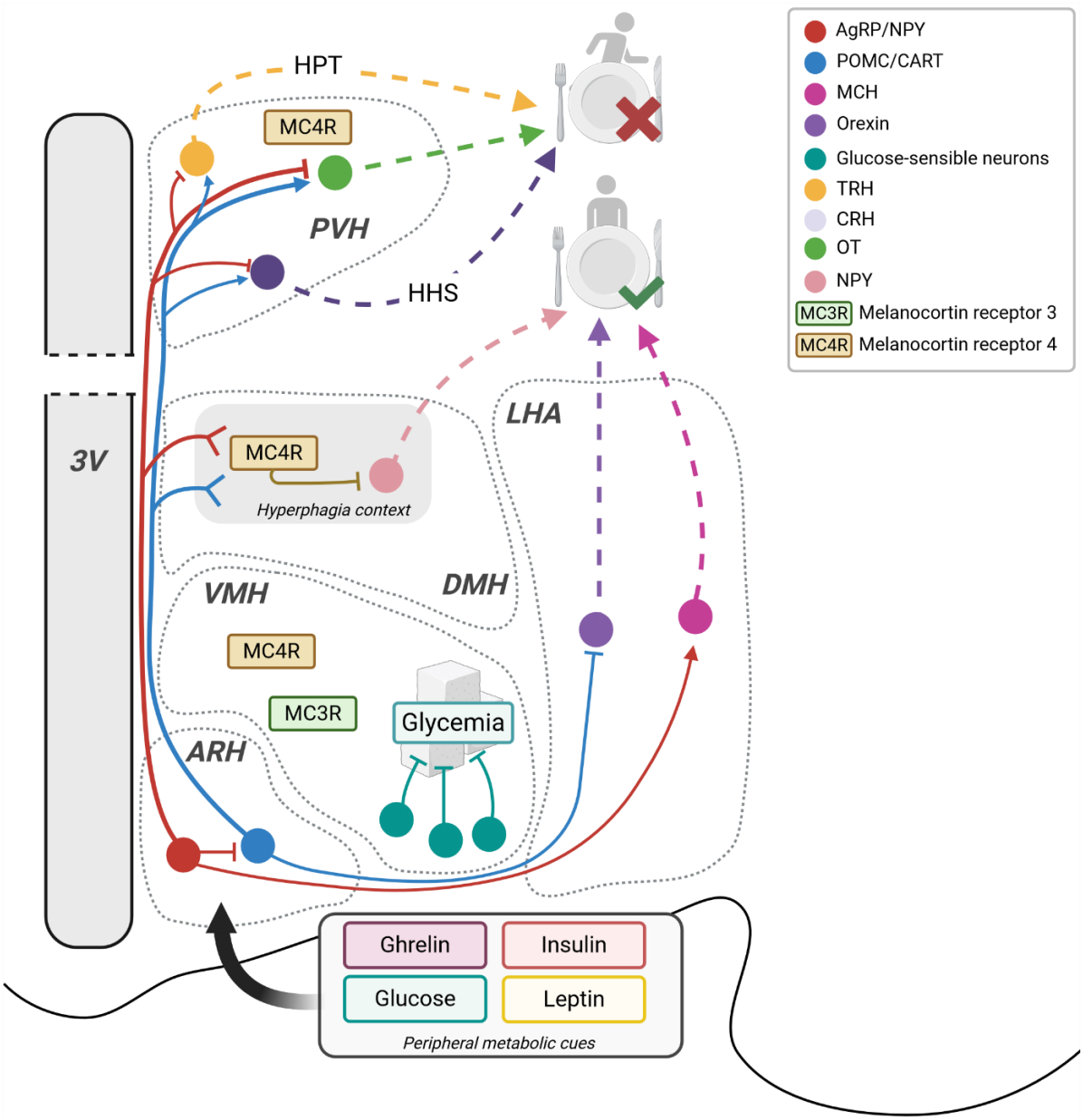


Figure 6 : Organisation des projections Agrp et Pomc dans l'hypothalamus médio-basal. Représentation schématique des communications des neurones Agrp et Pomc pour montrer une vue simplifiée des connexions hypothalamiques régulant les différents aspects de la prise allimentaire et de la dépense energétique.

En résumé, les connexions neuronales étendues de l'ARH et les interactions complexes entre hormones et neurones régulateurs de l'appétit soulignent l'importance de la signalisation neuroendocrine hypothalamique dans la régulation de l'homéostasie énergétique. L'efficacité de ce réseau de signalisation dépend non seulement des niveaux d'hormones circulantes, mais aussi de la sensibilité des neurones à ces hormones, qui peut varier en réponse à des facteurs environnementaux et génétiques. Ainsi, des dysfonctionnements dans ces voies de signalisation peuvent conduire à des déséquilibres énergétiques, se manifestant souvent par de l'obésité ou de l'insuffisance pondérale.

3.3.4. Développement du système régulant la prise alimentaire.

Le développement des circuits neuronaux régulant la prise alimentaire de l'hypothalamus s'effectue pendant la période périnatale et peut être divisé en deux étapes distinctes, reflétant des phases critiques du développement neuronal.

3.3.4.1. Développement embryonnaire : neurogenèse et migration

Le développement hypothalamique commence au cours de l'embryogénèse peu après la fermeture du tube neural. L'hypothalamus se forme à partir du diencéphale, au jour embryonnaire (E) 9. Les précurseurs des cellules de l'hypothalamus proviennent des cellules situées dans la zone prolifération médiane ventrale, juste en avant du plancher du tube neural, également connue sous le nom de neuroépithélium du troisième ventricule (Sauer, 1935) (Figure 7.1). Ces cellules se différencient puis migrent pour former les différentes régions de l'hypothalamus, déterminant l'organisation préliminaire des régions hypothalamiques et précède l'établissement des projections axonales (Figure 7.2).

Altman et Bayer (1986) ainsi que Ifft (1972) ont injecté chez des rattes femelles gestantes de la [3H]thymidine, un nucléoside radioactif qui s'incorpore dans l'ADN nucléaire pendant la phase S du cycle cellulaire. Ils ont ainsi rapporté que la majorité des cellules situées dans l'hypothalamus naissent entre E13 et E15 chez le rat (Ifft 1972; Altman et Bayer 1986). Par la suite, Shimada et Nakamura ont rapporté que la plupart des neurones dans l'hypothalamus de la souris naissent entre E10 et E14 (Altman and Bayer, 1986; Ifft, 1972; Shimada and Nakamura, 1973). Des études plus contemporaines, utilisant la bromodésoxyuridine (BrdU) pour suivre le développement des neurones, ont confirmé que la majorité des neurones hypothalamiques chez la souris naissent entre E10 et E16, avec un pic de neurogenèse se produisant entre E11 et E12 (Ishii and Bouret, 2012). Une étude utilisant le traceur rétrograde « *fast blue* » injecté en intraveineuse à différents stades du développement, a pu démontrer que les neurones non neuroendocrines (qui n'envoient pas de projection vers l'éminence médiane) naissent entre E11 et E16 alors que les neurones neuroendocrines (qui envoie des projections vers l'éminence médiane) naissent majoritairement entre E12 et E14 (Markakis, 2002).

La différenciation et la maturation des neurones du ARH se produisent à des stades distincts et échelonnés entre E10 et E12, continuant jusqu'à E16 (Figure 7.3) (Croizier et al., 2010; Ishii and Bouret, 2012). Dans le ARH de la souris, la présence de l'ARNm codant la *Pomc* est détectable dans les précurseurs des neurones dès le jour embryonnaire 10,5 (E10,5) alors que l'ARNm codant pour le *Npy/Agrp* n'est détectable qu'à partir de E14.5. En effet, il a

été montré que les neurones à *Npy/Agrp* naissent d'une sous-population de neurones précurseurs exprimant initialement la *Pomc* et qui se redifférencient, entre E14 et E18, en neurones à *Npy/Agrp* (Padilla et al., 2010).

3.3.4.2. Développement postnatal : croissance axonale et synaptogénèse

Chez les rongeurs, le développement des circuits issus des neurones à POMC et AgRP vers d'autres noyaux hypothalamiques, tels que le PVH, le DMH et la LHA, s'effectue après la naissance (Grove et al., 2003) (Nilsson et al., 2005b) (Diaz and Puelles, 2020). Pendant cette phase, les neurones à POMC et AgRP commencent à émettre leurs projections axonales vers les cibles appropriées et les synapses se forment pour créer des réseaux neuronaux pleinement fonctionnels, essentiels pour le contrôle de la faim et de la satiété (Figure 7.4).

Les expériences de traçage axonal de Bouret et ses collègues, utilisant le traceur antérograde DiI, ont révélé que les axones de l'ARH se développent après la naissance au cours de périodes temporelles distinctes. Le DMH est le premier noyau à être innervé par les fibres du ARH dès le 6e jour de vie postnatal (P6). La densité des fibres du ARH retrouvé dans le DMH est multipliée par environ six à P12. Le PVH commence à présenter des fibres issues du ARH vers P10, atteignant un modèle mature vers P16, tandis que la LHA commence à être innervée par les axones du ARH vers P12 et atteint une connectivité mature vers P18 (Bouret et al., 2004a).

En parallèle de la fin de la croissance des axones, la synaptogenèse progresse lentement (Figure 7.5). L'analyse ultrastructurale des synapses au sein de l'ARH chez le rat a révélé très peu de synapses axodendritiques ou axosomatiques à P5. À P20, environ la moitié des synapses trouvées chez les animaux adultes sont déjà formées et à P45, le nombre de synapse est comparable à celui observé chez les souris adultes (Matsumoto and Arai, 1976). Ce développement synaptique est essentiel pour le traitement sophistiqué des signaux neuronaux qui régissent le comportement alimentaire et il marque la maturation des circuits alimentaires hypothalamiques en un système pleinement opérationnel capable d'une régulation physiologique complexe. L'intégration complète des signaux périphériques de l'équilibre énergétique par le ARH se développe également pendant la période postnatale. Par exemple, l'administration périphérique de leptine induit l'expression de c-Fos dans l'ARH dès P6, mais ne provoque pas une telle expression dans le PVH avant P10, et une induction de c-Fos provoqué par la leptine dans la LHA n'est pas observée avant P16 (Bouret et al., 2004b).

Chez les primates, y compris les humains, les phases de développement hypothalamique sont beaucoup plus précoces en raison de périodes de gestation plus longues. Chez les macaques, le pic de naissance des neurones hypothalamiques se produit au cours du premier trimestre de la période de gestation, un calendrier de développement qui correspond davantage au milieu de la gestation chez les rongeurs et à la fin du deuxième trimestre, les processus de développement des fibres à AgRP de l'ARH vers le PVH sont déjà bien avancés. Chez les primates et chez l'Humain, ces processus se produisent au cours du dernier trimestre et sont généralement achevés avant la naissance (Grayson et al., 2006; Koutcherov et al., 2003).

3.3.4.3. Régulation hormonale et facteur de guidance

Le développement postnatal des projections de l'ARH est profondément influencé par les hormones métaboliques, en particulier la leptine. Des dérégulations hormonales ou la perte de fonction de certains facteurs de guidage axonal sont souvent associées à des défauts dans la mise en place des fibres à POMC et AgRP, ce qui peut entraîner un dysfonctionnement métabolique dans ces systèmes de développement.

En 1998, Ahima et ses collègues ont rapporté chez la souris la présence d'un pic de leptine circulante entre la première et la deuxième semaine de vie postnatale (P8-P12) qui coïncide avec la poussée axonale, des neurones de l'ARH (Ahima et al., 1998; Devaskar et al., 1997; Rayner et al., 1997). Quelques années plus tard, Bouret et ses collègues ont montré que la mise en place des projections axonales des neurones à POMC et AgRP était perturbée chez les souris déficientes en leptine (ob/ob) et que la leptine induit l'extension des neurites à partir d'explants organotypiques isolés de l'ARH *in vitro* (Bouret et al., 2004b). Ils ont également montré que l'administration de leptine exogène pendant la période néonatale pouvait restaurer ces projections chez les souris ob/ob, mais que ce traitement devenait inefficace après P28, indiquant pour la première fois un effet neurotrophique, pendant une période critique, de la leptine sur les projections des neurones à POMC et AgRP (Bouret et al., 2004b). Les neurones à POMC et AgRP/NPY expriment LepRb et la leptine active les principales voies de signalisation LepRb, notamment STAT3, ERK et Akt, dans les neurones en développement (Caron et al., 2010). De plus, la signalisation via LepRb, en particulier la voie LepRb→STAT3, est cruciale pour le développement des projections des neurones à POMC (Bouret et al., 2012). Ces études suggèrent que la leptine joue un rôle neurodéveloppemental sur les projections axonales des neurones à POMC et AgRP pendant une période critique du développement hypothalamique.

La ghréline participe également à l'établissement des projections des neurones à POMC et AgRP. Steculorum et ses collègues ont révélé que l'injection d'un composé anti-ghréline chez des souris nouveau-nées entraîne une augmentation de la densité des axones contenant la POMC et le AgRP et innervant le PVH. Ces altérations structurelles sont accompagnées de défauts métaboliques à long terme, incluant un poids corporel élevé, une masse grasse accrue et une hyperglycémie (Steculorum, 2015). Cependant, le traitement des souris adultes avec ce composé n'altère pas les circuits à POMC et AgRP, suggérant que, tout comme la leptine, l'action neurodéveloppementale de la ghréline sur les projections axonales de l'ARH est restreinte à une fenêtre critique néonatale. Les effets neurodéveloppementaux de la ghréline impliquent probablement une action directe sur les neurones du noyau arqué, car l'exposition directe des explants ARH isolés à la ghréline inhibe la croissance axonale (Steculorum et al., 2015). De plus, la ghréline interagit avec la signalisation LepRb→STAT3 pour bloquer l'effet neurotrophique de la leptine (Steculorum et al., 2015).

L'insuline contribue également de manière significative au développement hypothalamique, bien que dans une moindre mesure que la leptine. Elle stimule la différenciation cellulaire dans les explants de cerveau et les neurosphères hypothalamiques, influençant principalement la différenciation des astrocytes (Schechter et al., 1999).

En plus des hormones métaboliques, la sémaphorine 3, qui est une molécule cruciale de guidage axonal, joue un rôle essentiel dans le développement des circuits hypothalamiques, notamment en orientant les projections axonales des neurones à POMC. Une étude à montré que la suppression des récepteurs a la sémaphorine 3, la neuropiline 2, chez les souris entraîne une désorganisation spécifique des projections axonales des neurones à POMC, de l'ARH vers le PVH (van der Klaauw et al., 2019) (Figure 7).

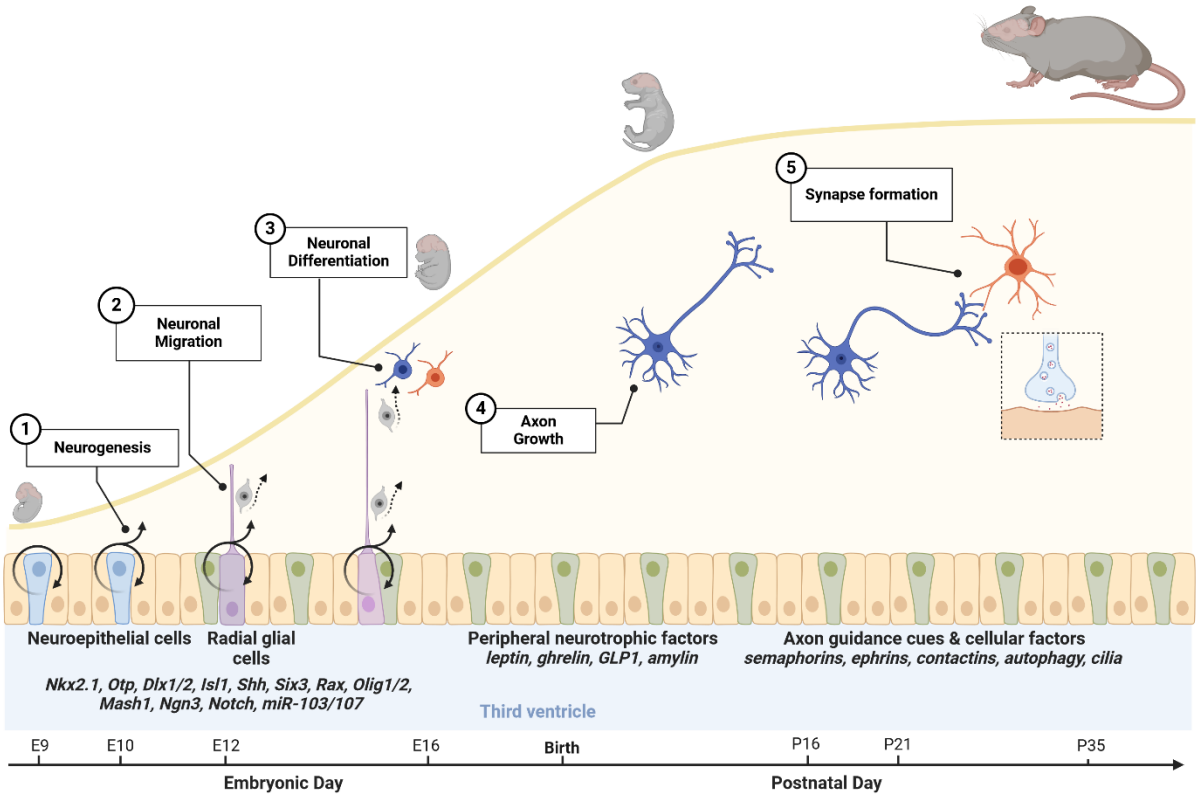


Figure 7 : Périodes importantes du développement hypothalamique chez les rongeurs : la neurogenèse, la migration neuronale et le devenir des cellules ont lieu entre le milieu et la fin de la gestation, tandis que la croissance des axones et la formation des synapses ont lieu principalement après la naissance. (Bouret, 2022)

3.3.5. Altération du système mélanocortinergique dans le SPW

Des anomalies substantielles au niveau du système mélanocortinergique hypothalamique ont été observées chez les patients SPW et dans les modèles murins associés. Des concentrations sanguines réduites d'α-MSH ont été notées chez les patients SPW, suggérant des concentrations centrales potentiellement plus faibles de ce peptide (Turkkahraman et al., 2022). De plus, un développement anormal des projections axonales de l'ARH à été décrit chez les souris *Magel2* KO. Il se caractérise par une réduction notable de la densité de fibres immunoréactives pour l'α-MSH dans le PVH à six semaines de vie postnatale, et par une densité de fibre immunoréactive pour l'AgRP comparable à celle des souris contrôles (Maillard et al., 2016). De plus, la réponse anorexigénique de ces souris à la leptine est diminuée, mais elles montrent une hypersensibilité aux effets anorexigènes de l'agoniste des récepteurs mélanocortine, comme le MT-II et la setmelanotide (Bischof et al., 2016; Mercer et al., 2013). Dans ce modèle également, des enregistrements électrophysiologiques *ex vivo* ont mis en évidence une altération dans le profil d'activité des neurones à POMC indiquant des défauts dans la communication neuronale vers les cibles en aval. En contraste le fonctionnement des neurones à AgRP reste relativement conservé (Oncul et al., 2018). Parallèlement, chez l'humain, les niveaux d'AgRP et de NPY hypothalamiques post-mortem sont similaires à ceux observés chez des individus non atteints de SPW (Goldstone et al., 2002). Ces résultats suggèrent une dysrégulation spécifique des circuits anorexigènes à POMC dans le SPW. Ces altérations pourraient également expliquer certains des dysfonctionnements thermiques puisque le MC5R joue un rôle dans la thermorégulation, une fonction fréquemment déréglée chez les nourrissons SPW (Bittel et al., 2007; Ge et al., 2002).

Ces informations soulignent l'importance cruciale des interactions complexes entre les différents peptides et récepteurs du système mélanocortinergique, fortement impactés dans le SPW. Ces altérations illustrent la nécessité d'étudier ce système afin de mieux comprendre les troubles alimentaires liés à cette pathologie.

3.4. Conclusion sur le rôle de l’hypothalamus

En conclusion, il est maintenant évident que l'hypothalamus joue un rôle central dans la physiopathologie du SPW, en particulier à travers son implication dans la régulation de la puberté et de la reproduction, de croissance et la régulation de l'appétit et du métabolisme. Les anomalies dans la production et la signalisation de peptides, comme l'α-MSH et la GH ainsi que les dysfonctionnements des neurones exprimant la GnRH ou la POMC illustrent les dérèglements complexes qui contribuent aux symptômes caractéristiques du SPW. Une analyse approfondie des rôles de l'hypothalamus dans le SPW pourrait non seulement améliorer notre compréhension de la pathologie, mais aussi ouvrir également des voies potentielles pour des interventions thérapeutiques ciblées, visant à améliorer la qualité de vie des patients. Toutefois, étant donné l'ampleur des atteintes hypothalamiques dans le SPW, des limites de notre compréhension des rôles précis des gènes impliqués et des difficultés rencontrées en raison de modèles animaux imparfaits, résoudre le puzzle que représente ce syndrome semble extrêmement complexe. Cependant, parmi toutes les altérations observées chez les patients SPW, un neuropeptide se démarque par son rôle essentiel : l'ocytocine. Son implication centrale dans de nombreux processus physiologiques fait de cette neurohormone une piste particulièrement prometteuse pour déchiffrer et potentiellement traiter les aspects complexes du SPW.

4. Le système ocytocinergique

4.1. Perceptive historique et généralités

4.1.1. Historique

L'OT, souvent surnommée l'hormone de l'amour, est une neurohormone impliquée dans une large variété de processus biologiques et comportementaux chez les mammifères. Découverte au début du 20ème siècle, son nom "ocytocine", est issu du grec "*ocytokos*" qui signifie "accouchement rapide" et fait référence à sa première fonction biologique connue. En effet en 1906, Sir Henry Dale fut le premier à observer que des injections d'extraits hypophysaires de bœuf provoquaient des contractions utérines chez des chattes gestantes indépendamment des effets vasopresseurs précédemment décrits (Dale, 1906). Cette expérience suggéra ainsi l'existence de deux composants distincts dans les extraits hypophysaires : un vasopresseur et un ocytocique. Peu de temps après, Ott et Scott démontraient que ces extraits avaient aussi un rôle dans l'éjection du lait (Ott and Scott, 1910). Ce n'est qu'en 1928 que ces principes actifs furent finalement isolés par Oliver Kamm et les équipes de Park and Davis. Ils identifièrent 2 peptides, un premier vasopresseur, qu'ils nommèrent vasopressine, et un ocytocique, qu'ils nommèrent OT (Kamm, 1928). L'OT est également remarquable pour être la première hormone polypeptidique à avoir été synthétisée en laboratoire en 1953 par Vincent du Vigneaud, ce qui lui valut le prix Nobel de chimie en 1955 (Vigneaud et al., 2002) . Aujourd'hui, l'OT continue de susciter un vif intérêt au sein de la communauté scientifique, non seulement pour ses rôles bien établis dans la parturition et la lactation, mais aussi en raison de ses implications profondes dans divers comportements sociaux et émotionnels. Elle est étudiée pour son influence sur l'attachement, le comportement sexuel, le comportement maternel, l'agressivité, ainsi que la régulation des comportements alimentaires. L'OT est ainsi une cible thérapeutique prometteuse pour de nombreuses pathologies, notamment les troubles affectifs tels que l'autisme, les troubles anxieux, et les maladies psychiatriques (Lee et al., 2009).

4.1.2. Structure

L'OT est composée de 9 acides aminés avec la séquence Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly, et elle forme un pont disulfure entre les deux résidus de cystéine en position 1 et 6, ce qui stabilise sa structure en boucle (Du Vigneaud et al., 1953) (Figure 8). Chimiquement, l'OT diffère de son hormone jumelle la vasopressine par seulement deux acides aminés, ce qui souligne leur origine évolutive commune à partir d'un ancêtre commun. L'OT et la vasopressine ou leurs analogues (isotocine et vasotocine) peuvent être retrouvés dans la quasi-totalité de vertébrés et l'on peut retracer l'origine de ces molécules jusqu'à la super-classe des Ostéichthyens, les poissons osseux, ancêtre des vertébrés terrestres (Acher et al., 1995).

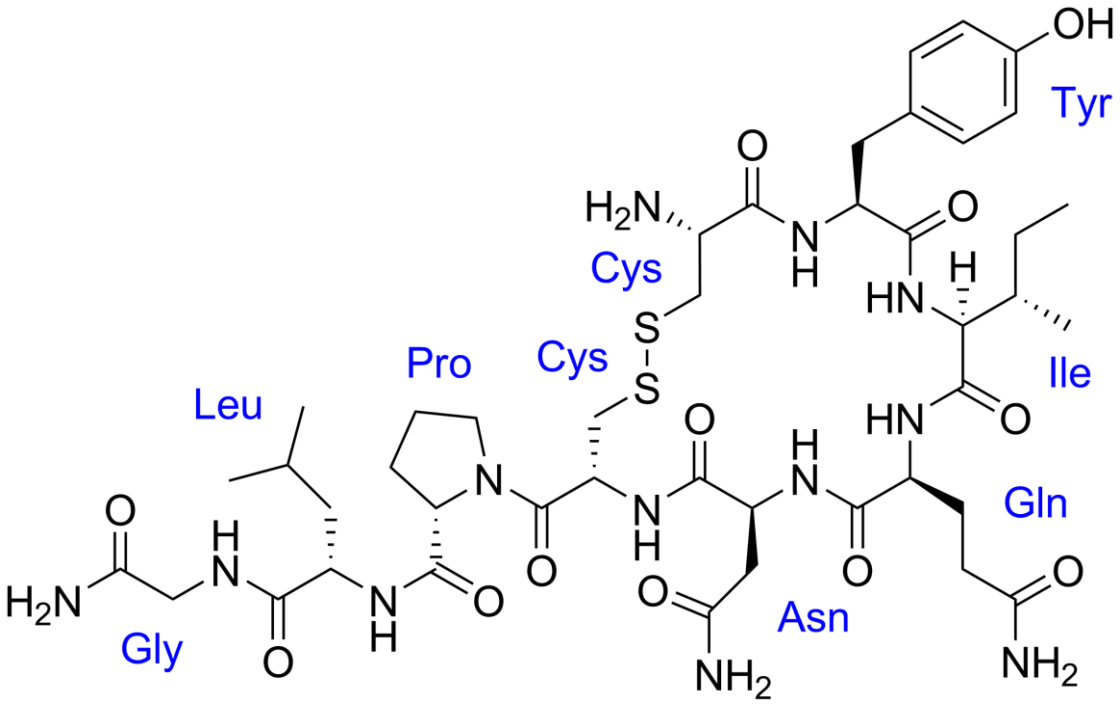


Figure 8: Structure chimique de l'ocytocine.

4.1.3. Génétique

Sur le plan génomique, chez les mammifères, les gènes codant pour l'OT et la vasopressine sont situés sur les mêmes chromosomes mais orientés dans des directions opposées (chromosome 2 chez l'humain et chromosome 20 chez la souris) et partagent des séquences de régulation commune. Le gène de l'OT est notamment sous le contrôle de différentes hormones. Le promoteur du gène de l'OT est riche en élément de réponse aux œstrogènes, et peut être stimulé par les œstrogènes, les hormones thyroïdiennes, et l'acide rétinoïque (Mohr and Schmitz, 1991; Richard and Zingg, 1990) (Figure 9A). L'OT, comme la vasopressine, est composée de trois exons et deux introns, séparés par une séquence non codante dont la longueur varie selon les espèces de 3 à 12 kp (Hara et al., 1990; Sausville et al., 1985) (Figure 9A).

De façon similaire à la vasopressine, l'OT est d'abord produite sous forme de peptide précurseur plus stable contenant un peptide de transport. L'exon 1 de l'OT contient la séquence pour le nonapeptide, un signal de clivage tripeptidique constitué d'une séquence (Glyl-Lysl-Arg) et le segment initial de la protéine de transport la neurophysine I. Les deux autres exons codent pour le reste de la neurophysine I (Figure 9A-B). Le pré-propeptide, résultant de l'expression de ce gène, est conditionné au niveau du soma dans de grandes vésicules et transporté dans les axones et dendrites (Figure 9B). Durant le transport, le pré-propeptide subit une succession de clivages enzymatiques en différentes formes intermédiaires (Brownstein et al., 1980). L'OT sous sa forme mature est ensuite stockée en attendant d'être libérée par exocytose (Renaud and Bourque, 1991) par un mécanisme dépendant en partie de la signalisation calcique intracellulaire (Ludwig and Leng, 2006).

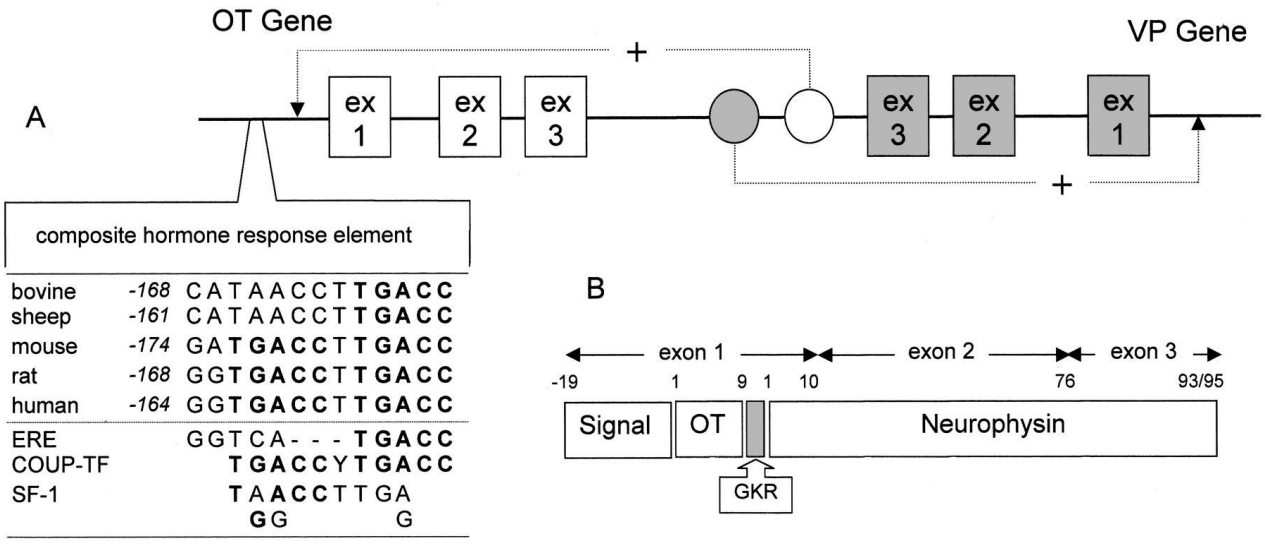


Figure 9 : Organisation de la structure des gènes de l'ocytocine (OT) et de la vasopressine (VP). A. détails de la région d'environ 160 pb (élément de réponse hormonale composite) du promoteur du gène OT en amont, conservée chez cinq espèces, y compris les séquences des éléments de réponse : élément de réponse aux œstrogènes (ERE), facteur de transcription I du promoteur en amont de l'ovalbumine de poulet (COUP-TF), et facteur stéroïdogène 1 (SF-1) sont indiqués. **B.** organisation du domaine de la préprooxytocine, y compris les sites de traitement. Le précurseur est divisé en fragments indiqués par des clivages enzymatiques, dont l'un implique une séquence glycyl-lysyl-arginine (GKR) et laisse un groupe carboxamide à l'extrémité COOH-terminale de l'OT (Gimpl and Fahrenholz, 2001)

4.1.4. Synthèse

Bien que l'OT ait été extraite pour la première fois de l'hypophyse, elle n'est pas produite directement par ce tissu. Des recherches menées au cours des années 1950 ont démontré que le peptide trouvé dans l'hypophyse est en fait synthétisé par des neurones situés dans l'hypothalamus. Ce neuropeptide hypothalamique est ensuite acheminé vers l'hypophyse via le tractus axonal. Au cœur de ce système, deux noyaux hypothalamiques principaux ont été identifiés comme les sièges des neurones sécrétoires pour l'OT : le PVH et le SON (Figure 10B). Deux populations de neurones sécrétant l'OT sont à distinguer au sein de ces noyaux : des neurones magnocellulaires qui projettent vers la neurohypophyse via l'éminence médiane (Figure 10B) (Renaud and Bourque, 1991), responsables de la sécrétion de l'OT dans la circulation sanguine pour des effets périphériques, ainsi que des neurones parvocellulaires, dont les projections intra-cérébrales sont principalement impliquées dans les effets centraux de l'OT (Figure 11). De plus, l'OT pourrait être transmise par transmission volumique, une hypothèse renforcée par l'observation que les dendrites dans le PVH s'étendent jusque dans l'espace ventriculaire pour libérer de l'OT directement dans le troisième ventricule. Cette modalité de transmission diffère de la transmission synaptique traditionnelle, car elle permet à l'OT de diffuser à travers de larges zones du cerveau, atteignant ainsi des régions qui ne reçoivent pas directement de projections ocytocinergiques.

En plus de sa production centrale hypothalamique, l'OT peut également être produite, selon les espèces et dépendant du contexte, par d'autres régions cérébrales comme le noyau du lit de la stria terminalis (BNTS), l'aire préoptique médiale (MPA), et l'amygdale (Young and Gainer, 2003) En périphérie, également dépendant des espèces, l'OT peut être produite par différents organes tels que l'utérus, le placenta, les ovaires, les testicules et le cœur (Ivell et al., 1997; Ivell and Richter, 1984). Cette production locale participe aux effets périphériques (et peut être centraux ?) conjointement à la production hypothalamique.

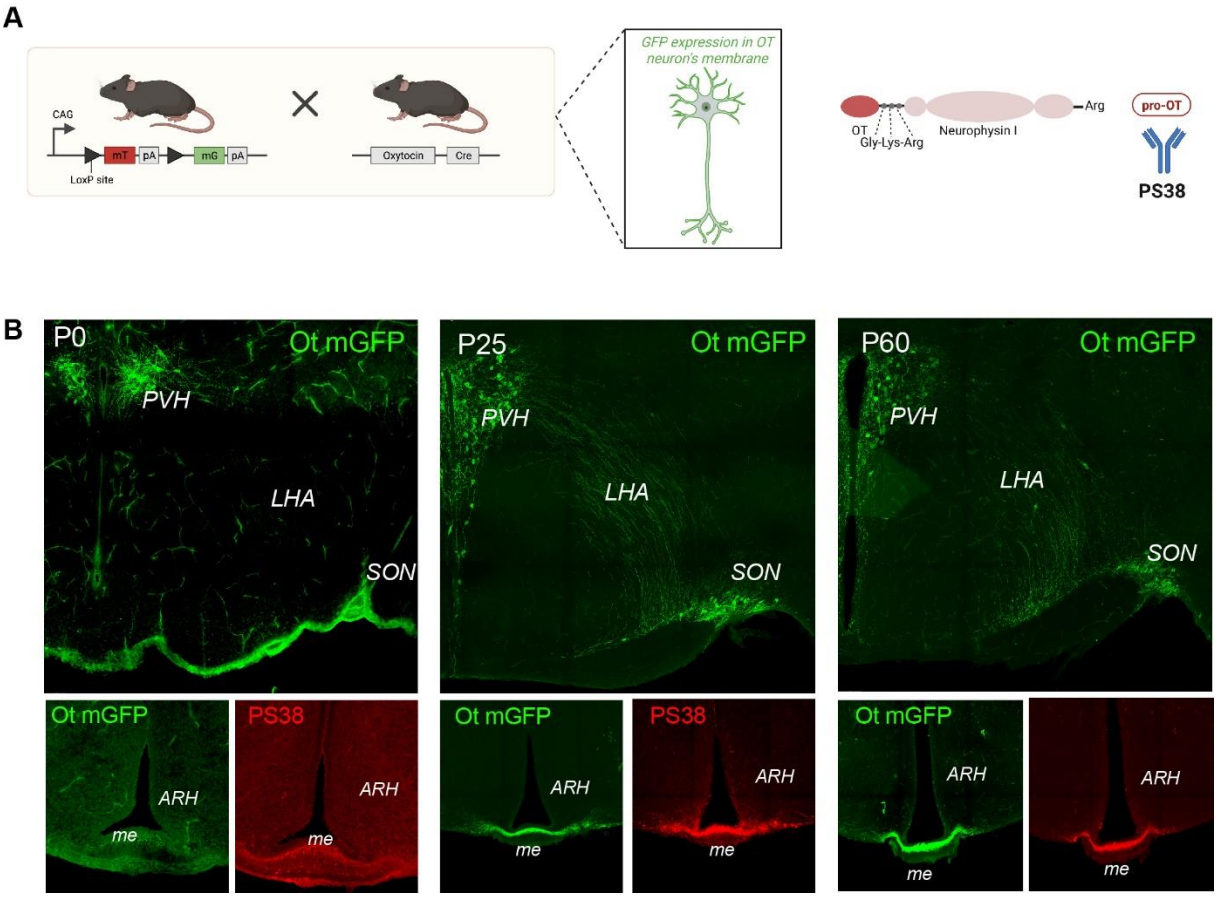


Figure 10 : Développement postnatal des neurones à ocytocine chez la souris mTmG. (A) croisement génétique des souris mTmG avec les souris *Ot*-Cre permettant l'expression de la GFP membranaire dans les neurones à OT et immunomarquage contre la forme pro-OT utilisant l'anticorps PS38. (B) Image confocale de l'hypothalamus antérieur et au niveau de l'ARH à P0 (panel gauche) P25 (panel central) et P60 (panel droit).

4.1.5. Développement des neurones à ocytocine

Le développement du système ocytocinergique a été largement détaillé dans la revue de 2014 par Grinevich et ces collègues (Grinevich et al., 2014). Chez les rongeurs, les noyaux SON et PVH commencent à apparaitre dès E12 (Dongen, 1989) et s'établissent définitivement vers E14 (Nakai et al., 1995). Des neurones exprimant la Neurophysine-I (la protéine porteuse de l'ocytocine, OT) peuvent également être détectés dès E12, les formes intermédiaires de l'OT (VA10) sont détectables à E16, (Grinevich et al., 2015) et la forme mature de l'OT n'est détectée qu'après la naissance (Miriam Altstein, 1988). De même, les neurones à POMC et AgRP, les neurones à OT subissent une étape importante de la maturation au cours des deux premières semaines de la vie postnatale, avec une mise en place progressive de leur projection (Godefroy et al., 2017) et la maturation progressive de leurs propriétés morphologiques et électrophysiologiques (Bouret and Muscatelli, 2021).

4.1.5.1. Projections des neurones à ocytocine

Selon la conception classique, les neurones magnocellulaires de l'OT se dirigent vers l'hypophyse postérieure pour libérer l'OT dans la circulation sanguine et les neurones parvocellulaires de l'OT projettent vers une grande variété de régions cérébrales intra- et extra-hypothalamiques pour moduler divers aspects des fonctions autonomes. Des travaux plus récents utilisant le marquage génétique des neurones et la microscopie à feuillet de lumière, suivis de reconstructions 3D, ont permis de dresser une carte complète des neurones OT et de leurs projections depuis le début du développement jusqu'à l'âge adulte (Jurado, 2020) (https://kimlab.io/brain-map/ot_wiring). En 2023, une étude de reconstruction du projectomes de 264 neurones OT du PVH a permis de regrouper hiérarchiquement deux population de neurone OT, avec des caractéristiques morphologiques et transcriptionnelles distinctes et des schémas de projection mutuellement exclusifs (Li et al., 2024): Une population de neurone C1 correspondant aux neurones magnocellulaires et une population C2 correspondant aux neurones paraventriculaires projetant notamment vers (Figure 11) :

- La MPA qui est impliquée dans la régulation thermique et certains comportements sexuels, cette zone est également cruciale pour les comportements parentaux,
- Le noyau du BNTS et les noyaux septaux : ces régions sont importantes pour la modulation de l'anxiété et de la peur, ainsi que pour la régulation des comportements sociaux,
- Le cortex préfrontal (PFC) qui est essentiel pour la prise de décision. Le PFC bénéficie des effets de l'OT sur la réduction du stress et l'amélioration des interactions sociales,
- Le noyau accumbens (ACB). Ce centre clé de la récompense reçoit des projections d'OT qui peuvent influencer le plaisir et la motivation, y compris le désir alimentaire,
- L’amygdale centrale (CEA), médiale (MEA), et basolatérale (BLA). Ces régions sont essentielles dans le traitement des émotions et peuvent être régulées par l'OT pour moduler l'anxiété et la peur,
- L’hippocampe qui est impliqué dans la formation de la mémoire. L'hippocampe est affecté par l'ocytocine, qui peut aider à renforcer les souvenirs sociaux et affectifs,
- L’aire tegmentale ventrale (VTA). L'OT dans la VTA peut influencer les comportements de récompense et la motivation,
- Le noyau tractus solitarius (NTS) et noyau dorsal du nerf vague (DMV) : ces régions du tronc cérébral sont impliquées dans la régulation autonome et la satiété et sont modulées par l'OT, influençant potentiellement la consommation alimentaire et les réponses digestives.

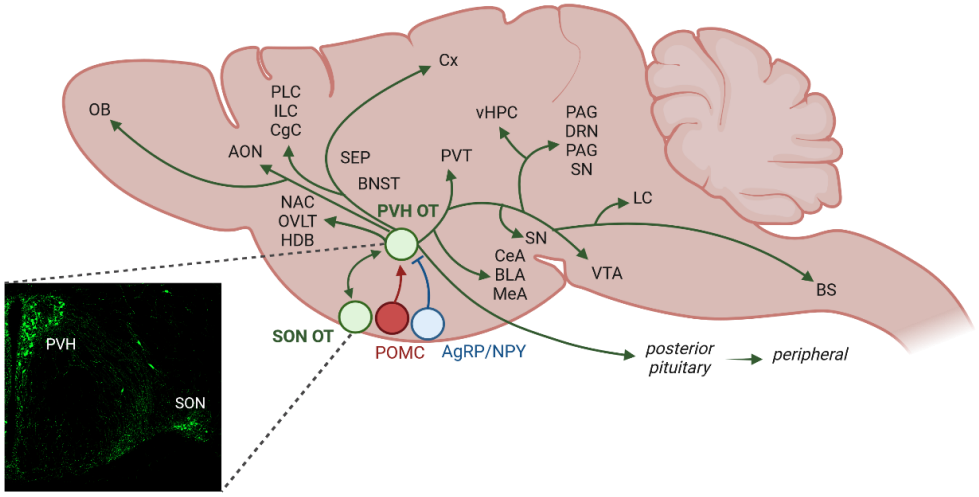


Figure 11 : Schéma des projections des neurones à OT dans le cerveau de souris. Image confocale de l'hypothalamus antérieur par Pierre-Yves Barelle, Illustration par Sebastien Bouret, crée avec BioRender.

Ce patron de projections peut varier en fonction des espèces mais de manière générale, la diversité des zones de projections des neurones à OT témoigne de la grande variété de fonction dans lesquelles ces neurones sont impliqués, fonctions que je détaillerai dans les parties suivantes.

4.1.5.2. Patron d'expression du récepteur

L'OT n'a pour le moment qu'un seul récepteur connu, qui a été découvert en 1992 (Kimura et al., 1992). Le récepteur à l'ocytocine (OTR), est un récepteur à 7 domaines transmembranaires de 389 acides aminés qui appartient à la famille de récepteurs rhodopsin-type1 (classe1) couplés aux protéines G (GPCR). De manière générale, ce récepteur est très largement distribué à travers le cerveau et son expression est également dépendante de l'espèce. Cependant, on le retrouve exprimé chez le rongeur de manière plus importante dans les régions de l'amygdale (CEA et MEA), PFC, hippocampe (subiculum), ACB et le VMH. On le retrouve également dans le bulbe et tubercule olfactif (OB) et le cortex pyriforme, régions impliquées dans l'intégration des stimuli olfactifs et phéromonaux, qui jouent un rôle central chez le rongeur dans la recherche de partenaire, l'établissement des liens sociaux et la prise alimentaire (Figure 12). Chez l'Humain, on retrouve l'OTR de manière plus importante, entre autres, dans les noyaux du septum, la MPA, le NTS, le noyau basal de Meynert, la bande diagonale de Broca, la zone hypothalamique postérieure, et la corne dorsale de la moelle épinière supérieure (Loup et al., 1991, 1989).

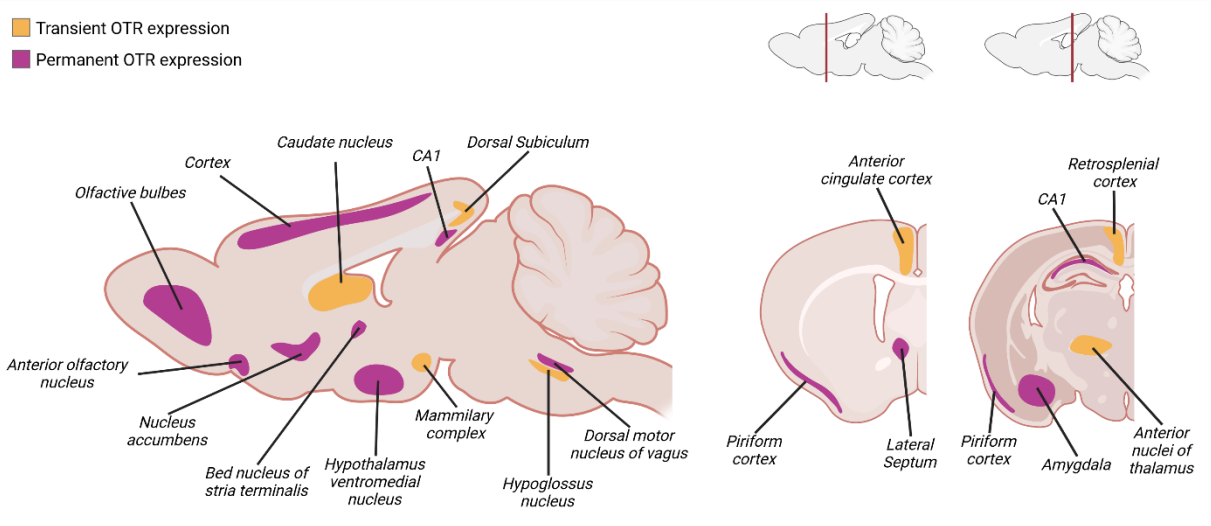


Figure 12 : Région cérébrale du rongeur exprimant l'OTR. Les régions dans lesquelles l'expression transitoire de l'OTR est observée sont colorées en jaune ; les régions dans lesquelles l'expression de l'OTR est maintenue jusqu'à la fin de la vie sont colorées en magenta. Créé avec BioRender.com à partir des travaux de (Grinevich et al., 2014; Son et al., 2022).

Un fait notable est que le patron de projections des axones à OT ne correspond pas toujours avec les zones d'expression de l'OTR (Leng et al., 2008b). Par exemple, le VMH reçoit peu ou pas de projections ocytocinergiques directes mais exprime une grande quantité d'OTR. Dans ce contexte, l'hypothèse est que l'OT diffuse de façon volumique pour atteindre ces noyaux (Ludwig and Leng, 2006). Dans le cas spécifique du VMH, compte tenu de la proximité relative de ce noyau avec le PVH et le SON, une hypothèse serait que l'OT provienne de la libération dendritique d'OT dans le troisième ventricule à partir des neurones situés dans le PVH ou le SON (Sabatier et al., 2007). En plus de son expression centrale, l'OTR est également retrouvé en périphérie au niveau des reins, du cœur, des îlots de Langerhans du pancréas, des ostéoblastes et ostéoclastes des os et des tissus adipeux bruns et blancs, qui par ailleurs est le tissu qui exprime les plus hauts niveaux d'ARNm pour *otr* (Elabd et al., 2008; Sun et al., 2019; Tamma et al., 2009; Zingg and Laporte, 2003).

4.1.5.3. Variabilité dépendante du sexe

S’ajoutant aux différences inter-espèces des patrons de projections et d’expression de l’OT et de son récepteur précédemment décrit, il existe également un dimorphisme sexuel. L’OT et l’OTR sont généralement plus exprimés chez les femelles (Carter 2007; Zingg et Laporte 2003). On comptabilise par marquage immunohistochimique plus de corps cellulaires et de fibres à OT dans le cerveau des rates femelles que dans celui des mâles (Häussler et al., 1990). De plus chez les rates femelles, une expression sexuellement dimorphique de l’OTR est observée dans certaines régions du cerveau où l’OT est connue pour avoir des effets comportementaux maternels, comme le noyau hypothalamique VMH, tandis que d'autres régions telles que le noyau central de l'amygdale ne présentent pas de dimorphisme sexuel (Uhl-Bronner et al., 2005).

4.2. Rôles de l’ocytocine

L’OT est une neurohormone multifonctionnelle impliquée dans la régulation d’une grande variété de comportements, bien souvent étroitement interconnectés. Dans les parties suivantes je vais développer les principaux rôles de l’OT dans les comportements liés aux comportements sociaux, reproducteurs, mnésiques et de régulation du métabolisme. Étonnamment, ces domaines reflètent également les comportements altérés observés dans le SPW.

4.2.1. Implication de l’ocytocine dans les comportements sociaux

L’OT joue un rôle essentiel dans les comportements sociaux en facilitant les comportements d'affiliation chez diverses espèces, qui sont importants pour former des liens sociaux et atténuer les effets néfastes de l'isolement social. Cette partie se concentre sur la façon dont l’OT régule les comportements de reconnaissance sociale, d'affiliation tels que les liens de couple, associés au stress et les comportements agressifs.

4.2.1.1. Reconnaissance sociale

La capacité à reconnaître les individus est nécessaire pour naviguer efficacement dans les interactions sociales. Cette capacité permet de distinguer les amis des ennemis, permettant des réponses appropriées, qu'elles soient affiliées ou agressives. Les primates, et particulièrement les humains, s’appuient principalement sur des signaux visuels et auditifs pour la reconnaissance sociale. Chez les rongeurs, la formation de la mémoire sociale dépend principalement de signaux olfactifs, à la fois volatils et phéromonaux. L'OT joue un rôle important dans ce contexte en modulant la façon dont ces signaux sociaux sont traités.

Les souris mâles OT KO présentent des déficits importants dans le développement de la mémoire sociale, comme en témoignent les tests d'habituation-déshabituation et les tests de reconnaissance sociale réalisés par Ferguson et al., dans les années 2000 (Ferguson et al., 2001, 2000; Lee et al., 2008). Par ailleurs, les souris OTR KO continuent d'explorer une femelle familière comme si elle était nouvelle (Takayanagi et al., 2005). A l'inverse, l'infusion d'OT directement dans les bulbes olfactifs, MPA et le ventricule latéral améliore les capacités de reconnaissance sociale (Dluzen et al., 1998; Popik and van Ree, 1991).

Chez l'Humain, l'administration intranasale d'OT a fait l'objet de recherches approfondies pour ses effets potentiels sur l'amélioration de la cognition sociale, en particulier dans le contexte de la mémoire et de la reconnaissance faciale. Plusieurs études ont pu montrer que l'injection intranasale d'OT augmentait la rétention de mémoire des visages présentant des expressions émotionnelles telles que la colère et la neutralité chez les sujets masculins et féminins par rapport à des stimuli non-sociaux (Guastella et al., 2009; Rimmele et al., 2009; Savaskan et al., 2008). Cela suggère que l'OT pourrait améliorer la saillance ou la mémorisation des expressions faciales chargées d'émotion plutôt qu'une amélioration générale de la mémoire.

4.2.1.2. Attachement

En plus de ses liens dans la reconnaissance sociale, chez les espèces monogames comme les campagnols, l'OT à un rôle essentiel dans la création de liens entre les couples et la sélection des partenaires en particulier chez les femelles. L'évaluation de la préférence de partenaire est une méthode standard utilisée dans les laboratoires pour mesurer les liens de couple au cours duquel les animaux testés ont le choix de passer du temps avec leur partenaire familier ou avec nouvel animal étranger. Il a été démontré que la présence d'OT facilite la préférence des femelles pour leur partenaire, tandis que le blocage des OTR avec des antagonistes réduit cette préférence (Cushing and Carter, 2000; Williams et al., 1992). L'influence de l'OT sur la préférence du partenaire mâle est moins constante. Alors que certaines études rapportent qu'un traitement aigu par l'OT juste avant le test peut faciliter la préférence du partenaire chez les campagnols mâles (Cho et al., 1999), d'autres n'ont trouvé aucun rôle significatif pour l'OT dans l'influence de la préférence du partenaire mâle (Cushing and Carter, 2000; Winslow et al., 1993). Cette divergence peut être attribuée aux différences dans les voies OT et vasopressine et dans la distribution des récepteurs dans le cerveau du campagnol mâle, qui est aussi connus pour être sexuellement dimorphique.

Chez l'Humain, des études examinant l'activité cérébrale des individus dans des contextes romantiques ont montré que les individus qui se décrivaient comme étant « intensément amoureux » présentaient une activation significative dans les zones du cerveau riches en récepteurs à l''OT (Bartels and Zeki, 2004; Fisher et al., 2005, 2006). Plus particulièrement, chez la femme, l'OT est positivement corrélée à des sentiments d'attachement autodéclarés plus élevés. Les femmes présentant des niveaux d'OT plus élevés ont une plus grande tendance à exprimer et à partager des émotions (Tops et al., 2007). De plus, les couples hétérosexuels ayant reçu de l'OT intranasale avant de s'engager dans une « discussion conflictuelle » enregistrée sur vidéo, affichaient des comportements de communication significativement plus positifs que ceux ayant reçu un placebo (Ditzen et al., 2009). Ces études suggèrent que l'OT faciliterait les liens émotionnels et l'ouverture dans les relations interpersonnelles en atténuant potentiellement les conflits et en favorisant l'empathie entre les partenaires.

De façon intéressante, les mécanismes d'attachement induits par l'OT ne s'arrêtent pas aux interactions intraspécifiques. L'étude de Nagasawa et ses collaborateurs illustre un exemple fascinant de comment l'OT peut profondément influencer les relations affectives à travers les espèces. L'étude a révélé que lors des interactions où un chien et son propriétaire échangent un "regard prolongé", les deux parties montrent des niveaux accrus d'OT dans leurs urines. Le "regard long" entre un chien et son propriétaire peut être comparé aux interactions visuelles intimes entre les humains qui renforcent les liens affectifs. Cette étude de Nagasawa met en lumière le rôle de l'OT comme une "hormone de l'attachement" universelle, facilitant les liens sociaux au-delà des barrières d'espèce (Nagasawa et al., 2009).

4.2.1.3. Stress

L'OT est connue pour ses effets amortisseurs sur la réponse au stress, en particulier dans la façon dont il module l'HHS (Neumann, 2002). Divers travaux ont montré que les taux plasmatiques d'OT augmentent suite à diverses formes de stress, notamment les contraintes physiques et le stress social (Engelmann et al., 1999; Jezova et al., 1995; Lang et al., 1983). Cette augmentation d'OT peut aider à atténuer la réponse globale au stress, favorisant une récupération plus rapide et réduisant les effets indésirables à long terme associés au stress chronique.

De plus, l'OT semble jouer un rôle important dans l'amélioration des effets anxiolytiques du soutien social. Lors de situations socialement stressantes telles que le test de stress social de Trèves, qui implique de prendre la parole en public et de réaliser des tâches arithmétiques devant un public, Heinrichs et ses collaborateurs (Heinrichs et al., 2003) ont constaté que lorsque les participants recevaient de l'OT dans ce contexte, il y avait une diminution marquée des niveaux de corticostérone, indiquant une réponse au stress plus faible. En accord avec ces premiers résultats, l'administration intranasale d'OT réduit l'activation amygdalienne en réponse à des scènes effrayantes ou menaçantes (Kirsch et al., 2005). Ces expériences mettent en évidence le potentiel de l'OT non seulement dans la régulation des réponses biologiques au stress, mais également dans l'amélioration de l'efficacité du soutien social en tant que tampon contre le stress.

4.2.1.4. Agressivité

Des études ont montré que les souris mâles OT KO et OTR KO présentent des comportements agressifs accrus, comme dans le paradigme résident-intrus (Takayanagi et al., 2005; Winslow et al., 2000), soutenant l'hypothèse selon laquelle des perturbations dans la voie de signalisation de l'OT peuvent conduire à une agressivité augmentée. L'effet de l'OT sur le comportement agressif des femelles est mieux connu dans le contexte du comportement maternel et sera donc discuté dans une autre partie spécifique.

Chez l'Humain, très peu de choses sont connues sur les effets de l'OT sur le comportement agressif. Cependant, il a été constaté que les taux plasmatiques basaux d'OT étaient en corrélation négative avec l'agressivité et positivement avec l'empathie, en particulier chez les garçons souffrant de troubles de déficit de l'attention et d'hyperactivité (TDAH) (Demirci et al.,2016).

L'administration intranasale d'OT chez l'Humain a des effets sociaux complexes. Il a été démontré que cela renforce le favoritisme et la coopération endogroupe, mais augmente également l'agressivité et les comportements antisociaux envers les membres de l'exogroupe (De Dreu et al., 2010; De Dreu and Kret, 2016). Ce double rôle suggère que l'impact de l'OT sur le comportement social humain peut dépendre du contexte et des études plus approfondies pour clarifier ces mécanismes et leurs implications pour la dynamique sociale sont nécessaires. Une des pistes à explorer est que le rôle de l'OT dans l'agressivité puisse être lié à ses effets sur la réponse au stress. L'OT peut exercer des effets sur l'émotivité en agissant au sein de l'amygdale. L'OT semble réduire l'activation de l'amygdale en réponse à des stimuli menaçants et peut augmenter les sentiments de confiance et d'affiliation en réduisant l'activation

amygdalienne induite par la nouveauté sociale (Baumgartner et al., 2008; Meyer-Lindenberg, 2008). Il a été également observé que l'OT diminue la libération d'hormones de stress qui pourraient influencer indirectement les comportements agressifs en réduisant la réponse physiologique au stress associée à de telles interactions sociales (Legros, 2001; Stachowiak et al., 1995).

Il a été démontré également que l'administration intranasale d'OT augmente le temps passé par les individus à regarder la région des yeux des visages humains, améliorant ainsi la capacité à capter des signaux sociaux cruciaux (Guastella et al., 2008a). Cette concentration accrue sur les yeux est également en corrélation avec une meilleure capacité à se souvenir des visages heureux et à déduire les états mentaux des autres, ce qui suggère un traitement plus profond des informations émotionnelles et sociales (Di Simplicio et al., 2009; Guastella et al., 2008b). L'OT aide à moduler les perceptions des autres en atténuant les sentiments négatifs envers les visages associés à des évaluations affectives négatives, en particulier lorsque ces visages présentent un regard direct (Petrovic et al., 2008). En augmentant le contact visuel, l'OT renforce les sentiments de confiance et d'empathie, aide à réduire l'impact émotionnel des interactions sociales négatives et améliore la perception de neutralité ou de positivité dans les engagements sociaux.

Malgré ces résultats positifs, les voies et mécanismes exacts par lesquelles l'OT intranasale affecte ces comportements restent flous. On suppose que l'OT pourrait influencer les systèmes cérébraux impliqués dans la cognition sociale mais le passage de la barrière hémato-encéphalique de l'OT reste encore incertain. Cependant, l'amélioration de la mémoire des stimuli sociaux par l'OT intranasale présente un potentiel thérapeutique important, en particulier pour les troubles caractérisés par des déficits de la cognition sociale, tels que les TSA et la schizophrénie ou les patients atteints du SPW.

4.2.3. Implication de l’ocytocine dans les fonctions de la reproduction

Dans le contexte de la reproduction, l’OT est impliquée dans plusieurs processus, notamment l’accouchement, la lactation, les comportements maternels et sexuels, influençant divers aspects de la fonction masculine et féminine (Witt, 1995).

4.2.3.1. Comportement sexuel

4.2.3.1.1. Chez le mâle

L’OT est impliquée dans la fonction érectile, l'activité copulatoire et l'éjaculation. Chez le lapin et le rat, il a été démontré que l'administration aiguë d'OT améliore le comportement sexuel, accélère le moment de l'éjaculation et augmente le nombre d'éjaculations ou d'intromissions avant l'éjaculation (Arletti et al., 1985; Melin and Kihlstroem, 1963; Stoneham et al., 1985). Il est intéressant de noter que les effets de l'OT sur l'érection et le comportement sexuel dépendent de la dose. Alors que de faibles doses d’OT peuvent faciliter ces comportements, des doses élevées ont tendance à inhiber la fréquence des érections et à augmenter la latence de l'intromission, suggérant une courbe de réponse en forme de U inversé (Argiolas et al., 1987; Stoneham et al., 1985). En effet les niveaux élevés d'OT peuvent contribuer à la satiété sexuelle, inhibant la poursuite du comportement sexuel masculin. Cette hypothèse est soutenue par plusieurs expériences. La première a démontré que l’OT réduisait les comportements anxieux jusqu'à 30 minutes après l'accouplement, suggérant un effet calmant après l'accouplement (Waldherr and Neumann, 2007). Les suivantes ont montré que l'administration ICV aiguë d'OT peut inhiber le comportement sexuel chez les campagnols des prairies mâles (Mahalati et al., 1991), tandis que l'infusion chronique augmente le temps passé à interagir avec les femelles sans augmenter le comportement sexuel (Witt et al., 1992).

Chez l’Humain, les OTR sont présents dans divers tissus reproducteurs masculins, notamment les corps caverneux et l'épididyme du pénis. La liaison de l’OT à ses récepteurs influence la contractilité et est important pour les processus physiologiques tels que l'éjaculation (Filippi et al., 2003; Vignozzi et al., 2004). Chez les hommes et les femmes, il est démontré que les taux plasmatiques d'OT augmentent pendant l'excitation sexuelle et atteignent leur maximum pendant l'orgasme (Blaicher et al., 1999; Carmichael et al., 1987).

Bien que les effets de l'OT soient bien documentés, elle seule ne peut pas provoquer d'érections en l'absence de testostérone. Dans les modèles castrés, les érections sont abolies même avec l'administration d'OT, mais peuvent être rétablies avec la co-administration de testostérone (Melis et al., 1994). De plus, des études impliquant des mâles OT KO ont montré que ces mâles peuvent produire des portées normales, ce qui indique que l'absence d'OT endogène n'altère pas fondamentalement le comportement sexuel ou la fertilité (Nishimori et al., 1996; Young et al., 1996).

4.2.3.1.2. Chez la femelle

L'OT fait partie intégrante de la régulation des comportements sexuels et de la maturation féminine, interagissant de manière significative avec les signaux hormonaux sexuels et des régions spécifiques de l'hypothalamus pour moduler la réceptivité sexuelle.

L'OT coordonne le début de la maturité sexuelle chez les femelles en interagissant avec l'hormone de GnRH. Il a été démontré que le traitement avec un antagoniste d'OT diminue considérablement la fréquence du pulses de la GnRH, ce qui retarde l'âge de l'ouverture vaginale et le début du premier œstrus chez les femmes (Parent et al., 2008).

L'OT participe également à l'amélioration de la probabilité d'accouplement. En effet, des injections sous-cutanées quotidiennes d'OT pendant cinq jours augmentent la probabilité d'accouplement par rapport aux femelles traitées avec une solution saline. De plus, lorsque l'OT est administrée avec des œstrogènes, elle augmente la réceptivité sexuelle dans une plus grande mesure que les œstrogènes seuls (Cushing and Carter, 1999). L'effet synergique entre l'OT et les œstrogènes pour améliorer le comportement sexuel féminin s'explique en partie par l'augmentation des comportements de lordose, une posture adoptée par les rongeurs femelles lors de l'accouplement qui implique une cambrure de la colonne vertébrale pour faciliter la copulation. L'injection d'OT chez les femelles prétraitées avec des œstrogènes, de la progestérone ou les deux, augmente ces comportements de lordose (Caldwell et al., 1986; Gorzalka and Lester, 1987).

4.2.3.2. Accouchement, lactation et comportement maternelle

4.2.3.2.1. Accouchement

La première fonction découverte de l'OT était de faciliter les contractions des muscles lisses de l'utérus pendant le travail, grâce à ses puissantes propriétés utérotoniques, ce qui en fait une hormone clé dans le déclenchement du travail. Ainsi, à l'approche du travail, l'utérus devient de plus en plus sensible à l'OT. Des travaux ont indiqué que les œstrogènes élèvent considérablement les niveaux d'ARNm de l'*OTR* dans le myomètre pendant une période limitée, atteignant des niveaux qui dépassent de loin, 70 fois, ceux trouvés dans l'hypothalamus (Lefebvre et al., 1992; Richter et al., 2004). Le pic de densité des récepteurs se produit au début du travail (Fuchs et al., 1995; Kimura et al., 1992), améliorant la réactivité de l'utérus à l'OT et facilitant le début des contractions du travail. Après la parturition, on observe une diminution rapide des concentrations de l'OTR utérin. Chez le rat, par exemple, les niveaux d'ARNm de l'OTR utérin chutent de plus de sept fois dans les 24 heures suivant la naissance (Zingg et al., 1995). Cette régulation négative rapide est probablement un mécanisme de protection permettant de prévenir les contractions utérines excessives pendant une période où les niveaux d'OT restent élevés pour soutenir la lactation.

En plus de son expression dans l'utérus, l'expression du gène *OT* est également observée dans les tissus placentaires et l'amnios (Chibbar et al., 1993), tant chez le rat que chez l'humain. Cela suggère un rôle accru de l'OT à ce stade critique, préparant l'utérus au travail imminent. Il est intéressant de noter que des études menées sur des souris déficientes en OT montrent que la parturition n'est pas affectée (Nishimori et al., 1996; Young et al., 1996), ce qui suggère que la présence systémique d'OT pourrait ne pas être essentielle au déroulement du travail. Cela indique un rôle potentiel de l'OT principalement comme médiateur local plutôt que comme hormone circulante pendant la parturition. Dans l'ensemble, le rôle multiforme de l'OT dans la facilitation des processus de travail et post-travail illustre son importance pour une parturition efficace. Cliniquement, l'OT synthétique, connue sous le nom de Pitocin, est couramment utilisée pour déclencher les contractions du travail (Hayes and Weinstein, 2008).

4.2.3.2.2. Reflexe d'éjection du lait

Le rôle de l'OT dans le reflex d'éjection du lait a été découvert pour la première fois par Ott et Scott. L'OT joue également un rôle central dans la physiologie de la lactation. Les études sur des souris OT KO ont montré qu'elles ne parviennent pas à allaiter efficacement leur progéniture, principalement en raison de leur incapacité à exécuter le réflexe d'éjection du lait, également connu sous le nom de réflexe « d'éjection » (Nishimori et al., 1996; Young et al., 1996). Cette fonction essentielle facilite l'allaitement, l'OT y joue un rôle central dans le déroulement de ce processus.

Le réflexe d'éjection du lait est une réponse neuroendocrinienne finement régulée qui commence par la stimulation mécanique des récepteurs tactiles situés dans le mamelon. Lorsqu'un nourrisson commence à téter, ces récepteurs sont stimulés, envoyant des impulsions sensorielles via les fibres nerveuses afférentes à la moelle épinière. Ces impulsions se déplacent ensuite vers l'hypothalamus, où elles activent des neurones ocytocinergiques du PVH et du SON. Les neurones à OT produisent en réponse une activité de rafale synchronisée à haute fréquence. Cette activité implique de brèves explosions (3 à 4 secondes) de potentiels d'action à haute fréquence qui se reproduisent toutes les 5 à 15 minutes. Chaque explosion d'activité neuronale entraîne une libération d'OT de l'hypophyse postérieure dans la circulation sanguine (Israel et al., 2014). Une fois libérée dans la circulation sanguine, l'OT est acheminée vers les glandes mammaires, où elle a un effet direct sur les cellules myoépithéliales entourant les canaux galactophores et les alvéoles. La liaison de l'OT à son récepteur sur ces cellules déclenche leur contraction. Cette contraction aide à expulser le lait des alvéoles, à travers les canaux galactophores et hors du mamelon, le rendant ainsi disponible pour le nourrisson.

Il est intéressant de noter que le réflexe qui déclenche la libération d'OT peut être activé avant même que le nourrisson ne commence à téter. Chez l'Humain, des facteurs tels que le fait d'entendre le bébé pleurer peuvent anticiper le besoin d'alimentation et déclencher la libération d'OT, préparant ainsi le corps à l'allaitement (McNeilly et al., 1983). Ce mécanisme d'anticipation garantit que la mère est prête à allaiter dès que l'enfant commence à téter, optimisant ainsi le processus d'alimentation et renforçant le lien mère-enfant.

4.2.3.2.3. Comportement maternel

L'OT et son récepteur jouent un rôle crucial dans la régulation du comportement maternel chez les mammifères. Pendant la parturition et lors de l'allaitement, il y a une augmentation significative de la libération de OT et de l'expression OTR dans diverses régions du cerveau telles que le SON, la mPOA, le BNST, l'OB, l'amygdale et particulièrement dans le VMH. Il est estimé que l'augmentation de l'expression d'OT et d'OTR facilite l'apparition et le maintien des comportements maternels essentiels à la survie et au développement de la progéniture et sont fortement régulés par l'OT (Leng et al., 2008a).

Dans les populations de rats, il existe des variations naturelles dans la façon dont les mères interagissent avec leurs petits. Certaines mères présentent des niveaux élevés de comportements attentionnés, tandis que d'autres présentent des niveaux plus faibles de ces comportements. Les mères à comportements attentionnés élevés présentent des niveaux plus importants d'OTR dans les régions associées au comportement maternel et à l'agressivité maternelle, tels que le BNST, la MPA, le septum latéral et le noyau central de l'amygdale (Champagne et al., 2001; Francis et al., 2000).

Le rôle promoteur des comportements maternels de l'OT est influencé par les niveaux d'œstrogènes. Chez les femelles intactes présentant des niveaux élevés d'œstrogènes endogènes, les injections *icv* d'OT induisent des comportements maternels complets. Cet effet est absent chez les femelles ovariectomisées, à moins qu'elles ne soient supplémentées avec du benzoate d'estradiol (EB) (Pedersen and Prange, 1979). De plus, l'effet de l'OT sur les comportements maternels dépend de la dose, des doses plus élevées provoquant des réponses plus fortes chez les rats sensibilisés à l'EB (Pedersen et al., 1982). L'injection d'antagoniste à l'OT dans le noyau accumbens transforment les mères à comportements attentionnés élevés en mères à comportements attentionnés faibles (Champagne et al., 2001; Olazábal and Young, 2006)). Des études sur les souris OT KO et OTR KO confirment ces résultats, car les femelles KO présentent des déficiences dans les comportements maternels et l'éjection du lait (Nishimori et al., 1996; Young et al., 1996). Ces études mettent collectivement en évidence l'interaction complexe entre l'ocytocine, son récepteur et les œstrogènes pour faciliter les soins maternels.

L'agressivité maternelle chez les mammifères femelles, particulièrement prononcée pendant la période post-partum, représente un comportement complexe façonné par de multiples facteurs et voies neurobiologiques essentiels à la protection de la progéniture. Cette agressivité se manifeste généralement chez les rongeurs lorsque les mères attaquent des mâles inconnus introduits dans leur environnement peu de temps après l'accouchement (Lonstein and Gammie, 2002). Des travaux ont mis en évidence le PVH comme un noyau clé influençant cette

forme d'agression. Il a été démontré que des interventions spécifiques dans le PVH, telles que des lésions de l'acide iboténique ciblées sur sa partie parvocellulaire ou le blocage de la synthèse de l'OT via des injections d'ARNm antisens d'OT dans ce noyau, augmentent l'agressivité maternelle, suggérant un rôle central de l'OT dans la modulation de ce comportement (Giovenardi et al., 1998). De plus, l'administration d'OT dans l'amygdale est également corrélée à une agression maternelle accrue (Ferris et al., 1992; Lubin et al., 2003), soulignant l'implication de cette région cérébrale dans la régulation des réponses agressives pendant la période post-partum. L'ensemble de ces recherches met en évidence des contrôles neuroendocriniens complexes sous-jacents à l'agression maternelle, mettant l'accent sur l'interaction entre la signalisation neurochimique et les structures cérébrales spécifiques.

4.2.4. Implication de l'ocytocine dans les fonctions de la mémoire

L'hippocampe, une région importante pour la formation de la mémoire, présente des niveaux d'expression élevés d'OTR (Insel et al., 1991). Des études sur des tranches d'hippocampe ont montré que le traitement par OT peut améliorer la potentialisation à long terme (LTP), un processus fondamental pour l'apprentissage et la mémoire, et augmenter les niveaux de CREB phosphorylé, un marqueur de l'activation cellulaire et de la plasticité synaptique (Tomizawa et al., 2003). Ces résultats suggèrent un rôle de soutien d'OT dans l'amélioration de la rétention de la mémoire en agissant au niveau synaptique dans l'hippocampe. Malgré ces résultats favorables, d'autres études indiquent qu'OT pourrait jouer un rôle plus nuancé, voire contradictoire, dans les processus d'apprentissage. Par exemple, l'administration d'OT à des hommes en bonne santé induit des déficits d'apprentissage (Bruins et al., 1992). Dans un contexte social, l'OT intranasal augmente la mémoire des visages neutres en colère après 24 heures, chez les hommes (Guastella et al., 2009; Savaskan et al., 2008) mais sans influence sur la mémoire des stimuli non sociaux observés précédemment (Rimmele et al., 2009). Ces résultats suggèrent que les effets d'OT sur la mémoire pourraient dépendre du contexte, notamment social.

4.2.5. Implication de l'ocytocine dans le contrôle de la prise alimentaire et la dépense énergétique

Le rôle de l'OT dans la régulation de la prise alimentaire a pu être démontré dans de nombreuses études. Par exemple, il a été démontré que les administrations *icv* et intrapéritonéales (*ip*) d'OT inhibent fortement la prise alimentaire de manière dose-dépendante, les doses les plus élevées d'OT entraînant les réductions les plus substantielles de l'apport alimentaire. Cet effet est également observé avec les agonistes d'OT et peut être bloqué par les antagonistes d'OT. L'OT régule également la consommation de liquides, inhibant la consommation d'eau de manière dose-dépendante (Arletti et al., 1989; Olson et al., 1991).

Cependant le rôle de l'OT dans la régulation de la prise alimentaire est complexe et agit à travers divers mécanismes et structures cérébrales pour influencer les comportements alimentaires et les processus métaboliques. L'OT n'est pas à proprement parler une neurohormone anorexigénique, elle est plutôt une hormone modulatrice de la balance énergétique, un chef d'orchestre, qui harmonise les comportements et les effets des autres hormones et peptides anorexigéniques. Premièrement, il est important de rappeler que les neurones à OT centralisent un grand nombre d'informations relatives au métabolisme. Les neurones à OT du PVH exprime le récepteur MC4R est reçoivent une innervation dense à la fois des neurones à POMC et aussi des neurones à AgRP. Au sein du PVH, l'α-MSH produite par les neurones à POMC se fixe et active les neurones magnocellulaires à OT et induit la sécrétion d'OT (Caquineau et al., 2006; Olszewski et al., 2001). A l'inverse, les neurones à AgRP ont un effet antagoniste et inhibent cette sécrétion (Atasoy et al., 2012). La littérature suggère que les signaux orexigéniques de l'AgRP inhibe les réponses de l'OT (Atasoy et al., 2012), et que les signaux anorexigéniques des neurones à POMC renforcent l'activité de l'OT pour signaler la fin du repas (Blevins et al., 2003; Velmurugan et al., 2013). D'autre part, le PVH, et par conséquent les neurones à OT, reçoit également des afférences d'autres noyaux intégrant des informations métaboliques comme le NTS. Les neurones à OT sont stimulés par les hormones métaboliques telles que la leptine et la cholécystokinine (CCK).

Les neurones à OT émettent des projections vers un grand nombre de régions cérébrales. Ils agiraient donc comme des neurones de second ordre, influençant la prise alimentaire en relayant les informations intégrées notamment par le système à un ensemble de régions régulant la prise alimentaire par différent aspects. Globalement, l'OT possède quatre voies possibles pour induire ses effet anorexigéniques : premièrement, elle potentialise les effets anorexigéniques d'autres hormones et peptides. Deuxièmement, elle participe à la promotion d'autres comportements qui rentrent en compétition avec le comportement alimentaire.

Troisièmement, elle interagit avec les noyaux centraux du système de la récompense et participe à la satiété. Dernièrement, elle agit directement au niveau de la périphérie sur le tissu adipeux et le pancréas pour réguler les hormones satiétogènes.

4.2.5.1. Les effets potentialisateurs anorexigéniques de l'OT

4.2.5.1.1. Au niveau du NTS

L'OT induit une diminution de la prise alimentaire en potentialisant les effets anorexigènes des signaux périphériques associés à la fin d'un repas et ce principalement via les projections ocytocinergiques de la partie parvocellulaire du PVH vers le tronc cérébral caudal, en particulier dans le NTS (Blevins et al., 2003; Sawchenko and Swanson, 1982). Les neurones du mNTS jouent un rôle crucial dans le traitement des signaux liés à l'état énergétique, tels que la leptine, la ghréline et le peptide-1 de type glucagon (GLP-1), ainsi que des signaux de satiété gastro-intestinaux (GI) transmis par les voies vagales (Grill and Hayes, 2012). Au niveau du NTS, l'injection d'OT induit une diminution, de façon dose-dépendante de la prise alimentaire. Cette diminution est d'autant plus importante si l'injection d'OT est couplée à la prise d'un repas (Blevins et al., 2003; Grill and Hayes, 2012; Ong et al., 2015). A l'inverse, l'inactivation des OTR dans le NTS entraîne chez le rat des repas spontanés plus importants mais moins fréquents (Ong et al., 2015). Une des pistes d'explication avancées pour expliquer ces effets anorexigènes de l'OT est qu'elle joue un rôle potentialisateur des effets des signaux du tractus GI, de la leptine, et la CCK produite après un repas (Blevins et al., 2003; Grill and Hayes, 2012; Ong et al., 2015).

En plus de cet effet direct central, l'OT peut également influencer indirectement le NTS par son action périphérique sur les OTR exprimés dans les ganglions du nerf vague. Après l'administration périphérique d'OT, les effets anorexigènes et l'expression accrue de c-Fos dans le NTS sont bloqués chez les animaux vagotomisés (Iwasaki et al., 2015). Des études électrophysiologiques sur des tranches de cerveau postérieur de rat confirment que l'OT potentialise les effets excitateurs de la stimulation électrique des voies solitaires (un substitut de la stimulation afférente vagale périphérique) sur les neurones du NTS (Peters et al., 2008).

4.2.5.1.2. Au niveau des neurone GLP-1

En plus de ces effets sur le NTS, l'OT potentialise également les effets anorexigéniques d'autres populations de neurones du tronc cérébrale comme celui des neurones exprimant le GLP-1. Le GLP-1 est un agent anorexigénique principalement produit par l'intestin après un repas et est également synthétisé par les neurones du tronc cérébral caudal. Il fait partie des incrétines et joue un rôle inhibiteur de l'appétit et de la prise alimentaire. Il existe une interaction entre les neurones à OT et à GLP-1. Des études ont montré que les terminaisons immunopositives pour l'OT se trouvent à proximité des neurones à GLP-1 dans le tronc cérébral, suggérant des interactions neuronales directes. Il a été démontré que l'infusion centrale d'OT induisait l'expression de c-Fos dans les neurones produisant le GLP-1 (Rinaman and Rothe, 2002). D'autres expériences donnent un aperçu de la relation hiérarchique entre l'OT et le GLP-1 dans le contrôle de la prise alimentaire. L'administration d'un antagoniste des récepteurs au GLP-1 après la perfusion d'une dose anorexigène d'OT annule les effets coupe-faim de l'ocytocine. A l'inverse, bloquer les OTR puis administrer un ligand synthétique du GLP-1 ne modifie pas les effets anorexigéniques induits par le GLP-1 (Rinaman and Rothe, 2002). Ces expériences indiquent une relation fonctionnelle dans laquelle l'OT influence l'activité des neurones GLP-1, renforçant leur rôle dans la suppression de l'appétit.

4.2.5.1.3. Au niveau de l'ARH

Des études menées par Maejima et ses collègues ont démontré que l'injection d'OT directement dans l'ARH induisait une réduction de la prise alimentaire (Maejima et al., 2014). Des études ultérieures ont pu montrer qu'une population de neurones glutamatergiques possédaient des OTR et que ces neurones se projetaient vers les neurones anorexigéniques exprimant le MC4R au niveau du PVH, incluant potentiellement les neurones à OT (Fenselau et al., 2017). L'OT potentialise, via cette boucle de régulation, les effets anorexigéniques des connexions entre l'ARH et le PVH.

4.2.5.2. La compétition comportementale induite par l'OT

Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes l'OT participe à la régulation de nombreux autres comportements comme ceux liés à la reproduction et au stress (Neumann and Landgraf, 2012). Dans cette mesure, il a été suggéré que les effets anorexigéniques induits par l'OT soient induits par un changement d'attention et de ressources attentionnelles depuis la nourriture vers d'autres comportements (Ebitz and Platt, 2013).

4.2.5.2.1. Les effets médiés par le VMH

Comme je l'ai mentionné précédemment, le VMH est dépourvu de projections ocytocinergiques ; cependant, il exprime de hauts niveaux d'OTR et donc il pourrait être la cible de la diffusion volumique de l'OT. La stimulation de ses récepteurs par injection d'OT directement dans le VMH induit une diminution de la prise alimentaire est une augmentation de l'activité locomotrice spontanée et ce de manière plus remarquable chez les femelles en œstrus (Klockars et al., 2017; Narita et al., 2016; Noble et al., 2014). Compte tenu du rôle du VMH et de l'OT dans l'initiation des comportements reproductifs, l'hypothèse avancée est que l'action anorexigénique de l'OT dans le VMH ne soit pas liée directement à une inhibition du comportement alimentaire mais plutôt à la promotion du comportement sexuel qui rentre directement en compétition avec les comportements alimentaires (Narita et al., 2016).

De plus, dans le contexte la gestation et la lactation, le poids et la prise alimentaire augmentent en compensation de la demande fœtale. Les changements hormonaux, liés aux œstrogènes diminuent l'activité des neurones à OT magnocellulaires et inhibent leur libération, ce qui peut contribuer à l'hyperphagie liée à la gestation (Douglas et al., 2007).

4.2.5.3. Le rôle de l'ocytocine dans les effets récompensant de la prise alimentaire

4.2.5.3.1. La voie mésolimbique

Comme nous l'avons précédemment démontré, les neurones à OT du PVH et du SON émettent leurs projections au niveau du réseau mésolimbique (ACB et VTA), sites où les récepteurs à l'OT sont densément exprimés (Peris et al., 2017; Xiao et al., n.d.). Des études récentes indiquent que l'OT interagit directement au sein de la voie mésolimbique pour limiter la prise alimentaire associée à la nourriture appétente. En effet, les souris OT KO, présentent une consommation accrue de saccharose et d'autres édulcorants, ainsi qu'une préférence pour les liquides riches en glucides (Amico et al., 2005; Billings et al., 2006; Sclafani et al., 2007). Ces mêmes effets peuvent être retrouvés par l'injection d'un antagoniste des OTR dans le VTA (Mullis et al., 2013), tandis que l'activation des récepteurs dans le VTA et ACB diminue la motivation et la consommation de saccharose et la recherche de pastilles de chocolat (Herisson et al., 2016; Wald et al., 2020). Ces effets de l'OT pourraient être médiés par une modulation de la signalisation dopaminergique entre le VTA et ACB (Herisson et al., 2016; Mullis et al., 2013; Wald et al., 2020). En effet, l'application d'un bain d'OT sur des tranches de cerveau *ex vivo* ou la stimulation optogénétique des neurones à OT diminue la transmission synaptique excitatrice des neurones dopaminergiques du VTA vers l'ACB (Peris et al., 2017; Xiao et al., n.d.). Il est intéressant de noter que ces effets anorexigènes sont observés en situation

d'isolement et que l'OT n'affecte pas systématiquement la consommation alimentaire dans un contexte social (Olszewski et al., 2016). En effet, alors que l'activation des récepteurs à l'OT dans l'ACB réduit l'appétence pour la nourriture dans un cadre isolé, elle ne modifie pas la consommation durant un repas social. De plus, les effets de l'OT sur la prise alimentaire semblent également influencés par la dynamique sociale chez les souris. Chez les souris dominantes, un antagoniste des récepteurs à l'OT augmente l'ingestion de sucre indépendamment du contexte social, alors que chez les animaux subordonnés, cet effet est observé uniquement hors d'un contexte social (Olszewski et al., 2015). Ces observations suggèrent que les effets de l'OT sur la prise alimentaire sont modulés par les interactions sociales et pourraient être partiellement dus à son interaction avec le système dopaminergique pour moduler les réponses aux stimuli sociaux externes. L'OT pourrait ainsi renforcer les effets de la dopamine sur le codage de la pertinence des signaux sociaux, influençant ainsi la valorisation sociale tout en réduisant l'attrait des aliments agréables (Shamay-Tsoory and Abu-Akel, 2016).

4.2.5.3.2. L'amygdale

Étant donné le rôle essentiel de l'amygdale dans les aspects émotionnels de la prise alimentaire, quelques études ont exploré comment la signalisation de l'OT par l'amygdale peut influencer les comportements motivés en faveur d'aliments au goût agréable et les comportements de recherche de nourriture.

L'injection d'OT au sein de l'amygdale joue un rôle nuancé dans la modulation de la prise alimentaire, démontrant une réduction modérée mais significative de la prise alimentaire. Plus précisément, il a été démontré que l'administration d'OT dans l'amygdale BLA ou le CEA diminue la consommation de nourriture chez les rats après une période de jeune. Cet effet anorexigène de l'OT peut être diminué par un prétraitement avec un antagoniste des OTR, indiquant un rôle direct des OTR dans ces régions dans le contrôle de la prise alimentaire (Olszewski et al., 2016). Fait intéressant, alors que des doses modérées d'OT réduisent la prise alimentaire, des doses plus élevées dans l'amygdale peuvent induire une aversion gustative conditionnée, suggérant un effet dose-dépendant dans lequel l'OT pourrait potentiellement modifier les préférences ou les aversions alimentaires dans différentes conditions physiologiques (Olszewski et al., 2013).

4.2.5.4. Le rôle de l’ocytocine dans la signalisation périphérique

4.2.5.4.1. Tissus adipeux

L'OT exerce des effets semblables à l’insuline dans les adipocytes. Il stimule l’oxydation du glucose et la lipogenèse, qui sont des processus par lesquels le glucose est converti respectivement en énergie et en lipides. L'OT augmente également l'activité de la pyruvate déshydrogénase, une enzyme essentielle à la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, une molécule clé du métabolisme (Hanif et al., 1982). De façon intéressante, l’OT antagonise les effets lipolytiques dans les adipocytes de rats traités avec le glucagon, induit une augmentation transitoire des taux de calcium intracellulaires et stimule l'activité de la protéine kinase C. Ces deux éléments jouent un rôle crucial dans les voies de transduction du signal qui régulent de nombreuses fonctions cellulaires, notamment le métabolisme et la sécrétion des métabolites du tissu adipeux tel que la leptine (Egan et al., 1990; Schwartz et al., 1991).

Des études utilisant des souris OT KO montrent que même s'il n'y a pas de différences dans l'apport alimentaire quotidien global par rapport aux animaux WT, les souris mâles OTR KO présentent une obésité tardive, probablement en raison d'une augmentation du taux de graisse (Takayanagi et al., 2008). D’un autre côté, le tissu adipeux joue un rôle important dans la régulation de la balance énergétique grâce à la sécrétion de leptine, qui a un impact direct sur le système à OT. Des travaux ont montré qu'un traitement chronique à l'OT, administré via des mini-pompes osmotiques implantées par voie sous-cutanée, peut réduire la consommation alimentaire et le poids corporel chez les rats résistants à la leptine (Balazova et al., 2016). De plus, il a été constaté que l’administration systémique de leptine augmente l’activité électrique des neurones à OT (Velmurugan et al., 2013) et l'administration *icv* de leptine induit également la phosphorylation de STAT3 - un marqueur intracellulaire de la signalisation des récepteurs de la leptine dans les neurones à OT du PVH qui se projettent vers le NTS (Blevins et al., 2004; Perello and Raingo, 2013). Dans l’ensemble, il semble que la leptine puisse agir directement sur les neurones à OT ou indirectement via le système mélanocortinergique pour moduler la prise alimentaire. L'OT, à son tour, améliore la réactivité des circuits neuronaux du NTS à la leptine, fonctionnant comme un potentialisateur aux effets anorexigéniques de la leptine.

4.2.5.4.2. Pancréas

Des sites de liaison de l'OT ont également été identifiés spécifiquement à la périphérie des îlots de Langerhans, principalement là où se trouvent les cellules α productrices de glucagon (Stock et al., 1990). Dans les îlots isolés de souris, il a été démontré que l'OT augmente la libération de somatostatine, de glucagon et d'insuline (Gao et al., 1991).

4.3. Altération du système ocytocinergique dans le syndrome de Prader-Willi

L'hypothèse la plus courante est qu'un dysfonctionnement hypothalamique et hypophysaire est à l'origine de nombreuses caractéristiques du SPW (Iughetti et al., 2008; Miller et al., 2008). De nombreuses anomalies hypothalamique ont été identifiées chez les patients atteints du SPW, ainsi que dans des modèles animaux. Les études *post-mortem* révèlent une réduction significative du volume du PVH 54 % (Swaab, 1997) et une diminution de 38 % du nombre total de cellules dans le PVH chez les patients SPW, comparé aux témoins (Swaab et al., 1995). Des études supplémentaires en imagerie ont confirmé la taille réduite de l'hypothalamus chez les patients SPW, ainsi qu'une hypophyse de morphologie anormale et de taille diminuée. Ces altérations, du PVH et de l'hypophyse posent la question d'une atteinte probable du système ocytocinergique.

Le modèle de souris Magel2-null développé par le groupe de Françoise Muscatelli a montré une réduction spectaculaire du nombre de neurones exprimant la forme mature de l'OT dans le PVH (Schaller et al., 2010).Cependant, cette réduction du nombre de neurones OT semble être la conséquence d'une altération du processus de maturation des neuropeptides OT plutôt que, par exemple, d'un effet sur la neurogenèse ou la mort cellulaire de l'OT. En effet, un nombre similaire de neurones immunomarqués a été observé lors de l'utilisation d'anticorps dirigés contre la prohormone OT ou les formes intermédiaires OT (Schaller et al., 2010). Dans ce modèle il existe également une suppression globale de l'activité des neurones à OT, causée par un déséquilibre des entrées synaptiques. Ce déséquilibre est caractérisé par une réduction des courants post-synaptiques excitateurs et une augmentation des courants post-synaptiques inhibiteurs (Althammer et al., 2022b; Ates et al., 2019). Des analyses IHC supplémentaire chez les patients atteint du SPW montrent une réduction significative du nombre de neurones exprimant l'OT sans qu'il soit possible d'identifier si il sagit de l'OT mature ou des forme intermédiaire (Bochukova et al., 2018; Swaab, 1997). Pris conjointement ces résultats suggèrent une atteinte du système ocytocinergique dans le SPW.

Cependant, cette hypothèse est compliquée par des résultats contradictoires concernant les niveaux d'OT plasmatiques et céphalorachidiens, certains rapports indiquant des niveaux élevés chez les patients atteints du SPW (Johnson et al., 2016; Martin et al., 1998; Swaab et al., 1995). Ces observations soulèvent la question non résolue sur l'importance de ces niveaux élevés et leur relation avec la perte d'expression de la forme mature d'OT au niveau central. Certains auteurs pensent que ces niveaux élevés pourraient refléter une compensation fonctionnelle de l'expression réduite du récepteur d'OT dans le SPW (Johnson et al., 2016). Cependant, cette diminution de l'expression de l'OTR dans le SPW n'est pas encore bien confirmer (Bittel et al., 2007). D'autres remettent en question la fiabilité des dosages d'OT endogène, compte tenu de la nature de l'OT et de sa capacité à se lier à d'autres molécules dans le plasma et le sérum (Leng and Ludwig, 2016; MacLean et al., 2019; Poljak and Sachdev, 2021). La question également de la production par d'autre tissus dans le contexte du SPW reste également insoluble (Leng and Ludwig, 2016).

L'ensemble de ces observations, considérées conjointement avec les rôles de l'OT, soutiennent fortement l'existence d'un lien causal entre les dysfonctionnements du système ocytocinergique et les comportements anormaux observés chez les patients SPW et dans les modèles murins (Bertoni et al., 2021). Il semble plausible que chez les patients SPW le fonctionement normale des neurones à OT soit altérée et/ou qu'il existe une régulation à la baisse des OTR dans différentes régions cérébrales impliquée dans le SPW.

4.4. Thérapie par injection intranasale d'ocytocine et Syndrome de Prader-Willi

Depuis les première étude d'administration intranasale d'OT par Kosfeld et ses collègues and Kirsch ses collègues (Kirsch et al., 2005; Kosfeld et al., 2005), diverses formes de traitement par l'administration d'OT ont été appliquées à de nombreux paradigmes expérimentaux et proposées comme approche thérapeutique dans diverses maladies psychiatriques chez les rongeurs, les singes et les humains (Leppanen et al., 2017). Chez l'Humain, ces traitements sont utilisés pour traiter l'anxiété, l'autisme, la schizophrénie, la dépression ou le syndrome de stress post-traumatique (Frijling et al., 2014; Kirsch et al., 2005). Bien que de nombreux articles initiaux sur le traitement intranasal d'OT aient fait état de résultats très prometteurs (Andari et al., 2010; Guastella et al., 2010; Hollander et al., 2007), il est important de noter que le scepticisme persiste concernant l'efficacité de l'administration intranasale d'OT, en partie parce que les mécanismes par lesquels l'OT atteint ses cibles intracérébrales ne sont pas encore

clairement démontrés. L'OT plasmatique ne traverse pas facilement la barrière hémato-encéphalique. Ce scepticisme est renforcé par plusieurs méta-analyses approfondies des publications, qui montrent des résultats mitigés des essais cliniques et conclut que l'efficacité du traitement à l'OT doit être considérée comme provisoire (Leppanen et al., 2017; Ooi et al., 2017).

Néanmoins au cours de la dernière décennie, il a été montré qu'en plus de ses effets pro-sociaux bien étudiés, le traitement par injection intranasale d'OT pourrait également agir comme un neuromodulateur dans diverses régions du cerveau et influencer un large éventail de comportements. Cela a ouvert la voie à des thérapies à l'OT pour une gamme plus étendue de pathologies complexes telles que le SPW.

Dans le contexte du SPW, plusieurs études utilisant le traitement intranasal à l'OT chez les patients atteint du SPW ont généré des résultats inconsistants, certaines ont reporté des effets contradictoires (Kuppens et al., 2016), prometteurs (Miller et al., 2017; Tauber et al., 2017, 2011), ou négatifs (Einfeld et al., 2014; Rice et al., 2018). Cependant, les études varient considérablement en fonction de la conception des protocoles cliniques, des doses d'OT administrées, des schémas d'administration, et surtout les l'âge des patients recevant le traitement.

4.4.1. Injection intranasale d'OT chez l'adolescent et l'adulte

Dans une étude menée par Einfeld et ses collègues (Einfeld et al., 2014), aucune différence significative n'a été constatée entre les traitements à l'OT et au placebo chez des patients âgés atteints du SPW de 12 à 30 ans, ce qui soulève des questions sur l'efficacité de l'OT intranasal dans la prise en charge des symptômes du SPW chez les adolescents et les adultes. Cette étude a porté sur deux groupes séquentiels d'adolescents et d'adultes, avec des doses variables en fonction de l'âge (groupe 1 : 13-15 ans, 18 UI/2 fois par jour ; 16+ ans, 24 UI/2 fois par jour). Le deuxième groupe a reçu des doses plus élevées (groupe 2 : 13-15 ans, 32 UI/2 fois par jour ; 16+ ans, 40 UI/2 fois par jour). Les résultats n'ont montré aucun bénéfice significatif sur les comportements sociaux ou l'hyperphagie. Le seul changement notable a été une augmentation des accès de colère avec la dose de 40 UI.

Sur une note plus positive, une étude de Tauber et ses collègues (Tauber et al., 2011), a révélé qu'une dose unique plus faible de 24 UI d'OT intranasal chez les patients SPW adultes (18 à 44 ans) pouvait renforcer la confiance dans les autres, réduire la tristesse et les comportements perturbateurs, les changements les plus significatifs étant observés deux jours après l'administration de la neurohormone.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent que dans le cas des patients adolescents et adultes atteints du SPW, des doses élevées d'OT peuvent provoquer des réactions indésirables. L'hypothèse la plus probable concernant les effets indésirables observés suite à l'injection intranasale des doses les plus élevées d'OT est attribué à des effets hors cible de la liaison de l'OT aux récepteurs de la vasopressine. En effet avec de fortes doses, l'OT manque de sélectivité et peut induire l'activation du récepteur 1A de la vasopressine, impliqué dans l'anxiété et la dépression (Keck, 2006), et ainsi exacerber les symptômes comportementaux du SPW et atténuer ou annuler toute efficacité positive dérivée de l'action de l'OT avec son récepteur. A l'opposé, des doses modérées pourraient potentiellement améliorer les interactions sociales et les réponses émotionnelles chez les patients.

4.4.2. Injection intranasale d'OT chez l'enfant

L'efficacité de l'administration intranasale d'OT a été évaluée chez des enfants atteints du SPW dans l'étude de Miller et ses collègues (Miller et al., 2017) en ciblant spécifiquement les enfants âgés de 5 à 11 ans. Les enfants ont reçu une faible dose de 16 IU/jour pendant 5 jours, et des améliorations ont été observées dans plusieurs paramètres comportementaux, notamment l'irritabilité, la léthargie, la stéréotypie et l'hyperactivité. Notablement, une amélioration significative des scores globaux de l'échelle de réactivité sociale (SRS) a été constatée le sixième jour après le traitement. Bien que ces améliorations aient été quelque peu maintenues jusqu'au sixième jour, l'efficacité de la médication semblait diminuée au jour 14. Cette étude a conclu que l'injection intranasale d'OT à faible dose était bien tolérée chez les enfants SPW et pouvait entraîner une réduction de l'appétit, de l'anxiété, des comportements répétitifs et des améliorations de la socialisation.

En revanche, l'étude menée en 2016 par Kuppens et ses collègues (Kuppens et al., 2016) sur des enfants plus âgée (6 à 14 ans) atteints du SPW, avec des doses allant de 24 à 48 IU par jour, ajustées selon la surface corporelle de chaque sujet n'a révélé aucun bénéfice significatif suite au traitement dans l'ensemble du groupe en ce qui concerne l'hyperphagie ou le comportement social. Cependant, des réductions significatives de la colère, de la tristesse, des conflits et des comportements liés à la nourriture, ainsi que des améliorations du comportement social, ont été observées chez 17 sujets de moins de 11 ans. Chez les enfants de plus de 11 ans, des effets indésirables significatifs ont été observés en réponse aux mesures du bonheur, de la colère et de la tristesse chez 8 des 11 enfants étudiés.

Cette dernière étude a été répétée en tant qu'essai clinique de phase III sur 130 enfants de 7 à 18 ans (moyenne 11 ans) (Roof et al., 2023), mais a été interrompue prématurément en raison de l'apparition de la pandémie de COVID-19. Cependant, les résultats de cette étude ont indiqué une diminution substantielle de l'hyperphagie et des symptômes obsessionnels compulsifs, bien qu'elles ne soient pas statistiquement significatives. En particulier, le groupe ayant reçu la dose la plus faible de 3,2 mg de l'analogue synthétique de l'OT, la Carbetocin, a montré des diminutions significatives de l'hyperphagie, des comportements d'anxiété et de détresse et une amélioration de l'impression clinique globale de changement (CGI-C) par rapport au groupe placebo. Ces améliorations ont été observées de manière constante au cours de la période de suivi prolongée, ce qui suggère des bénéfices durables. L'événement indésirable le plus fréquent enregistré au cours de la phase contrôlée par le placebo était une bouffée vasomotrice légère à modérée. Les auteurs de l'étude ont conclu que la dose de 3,2 mg de Carbetocin était associée à des améliorations cliniquement significatives des comportements liés à l'hyperphagie ainsi qu'à l'anxiété et à la détresse chez les participants atteints du SPW.

Ces résultats mettent en évidence les réponses nuancées au traitement intranasale à l'OT chez les enfants atteints du SPW, suggérant que l'âge en plus du dosage peut influencer de manière significative les résultats. L'accumulation des preuves expérimentales tendent à montrer que plus l'enfant est jeune plus l'injection intranasale aura des effets bénéfiques sur un panel de symptômes associés au SPW.

4.4.3. Injection intranasale d'OT chez le nourrisson

La question de l'administration d'OT à des stades encore plus précoces de la maladie s'est très rapidement posé afin de savoir si l'OT pouvait également se révéler capable de résoudre les problèmes liés au SPW dès le plus jeune âge.

Ce sont les modèles précliniques du SPW qui ont apporté les premiers éléments de réponse, en particulier dans le modèle de souris *Magel2*$^{tm1.1Mus}$. De manière frappante, une seule injection unique d'OT administrée juste après la naissance a permis de restaurer un comportement de succion normale chez les nouveau-nés *Magel2*$^{tm1.1Mus}$ et ainsi lutté contre la létalité postnatale dans ce modèle (Meziane et al., 2015; Schaller et al., 2010). De plus, cette administration d'OT à la naissance permet d'améliorer un certain nombre de problèmes neurodéveloppementaux et comportementaux chez les souris *Magel2* KO (Meziane et al., 2015). Par exemple, elle a amélioré la croissance des neurites, influencé l'expression des protéines des vésicules synaptiques et influencé les molécules d'adhésion cellulaire cruciales pour le développement du cerveau (Reichova et al., 2021).

En s'appuyant sur ces recherches fondamentales, l'équipe de Maithé Tauber et ses collaborateurs a exploré les effets de l'OT par voie intranasale chez des nourrissons diagnostiqués avec le SPW. Dans leur étude, ils ont recruté 18 nourrissons de moins de 6 mois et les ont répartis en trois groupes, chacun recevant différents schémas posologiques : 4 UI tous les deux jours, tous les jours ou deux fois par jour, sur une période de 7 jours. Les résultats ont été encourageants, avec une normalisation de la succion observée chez 88 % des nourrissons. En outre, des améliorations significatives ont été constatées dans les aptitudes sociales et les comportements alimentaires de ces nourrissons (Tauber et al., 2017).

Ces résultats soulignent le potentiel de l'OT non seulement pour atténuer certains des problèmes immédiats et potentiellement mortels posés par le SPW, tels que la mauvaise succion, mais aussi pour améliorer les comportements sociaux et alimentaires qui sont cruciaux pour le développement précoce.

Pour conclure, les recherches actuelles indiquent que l'âge du patient, le contexte et la dose jouent un rôle essentiel dans l'efficacité du traitement par injection d'OT intranasale. Les résultats les plus prometteurs de l'administration intranasale d'OT ont été observés dans les groupes les plus jeunes, en particulier chez les nourrissons, les jeunes enfants et les adolescents (Kuppens et al., 2016; Miller et al., 2017; Tauber et al., 2017). Ces résultats confirment l'idée qu'une intervention précoce au cours des phases de développement peut être cruciale pour obtenir de bons résultats. Pour étayer cette hypothèse, Althammer et Muscatelli ont émis l'hypothèse que le cerveau des nourrissons et des jeunes enfants est particulièrement réceptif au traitement par l'OT en raison d'une neuroplasticité accrue, en suggérant l'existence d'une période postnatale critique pendant laquelle les interventions thérapeutiques, telles que l'administration d'ocytocine, ont le plus de chance d'être efficaces. Ils suggèrent également que pendant cette période, le cerveau peut être en mesure de compenser les déficits ou les dysfonctionnements du système ocytocinergique, ce qui pourrait conduire à de meilleurs résultats à long terme chez les patients (Althammer et al., 2022a).

C'est sur cette dernière perceptive que s'articule le deuxième axe de ma thèse qui consiste à identifier s'il existe une période critique du développement durant laquelle l'OT est plus susceptible d'induire des effets neurodéveloppementaux. Un focus plus particulier est apporté sur les circuits hypothalamiques régulant la prise alimentaire (POMC et AgRP) en raison de la place centrale que prennent les troubles alimentaires dans le SPW.

5. Liens entre l'ocytocine et le système mélanocortinergique : hypothèse des effets neurodéveloppementaux de l'ocytocine

Compte tenu de l'ensemble des informations disponibles dans la littérature concernant les patients et les modèles précliniques du SPW, plusieurs observations importantes émergent sur l'interaction potentielle entre le système de contrôle de la prise alimentaire et l'OT dans le contexte du SPW :

Premièrement, chez l'Humain, le SPW est caractérisé par des problèmes de prise alimentaire importants, allant de problèmes de déglutition dans les premiers mois de vie à l'hyperphagie et l'obésité durant l'enfance et à l'âge adulte. Un phénotype similaire, bien qu'incomplet, se retrouve dans les modèles murins du SPW, notamment dans le modèle *Magel2* KO où des altérations dans l'innervation du PVH par les neurones anorexigènes exprimant la POMC ont été mises en évidence associées à un défaut de maturation de l'OT, suggérant un lien entre ces altérations neuroanatomiques et les troubles métaboliques associés (Maillard et al., 2016).

Deuxièmement, les données de la littérature tendent à montrer que l'OT pourrait avoir un rôle central dans la pathologie du SPW, tant elle est impliquée dans un large éventail de comportements associés aux symptômes du SPW. Les traitements à base d'injections intranasales d'OT ont montré une efficacité dans la diminution des symptômes associés au SPW surtout lorsqu'ils sont administrés à de jeunes enfants. De plus, une seule injection d'OT à la naissance chez les souris *Magel2* KO suffit à restaurer un comportement de succion normal, suggérant ainsi qu'il existe une période postnatale critique pendant laquelle les interventions thérapeutiques, telles que l'administration d'ocytocine, ont le plus de chances d'être efficaces.

Troisièmement, l'OT sous sa forme mature commence à être exprimée pendant la première semaine de vie postnatale (Brown and Grattan, 2007), une période qui coïncide avec le développement des projections des neurons exprimant la POMC et l'AgRP (Bouret et al., 2004b, 2004a), suggérant un rôle potentiel de l'OT dans le développement de l'hypothalamus à cette période.

Quatrièmement, il est plausible que l'OT joue un rôle dans la maturation puisqu'elle est impliquée dans la formation et le développement synaptique neuronale (Pekarek et al., 2022). Elle contribue à la maturation de l'activité synaptique glutamatergique et de la morphologie neuronale (Grinevich et al., 2014). De plus, pendant l'accouchement, sous l'influence de l'OT, le GABA passe d'un rôle excitateur à un rôle inhibiteur chez le fœtus, marquant un changement crucial dans la modulation neuronale (Tyzio et al., 2006).

À partir de ces observations, le deuxième objectif de ma thèse est d'explorer si l'OT joue un rôle neurotrophique sur l'établissement des projections neuronales issues des neurones à POMC et à AgRP. Il est également d'étudier s'il existe une période critique pour les effets neurodéveloppementaux de l'OT sur le développement des circuits mélanocortinergiques. De plus, j'ai testé l'hypothèse qu'une activation des neurones à OT pendant la période néonatale chez un modèle murin du SPW (les souris *Magel2* KO) pouvait corriger le développement anormal de leurs circuits mélanocortinergiques.

OBJECTIFS

Le SPW est une maladie multigénique complexe qui se caractérise par un éventail de traits phénotypiques allant d'une hypotonie sévère et de difficultés d'alimentation avec des défauts de déglutition à la naissance, suivis d'un déficit de croissance, d'un hypogonadisme, d'une prise de poids excessive avec une hyperphagie sévère et de problèmes neurocomportementaux pendant l'enfance et l'âge adulte (Prader, 1956). Malgré des essais cliniques approfondis, il n'existe pas de traitement efficace pour le SPW, et les mécanismes physiopathologiques sous-jacents du syndrome restent incomplètement compris. Les modèles animaux du SPW sont essentiels pour comprendre les mécanismes et identifier de nouvelles voies impliquées dans la physiopathologie du SPW. Malheureusement les modèles de souris avec inactivation de tous les gènes du SPW présentent un taux de létalité de 100 % au cours de la première semaine après la naissance et n'ont donc pas été très utiles pour comprendre les symptômes postnataux (Cattanach et al., 1992; Gabriel et al., 1999). Des modèles de souris KO pour un seul gène candidat ont également été générés (Kummerfeld et al., 2021). Parmi les gènes inactivés dans le SPW, *MAGEL2* et *NECDIN* sont particulièrement intéressants car ces deux gènes sont co-exprimés et co-régulés dans les mêmes cellules de l'hypothalamus, une région du cerveau responsable de nombreux symptômes observés dans le SPW. Les modèles de souris *Necdin* ou *Magel2* KO présentent des phénotypes distincts qui reproduisent une partie des caractéristiques cliniques du SPW mais présentent des limites car il est probable que le phénotype du SPW soit le résultat de la perte de plusieurs gènes qui interagissent les uns avec les autres.

En conséquence, **le premier objectif de ma thèse a été de caractériser un nouveau modèle de souris avec la suppression combinée de *Magel2* et *Necdin***. Ce modèle vise à **explorer les conséquences physiologiques, comportementales et neurodéveloppementales induites par cette perte combinée**, dans l'espoir qu'il reflète mieux l'interaction complexe des gènes impliqués dans le SPW et soit ainsi plus pertinent pour étudier ce syndrome et développer de potentielles interventions thérapeutiques (Figure 13).

Les caractéristiques phénotypiques du SPW ainsi que les altérations hormonales et neuronales retrouvées dans les modèles animaux associés ont rapidement orienté l'attention de la communauté scientifique vers une région spécifiques du cerveau : l'hypothalamus. L'implication de l'hypothalamus dans le SPW est particulièrement pertinente en raison de son rôle dans le contrôle des grandes fonctions physiologiques. Parmi les peptides produit par l'hypothalamus, l'OT joue un rôle central dans la régulation du comportement alimentaire, la croissance, la régulation gonadique, les interactions sociales et de la réactivité émotionnelle, autant de questions qui affectent considérablement la qualité de vie des personnes atteintes du SPW. De façon intéressante des dérégulations du système à OT sont observées chez les patients atteints du SPW et dans les modèles murins. Par conséquent, les traitements avec la neurohormone OT est actuellement une piste prometteuse dans la recherche sur le SPW, notamment avec des données de la littérature montrant un effet bénéfique du traitement à l'OT sur la régulation de l'appétit, en particulier lorsque ce traitement est administré tôt au cours de la vie postnatale. Chez la souris, une administration sous-cutanée unique d'OT juste après la naissance rétablit une succion normale chez petit *Magel2* KO. L'OT commence à être présente sous sa forme mature à partir de la première semaine de vie postnatale, une période qui coïncide avec le développement des projections du système mélanocortinergique (Bouret et al., 2004a), suggérant un rôle potentiel de l'OT dans le développement de des circuits issus des neurones à POMC et AgRP pendant cette période de la vie.

Ainsi, **le second objectif de ma thèse est d'étudier le rôle de l'OT sur le développement du système mélanocortinergique de l'hypothalamus et s'il existe une période d'action critique pour ces effets neurotrophiques de l'OT. Mon objectif est également d'explorer les mécanismes d'action à l'origine de ces effets** et en particulier de tester les hypothèses suivantes : 1) les neurones à OT exercent-ils leurs effets neurotrophiques sur le système mélanocortinergique directement via la libération par exocytose de l'OT et sa liaison sur son récepteur ou 2) ces effets peuvent-ils véhiculés via d'autres facteurs sécrétés par les neurones à OT et notamment le monoxyde d'azote (NO) (Figure 13).

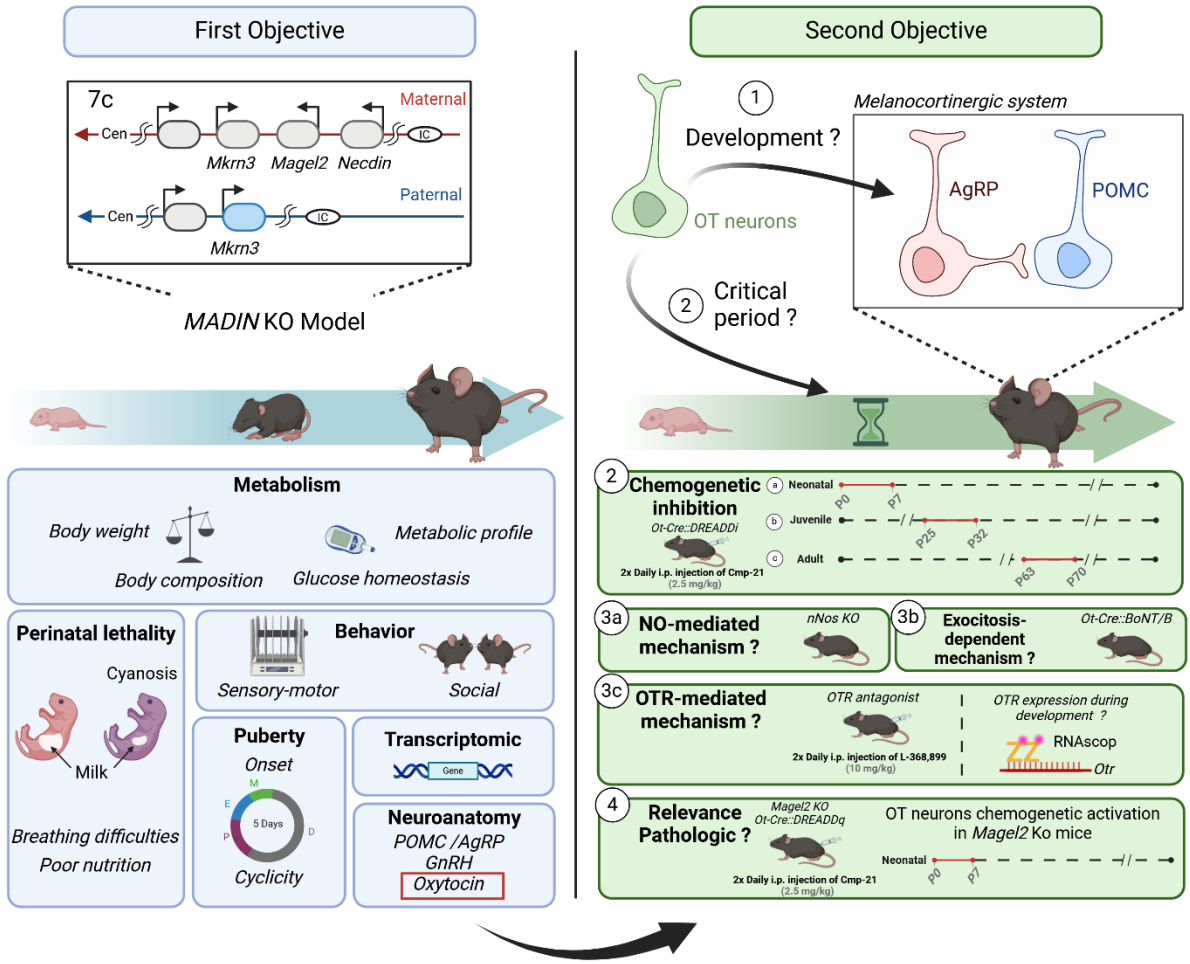


Figure 13 : Objectifs de la thèse. **1er objectif** : caractériser phénotypiquement un nouveau modèle de souris avec la suppression combinée de *Magel2* et *Necdin* (*Madin* KO) au cours du developpement et explorer les conséquences physiologiques, comportementales et neurodéveloppementales induites par cette perte combinée. **2nd objectif** : **1** étudier le rôle des neurones à OT dans le développement du système mélanocortinergique de l'hypothalamus, **2** determiner s'il existe une période d'action critique pour l'action de neurones à OT en chémoihnibant l'activité des neurones à OT (ot-cre ::DREADDi) durant 3 période critique du developpement, néonatal (P0-P7), juvénil (P25-P32) et adulte (P63-P70). **3** explorer les mécanismes d'action à l'origine de ces effets. **3a** determiner si le mécanisme est dépendant de la signalisation NO (*nNOS* KO). **3b** determiner si le mécanisme est dépendant de l'exocytose (*ot*-cre ::BoNT/B), **3c** determiner si le mécanisme est dépendant de la signalisation OTR par l'injections d'antagoniste au OTR (L-368 889). **4** Explorer dnas un modèle du SPW (Magel2 KO, *ot*-cre ::DREADDq), la pertinance de l'activation chémogénétique des neurones à OT dans la restauration des projection mélanocortinergique.

RESULTATS

1. Caractérisation phénotypique d'un nouveau modèle de souris du syndrome de Prader-Willi avec invalidation génétique de *Magel2* et de *Necdin*

Préambule

Dans cette partie, je développe les résultats concernant mon premier objectif : générer un nouveau modèle de souris pour le SPW avec la suppression combinée de *Magel2* et de *Necdin*.

Comme nous l'avons vu précédemment, aucun modèle murin actuel ne reproduit parfaitement tous les symptômes du SPW. Les modèles animaux avec l'inactivation de tous les gènes du SPW affichent une létalité de 100 % durant la première semaine postnatale, tandis que les modèles KO individuel de chaque gène reproduit seulement une partie des symptômes. Dans cette partie nous postulons que cette représentation insuffisante est due au caractère multigénique du SPW, chaque gène du locus SPW contribuant à différents degrés aux symptômes de la maladie. En particulier, nous pensons qu'une compensation fonctionnelle entre les gènes *Magel2* et *Necdin* pourrait survenir dans les modèles de KO simple. Nous proposons donc un nouveau modèle de perte de fonction combinant ces deux gènes, visant à générer un modèle murin double KO qui serait plus représentatif du SPW.

Par ailleurs, la plupart des modèles existants pour le SPW n'ont pas bénéficié d'une caractérisation phénotypique complète et unique. Les données disponibles proviennent de diverses études utilisant différentes méthodologies et différents environnements de laboratoires, ce qui complexifient les comparaisons entre modèles. Ce travail vise également à offrir une base phénotypique complète pour ce modèle, dans l'espoir de standardiser son utilisation future.

Lors de cette première étude, nous avons caractérisé le comportement respiratoire, sensorimoteur, social, reproductif et métabolique de ce nouveau modèle de la naissance à l'âge adulte. Nous avons également examiné les altérations neuroanatomiques dans l'hypothalamus, notamment dans les circuits mélanocortinergiques (POMC et AgRP) et la reproduction (GnRH). Une étude transcriptomique d'hypothalamus a été réalisée pour analyser les variations d'expression génique induites par ce double KO, avec un focus particulier sur les gènes de l'horloge biologique, compte tenu des dysfonctionnements circadiens observés dans le SPW et dans le modèle *Magel2* KO.

Ce travail est le résultat de deux collaborations. La première avec l'équipe du Docteur Françoise Muscatelli et de Fabienne Schaller qui ont générées le modèle et réalisé les études respiratoires et comportementales. La seconde avec les équipes du docteur Anne-Marie Francois Bellan qui ont réalisées les études de transcriptomique. Alicia Sicardi et moi-même ont réalisé les études métaboliques et neuroanatomiques. Ce travail fait l'objet d'une publication dans laquelle je partage la place de co-premier auteur avec Alicia Sicardi et Fabienne Schaller.

Le modèle que nous avons développé, baptisé *Madin* KO, offre pour la première fois un aperçu plus fidèle de la complexité génétique du SPW et présente une caractérisation phénotypique exhaustive, en espérant que ce modèle puisse être adopté largement et enrichir la recherche sur le SPW.

Investigation of a Novel Mouse Model of Prader-Willi Syndrome

Invalidation of *Necdin* and *Magel2*

Pierre-Yves Barelle[1,2], Alicia Sicardi[1,2], Fabienne Schaller[3], Julie Buron[3], Denis Becquet[4], Felix Omnes[3], Françoise Watrin[3], Catarina Santos[5], Clément Menuet[3], Anne-Marie François-Bellan [4], Emilie Caron[1,2], Jessica Klucznik[1,2], Vincent Prevot[1,2],

Sebastien G Bouret[1,2*], Françoise Muscatelli[3*]

[1] *Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Lille Neuroscience and Cognition, UMR-S 1172, Lille F-59000, France*

[2] *FHU 1000 Days for Health, School of Medicine, Lille F-59000, France*

[3] *Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED), INSERM, Aix Marseille Université, Marseille, France*

[4] *University of Aix-Marseille, Inst Neurophysiopathol, Marseille, France*

[5] *Phenotype Expertise, Marseille, France*

Authorship note: P.-Y.B, A.S., and F.S. contributed equally to this work

[*]**Co-corresponding and co-lead authors, contact information:** Sebastien G. Bouret (sebastien.bouret@inserm.fr) and Françoise Muscatelli (francoise.muscatelli@inserm.fr)

Abstract

Prader-Willi syndrome (PWS) is a multigenic disorder caused by the loss of seven contiguous paternally expressed genes. Mouse models with inactivation of all PWS genes are lethal. Knockout (KO) mouse models for each candidate gene were generated, but they lack the functional interactions between PWS genes. Here, we revealed an interplay between *Necdin* and *Magel2* "PWS" genes and generated a novel mouse model (named "*Madin*") with a deletion including both genes. A subset of *Madin* KO mice showed neonatal lethality. Behaviorally, mutant mice exhibited sensory delays during infancy and alterations in social exploration at adulthood. *Madin* KO mice had a lower body weight before weaning, persisting after weaning in males only, with reduced fat mass and improved glucose tolerance. A delayed puberty onset was observed in mutant mice. Adult *Madin* KO mice displayed increased ventilation and increased sleep apneas in hypercapnia. Transcriptomics analyses revealed a dysregulation of key circadian genes and alterations of genes associated with axonal function that were also found in the hypothalamus of patients with PWS. At neuroanatomical levels, we report an impaired maturation of oxytocin neurons and a disrupted development of melanocortin circuits. Together, these data indicate that the *Madin* KO mouse is a reliable and more genetically relevant model for the study of PWS.

Introduction

Prader-Willi syndrome (PWS) arises from the loss of expression of seven contiguous paternally inherited genes located in the 15q11-q13 region. It is a complex neurodevelopmental disorder characterized by a lifelong spectrum of phenotypic features starting with severe feeding difficulties and respiratory distress at birth, early sensory deficits and hypotonia, followed by growth deficiency, hypogonadism and delayed puberty, short stature, excessive weight gain with severe hyperphagia, and cognitive and behavioral problems throughout life (Butler et al., 2019; Höybye and Tauber, 2022). Despite extensive clinical trials, there are no effective treatments for PWS, and comprehensive pathophysiological mechanisms have not yet been clearly identified, although converging evidence suggest that the PWS phenotype might result from hypothalamic dysfunctions (Höybye and Tauber, 2022; Swaab, 1997). Importantly, point mutations in human *MAGEL2* gene only, are responsible for the Schaaf-Yang syndrome that presents strong similarities with the PWS phenotype with a more severe autistic phenotype in adolescence and adults (Fountain and Schaaf, 2016; Schaaf et al., 2013). Altogether, these results suggest that loss of function of *MAGEL2* shares common overlapping symptoms with PWS.

Animal models for PWS are instrumental in understanding mechanisms and identifying novel pathways involved in the pathophysiology of PWS. The mouse chromosome 7C presents a conserved synteny to human PWS region. However, mouse models with inactivation of all PWS genes display a 100% lethality rate within the first week after birth and have, therefore, not been very useful for understanding postnatal symptoms (Gabriel et al., 1999; Stefan et al., 2005). Mouse knockout (KO) models for single candidate genes have also been generated (Kummerfeld et al., 2021). However, these single KO models present limitations as it is likely that the PWS phenotype is the result of the lack of expression of several genes that are co-

expressed in the same brain regions (Watrin et al., 2005) and that may interact with each other, creating a more complex and integrative phenotype.

Among the genes inactivated in PWS, *NECDIN* and *MAGEL2* are of particular interest. *Necdin* and *Magel2* single KO mouse models display several distinct phenotypes mimicking part of the PWS clinical features, although there is a variability among the different models depending on the genomic construction. *Magel2* KO mice exhibit suckling deficits at birth (Schaller et al., 2010), growth retardation (Schaller et al., 2010), altered metabolism (Bischof et al., 2007; Tennese and Wevrick, 2011) disturbance of circadian activity (Kozlov et al., 2007), deficits in cognitive, social, and parental behaviors (Bertoni et al., 2021; Fountain et al., 2017; Higgs et al., 2022; Meziane et al., 2015). Our teams and others also reported impaired hypothalamic regulation in *Magel2* KO mice with abnormal oxytocin (OT) maturation (Ates et al., 2019; Bertoni et al., 2021; Maillard et al., 2016; Schaller et al., 2010), and disrupted development and function of pro-piomelanocortin (POMC) neurons (Maillard et al., 2016; Oncul et al., 2018). *Necdin* KO mice display a variable lethality after birth (Gérard et al., 1999; Muscatelli et al., 2000) due to respiratory distress (Zanella et al., 2008), growth retardation, motor deficit in infancy (Aebischer et al., 2011), sensory deficits (Andrieu et al., 2006), high scraping, cognitive alterations (Muscatelli et al., 2000) and alterations of social and circadian behaviors (Lu et al., 2020; Zhang et al., 2023). At the neuroanatomical level, *Necdin* KO mice display a reduction in the number of OT and gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons hypothalamic neurons, alterations in perinatal serotonergic metabolism and development, (Matarazzo et al., 2013; Muscatelli et al., 2000), and an alteration of clock gene expression (Lu et al., 2020).

MAGEL2 and *NECDIN* belong to the MAGE (Melanoma Antigen Gene Expression) gene family (Barker and Salehi, 2002). They are physically close in the genome (30kb), intron-less, and have probably evolved through sequential retrotransposition events (Watrin et al., 2005).

In addition, they are co-expressed in many brain structures, with a high co-expression in the hypothalamus throughout fetal and postnatal development (Lee et al., 2003; Vaidyanathan et al., 2020; Watrin et al., 2005). At the molecular level, both proteins act through an ubiquitin-dependent mechanism to turn over and recycle proteins (Wijesuriya et al., 2017). Overall, their molecular function and expression pattern suggest that their roles in cellular processes may partially overlap (Wijesuriya et al., 2017). Therefore, a model with combined loss of *Magel2* and *Necdin versus* single invalidation of each gene should reveal the complex interaction of these two genes and avoid the potential functional redundancy or compensatory mechanism between these two genes. This model would therefore be more relevant to study the complexity of PWS.

In the present study, we investigated the interplay between *Necdin* and *Magel2* genes, generated a novel mouse model with a deletion including both *Magel2* and *Necdin* genes, and provided a comprehensive characterization of the behavioral, physiological, neurodevelopmental, and transcriptomic alterations of this model.

Results

Co-expression and co-regulation of *Magel2* and *Necdin* genes and generation of a mouse model with a deletion including both genes

We previously found that *Necdin* and *Magel2* mRNAs were highly expressed in the developing brain (Watrin et al., 2005). Here, we show a striking overlapping expression pattern of both genes in the brain from embryonic stages to adulthood (Figure 1A-B). Our previous studies (Watrin et al., 2005) and genomic analysis (https://genome.ucsc.edu) revealed that both genes share a common enhancer (Figure 1C). We have previously generated two mouse models in which the promoter and 5' of the coding region of *Necdin* (*Ndn*$^{tm1\text{-}Mus}$, (Muscatelli et al., 2000) or *Magel2* (*Magel2*$^{tm1\text{-}Mus}$, (Schaller et al., 2010), respectively, were deleted preventing the expression of *Necdin* and *Magel2* transcripts. Here, using RT-qPCR, we find that *Necdin* mRNA is over-expressed in *Magel2* KO brains, and *Magel2* mRNA is over-expressed in *Necdin* KO brains (Figure 1D). We also show by *in situ hybridization* that *Magel2* transcript is overexpressed in *Necdin* KO brain (Figure 1E) and Necdin immunoreactivity is increased in the brains of *Magel2* KO mice (Figure 1F). Together, these data show that *Magel2* and *Necdin* are spatio-temporally co-regulated, share a putative enhancer, with functions that partially overlap.

Based on the findings described above, it appears that the combined loss of *Magel2* and *Necdin*, by reflecting more accurately the genetics of PWS, will be a more appropriate model to study PWS-like phenotype. We, therefore, generated *a* large deletion including both *Necdin and Magel2 genes* (hereafter called "*Madin*" KO mice) using both *Ndn*$^{tm1\text{-}Mus}$ and *Magel2* $^{tm1\text{-}Mus}$ single KO mice and an *in vivo* chromosomal rearrangement based on the Cre-loxP system (Figure 2A). This strategy allowed a somatic or meiotic trans-allelic recombination between loxP sites in a transgenic mouse expressing the *Pgk*-Cre recombinase (Zheng et al., 2000). We used it to create a recombination between both loxP sites located in the same direction but

associated to the mutated *Necdin* allele or the mutated *Magel2* KO allele, both alleles being on a different chromosome 7 a. We created a novel allele with a deletion that includes *Necdin*, the 30 kb-fragment between *Necdin* and *Magel2*, and the deletion of *Magel2* promoter and half of the coding part (Figure 2A)**.** Notably, the 32 kb deleted fragment contains no gene, miRNA, or identified regulatory elements excepted the enhancers and promoters associated with the *Necdin* and *Magel2* genes. We screened and validated the recombined *Madin* allele by PCR using *Necdin* and *Magel2* primers, and we sequenced the recombined allele confirming a recombination at the loxP sites and the expected deletion (Figure 2B-C). We measured *Magel2* and *Necdin* mRNA levels in the *Madin* KO heterozygous mice (+m/-p) using RT-qPCR and found that they were markedly reduced, confirming the loss of paternal expression (data not shown). We also confirmed the loss of Necdin protein expression in *Madin* KO brains using immunohistochemistry (Figure 2D). The reduction of Magel2 protein expression could not be checked due the lack of specific MAGEL2 antibodies.

We generated several cohorts of *Madin* heterozygous and wild-type mice. Although the expected Mendelian ratio of our cross was 1:1, we consistently observed a reduced number of *Madin* KO mice compared to wild-type animals (Figure 2E). In 5 out of 6 cohorts generated (representing 92 litters), we found a reduction of 40% (ranging from 20% to 60%) of *Madin* KO mice compared to wild-type animals (Figure 2F). The lethality occurred during the first day of life. Monitoring neonates shortly after birth revealed cyanosis in *Madin* KO mice (Figure 2G), suggesting a lack of proper oxygenation due to respiratory dysfunction as observed in *Ndn*$^{tm1\text{-}Mus}$ KO mice (Matarazzo et al., 2013; Rieusset et al., 2013). *Madin* KO neonates also lacked milk in their stomachs (Figure 2G) as observed in *Magel2* $^{tm1\text{-}Mus}$ KO mice (Schaller et al., 2010). Together, these data indicate that the possible causes of death in *Madin* KO newborns include respiratory defects and/or feeding deficits at birth.

Madin KO mice develop sensory alterations in infancy and social exploration deficits during adulthood

PWS is a neurodevelopmental syndrome and patients with PWS present symptoms at birth evolving with age. Moreover, *Necdin* and *Magel2* are highly expressed in the developing brain. Based on these observations, we characterized the phenotype of M*adin* KO mice from birth.

We first used 11 reliable tests established by Roubertoux et al. (Roubertoux et al., 2018) to assess the sensory and motor abilities during the first two weeks of postnatal life (Supplemental Figure 1A). Each test was performed at specific postnatal ages defined by the critical period during which the response is established in 100% of control mice in the mouse strain that we used (*i.e.*, C57Bl6/J) (Supplemental Figure 1B). We compared *Madin* KO to wild-types pup from the same litters. Since we did not observe differences between males and females, we pooled both sexes.

We found differences between mutant and wild-type mice in 5 out of the 11 tests. *Madin* KO pups were less efficient in righting response, rooting response, and paw position on the floor (Figure 3A-C). The righting response reveals motor and sensory (proprioception) abilities and it was delayed in *Madin* KO pups at P4 and P8 (Figure 3A). The rooting reflex involves cranial sensory nerves (Vth); the disappearance of this reflex was longer in *Madin* KO pups at P7 compared to wild-type mice (Figure 3B). The paw position test is mainly a sensory test (proprioception, touch) and revealed a delay in sensory development in *Madin* KO pups (Figure 3C). In contrast, mutant mice performed better in the bar holding test at P11 (Figure 3D). This is a motor test, requiring muscle strength. Interestingly, *Madin* KO pups also performed better in the pulling up on bar test at P12 (Figure 3E), *i.e.*, they are more efficient to bring back the bar to them and use their hind legs. However, they are less efficient to stand up on the bar at P15, requiring more sensory abilities (Figure 3E). However, mutant and wild-type pups performed similarly in the vertical climbing test, and the two other tests involving vestibular

and motor activity (*i.e.*, Climbing the slope and Cliff avoidance) (Supplemental Figure 2C-E). Similarly, the age of eye opening and auditory canal opening, which normally occurs during a specific time window between P13 and P14, was similar between *Madin* KO and wild-type mice (Supplemental Figure 2 A,B). Altogether, these results indicate that *Madin* KO pups presented a delay in sensory (tactile and proprioception) maturation but not in motor abilities as they even displayed an increased muscular strength.

We performed a series of behavioral tests in adult mice that were previously done in the *Magel2* KO mouse model. No difference was observed between *Madin* KO and wild-type mice in the Rotarod test that measures motor function and coordination (Supplemental Figure 3A) and in the open field (OF) test, assessing the spontaneous locomotor activity in a novel environment (grooming, rearing, traveled distance) and giving information about anxiety-related behavior (the time spent in the center zone *versus* border of the arena) (Supplemental Figure 3B). Anxiety behavior was not affected in the mutant mice using the elevated plus maze test and measuring the number of entries and time spent in open-arms (Supplemental Figure 3D). In addition, we also did not observe differences in the spontaneous social interactions between two mice moving freely in the arena of the OF by measuring the frequency, latency to the first interaction, and the duration of interaction (Supplemental Figure 3C). In the object recognition test, *Madin* KO mice spent more time exploring the novel object (sniffing time) than the familiar object, as wild-type mice do. However, mutant mice did not travel shorter distances to reach the novel object, as expected and observed in wild-type animals (Supplemental Figure 3E). These results suggest that when close to the novel object, *Madin* KO mice show a greater interest in the novelty than in the familiar object, but when far from the novel object, they do not preferentially move towards the novel object, suggesting a recognition deficit or interest alteration.

Sociability was evaluated, in male mice only, by testing the preference for a congener placed in a wire cage as compared to an empty wire cage (three chamber test, social recognition task). Wild-type and *Madin* KO mice spent more time to interact with a congener compared with the empty grid (Figure 3F, sniffing duration), but the index of sociability was significantly lower in *Madin* KO mice and is even similar to the index of habituation (Figure 3F, Index) suggesting an alteration of social recognition (and sociability) in *Madin* KO compared with wild-type mice.

Effect of the combined deletion of *Magel2* and *Necdin* on body weight, body composition, energy and glucose homeostasis

To evaluate the physiological consequences of the loss of *Magel2* and *Necdin*, we first measured the body weight of *Madin* KO and wild-type mice throughout postnatal life. Mutant mice displayed a lower body weight, starting at P1 and continuing until P15 (Figure 4A). Notably, the difference in body weight at weaning in female *Madin* KO mice appeared to be associated with a smaller body length (Figure 4J). The differences in body weight and size were specific to the pre-weaning period in female mice, as *Madin* KO females had normal body weight curves and body size after weaning although they were leaner (Figures 4K and 4L-N). In contrast, male *Madin* KO mice displayed lower body weights but a normal body size from weaning (P21) to six months of age (P168) (Figure 4B-C and 4D). The differences in body weight in *Madin* KO males were associated with changes in body composition, as revealed by a lower fat mass and a higher lean mass compared to wild-type mice (Figure 4E-G). However, we did not find differences in fat mass in female mutant mice (Figure 4M). Also, the mean and maximal brown adipose tissue temperature was normal in male and female *Madin* KO mice (Figure 4H-I and 4P-Q).

It is known that body composition could be a factor influencing glucose regulation. We, therefore, measure several indices of glucose homeostasis in *Madin* KO and wild-type mice. Both male and female *Madin* KO mice exhibited lower fasting glycemia levels than their respective littermates (Figure 5A and 5G). Additionally, male, but not female, *Madin* KO mice displayed an improved glucose tolerance after a glucose challenge (Figure 5B-C and 5 H-I). The increased glucose tolerance appeared independent of improved insulin secretion, as *Madin* KO mice had normal insulin levels during the glucose tolerance test (Figure 5D-E and 5J-K).

We also conducted a comprehensive assessment of energy balance regulation of our new mouse model. No alterations in food intake, energy expenditure, respiratory exchange ratio (RER), or xy locomotor activity were found in either male or female *Madin* KO mice compared to their wild-type littermates (Supplemental Figure 4A-H). Similarly, metabolic responses to fasting and refeeding appeared normal in mutant mice (Supplemental Figure 5). Nevertheless, the combined loss of *Magel2* and *Necdin* impacted z-rearing behavior, with a greater frequency of z-rearing during the light phase in male, but not female, *Madin* KO mice (Supplemental Figure 4I-J).

Mice lacking both *Magel2* and *Necdin* displayed delayed puberty

Hypogonadism and delayed puberty are often reported in patients with PWS (Butler et al., 2019). Therefore, we also characterized the onset of puberty in *Madin* KO mice by monitoring the age of balano-preputial separation in males and the age of vaginal opening and first estrous in females. Balano-preputial separation occurred at 29.5 ± 0.3 days in wild-type males, but it was observed at 33.9 ± 0.8 days in *Madin* KO males (Figure 6A). Notably, the weight at balano-preputial separation was comparable between wild-type and MADIN KO mice (Figure 6B). In females, the age of vaginal opening in wild-type animals was observed at 32.6 ± 0.3 days, but it was delayed at 34.3 ± 0.3 days in *Madin* KO mice (Figure 6C). However, the weight at vaginal opening, date, and weight of first estrous was normal in *Madin* KO mice (Figure 6D-F).

Accordingly, there was a significant reduction in the delay between the vaginal opening and the first ovulation, indicative of puberty timing in female *Madin* KO mice (Figure 6G). During adult life, *Madin* KO mice display regular estrous cycles (Figure 6H). Because GnRH neurons are a critical regulators of reproductive function (Herbison, 2016), we also investigated the distribution of GnRH neurons in the brain of *Madin* KO mice and their wild-type littermates using the iDISCO 3D approach (Vanacker et al., 2020). The overall distribution and total number of GnRH neurons was comparable between wild-type and mutant mice (Figure 6I). However, we found fewer GnRH neurons in the olfactory bulb of *Madin* KO mice (Figure 6I).

Neuroanatomical alterations in the hypothalamus of *Madin* KO mice

Previous histopathological studies in the hypothalamus of patients with PWS reported a significant reduction in the number of OT neurons using antibodies against the mature form of oxytocin (Bochukova et al., 2018; Swaab et al., 1995) at adulthood. However, these studies utilized antibodies against the mature form of oxytocin, questioning whether the reduced number of OT-immunopositive neurons is truly due to a loss of OT neurons or caused by perturbations in peptide maturation. Therefore, we used two antibodies targeted against the pro-hormone (PS38 antibody) or the intermediate forms of the neurohormone (VA10 antibody). We then analyzed the ratio of neurons expressing the intermediate form of OT with those expressing the prohormone and observed an accumulation of the intermediate form of the neuropeptide in *Magel2* KO, *Necdin* KO, and *Madin* KO mice (Figure 7A).

The melanocortin system is a critical component of hypothalamic pathways regulating metabolism. We previously reported a disruption of melanocortin circuits in *Magel2* KO mice (the *Magel2*^{tm1Stw} line) with a reduced density of POMC-immunoreactive fibers in the paraventricular nucleus of *Magel2* KO male mice compared to wild-type mice (Maillard et al., 2016). In contrast, the density of AgRP-orexigenic fibers was normal in *Magel2* KO mice. Consistent with these findings, we found a 1.5-fold and a 1.7-fold reduction in the density of

POMC-immunoreactive fibers in the PVH and DMH, respectively, in male but not female *Madin* KO mice compared to wild-type littermates (Figure 7B). The density of AgRP-immunoreactive fibers was normal in the PVH and DMH of male and female mutants (Figure 7C).

Respiratory alterations in *Madin* KO mice

Respiratory distress was reported in *Necdin* KO neonates and adults (Matarazzo et al., 2013; Zanella et al., 2008). The breathing activity of *Madin* KO mice and WT littermates was assessed at P30 using *in vivo* whole-body plethysmography (Zanella et al., 2008). During quiet breathing in normocapnia, *Madin* KO mice displayed an increased respiratory minute volume compared to wild-type mice, mainly due to a tendency for an increased tidal volume, while respiratory frequency was similar in both groups (Figure 8A). There was no difference in the number of apneas and in the irregularity of breathing between wild-type and *Madin* KO mice. A 10 min hypercapnic challenge (4% CO_2) increased ventilatory parameters to similar levels in both *Madin* KO and WT mice (Figure 8B). There was a tendency for a smaller delta increase in minute ventilation and tidal volume in *Madin* KO mice compared to wild-type mice. During the first 20 min of return to normocapnia following the hypercapnic challenge, the *Madin* KO mice had increased minute ventilation and increased tidal volume compared to wild-type mice, similarly to during basal breathing before the hypercapnic challenge (Figure 8C). Also, during this period, *Madin* KO mice showed more apneas (Figure 8C). This was due to a persistence of the post-hypercapnic increase in apneas throughout the first 20 min of return to normocapnia in mutant mice whereas wild-type mice showed a reduction in their number of apneas starting ~5 min after the return to normocapnia (Figure 8D). These results indicate an increased ventilation of *Madin* KO mice in basal normocapnic condition, and a persistent increase in apneas following a hypercapnic challenge.

Characterization of genes differentially expressed between day (ZT6) and night (ZT18) in *Madin* KO versus Wild Type mice

Transcriptional studies have proven helpful in understanding disease mechanisms. Therefore, we performed bulk RNA sequencing on the hypothalamus of adult *Madin* KO mice and their wild-type littermates. Since *Magel2* and *Necdin* have a circadian expression, with a significant ~1.5-fold increase in expression level during the night versus day (Figure 9A), and it has been shown a dysregulation of the circadian activity and circadian genes (Lu et al., 2020; Mercer et al., 2009) in single *Necdin* and *Magel2* KO, we investigated genes that were differentially expressed between the middle of day (ZT6) and the middle of the night (ZT18) in the hypothalamus of *Madin* KO versus wild-type littermates. In the hypothalamus of WT mice, we found 683 genes that were differentially expressed between the ZT6 and ZT18 (Figure 9B). It may be assumed that these genes display a rhythmic pattern over the nychthemeral cycle. Remarkably, 681 out of these 683 genes lose their differential expression between day and night in the *Madin* KO mice (Figure 9B-C). Because measurements were taken at only two-time points within the nychthemeral cycle, it was not possible to determine whether these genes became arrhythmic or if their phase had been shifted. Nevertheless, a Panther analysis revealed that in this list of 681 genes that displayed a differential day/night expression only in wild-type, the terms ‘‘nervous system development”, “cell differentiation”, and “cell-cell adhesion” were among the most significant enriched annotations in Gene Ontology biological processes (Figure 9D). We also identified 78 genes in the hypothalamus of *Madin* KO mice that acquired a day-night difference that was not found in wild-type mice (Figure 9A-B). As previously highlighted, it cannot be determined whether these genes became rhythmic when they were not in the wild-type, or if a phase shift enables the detection of a day/night difference that was undetectable with two measurement times in the wild-type. Overall, it appeared that 99% of genes with a differential day/night expression either in wild-type or in *Madin* KO mice were dependent on

Magel2/Necdin expression and that these genes could be classified in different categories depending on whether after *Magel2*/*Necdin* deletion they lost their differential expression, they displayed a modified rhythmic pattern one or they acquired a differential day/night expression (Figure 9 B-C).

We further analyzed the impact of the combined deletion of *Magel2* and *Necdin* on gene expression during day (ZT6) and during night (ZT18). During day, 261 genes had a different expression level in *Madin* KO compared to wild-type mice, 68 (26%) being down-regulated and 193 (74%) up-regulated (Figure 10A). As shown after Panther analysis, these 261 genes impacted by Magel2/Necdin deletion during day were shown to be significantly associated with different functions such as "development", "differentiation", and "myelination" (Figure 10B, left part). During night, more genes (1295 genes) had their expression level regulated in *Madin* KO mice, but while 874 (68%) of these genes displayed a down-regulation, 421 genes (32%) were up-regulated (Figure 10A). These 1295 regulated genes were mostly associated with synaptic transmission, cell-cell adhesion and social behavior (Figure 10B). Among all regulated genes either during day or during night (1556 genes), 258 were found to display a day/night differential expression in wild-type meaning that around 17% of genes whose expression was altered in *Madin* KO mice could be circadian rhythmic genes (data not shown).

We also explored whether there were genes that were commonly dysregulated in *Madin* KO mice and patients with PWS by comparing our transcriptomic data with a RNA sequencing analysis previously performed in the hypothalamus of patients with PWS (Bochukova et al., 2018). We found that there were 261 genes that were commonly dysregulated in both *Madin* KO mice and PWS patients (Figure 9F and Supplementary Table 1). 1315 genes were dysregulated only in *Madin* KO mice, and 2761 were dysregulated only in patients with PWS (Figure 9F). A Panther analysis revealed that in this list of 261 genes that were commonly dysregulated in mice and humans, the terms ''presynaptic active zone membrane",

“glutamatergic synapse”, “post synapse”, and “axon” were among the most significant enriched annotations in Gene Ontology biological processes (Figure 9G).

Discussion

The present study describes the phenotypic characterization of a novel mouse model with a deletion of both *Magel2* and *Necdin*, two genes also being deleted in PWS. The rationale for generating this mouse model was to avoid a potential functional redundancy between these two genes, that could mask some symptoms in the *Necdin*- or *Magel2*- single KO mice, both genes encoding MAGE proteins that bind E-3 ubiquitin ligases specifying proteins for ubiquitination (Florke Gee et al., 2020). Firstly, we confirmed that both genes are co-expressed in brain regions throughout life and co-regulated, potentially sharing a common enhancer. More importantly, we showed that when *Magel2* is deleted, *Necdin* expression is increased and vice versa. Such overexpression could induce a compensatory mechanism, but *Necdin* or *Magel2* overexpression could also be responsible for part of the phenotype in *Magel2* KO or *Necdin* KO mice, respectively. Indeed, it has been reported that a twofold increase in Necdin induced ASD-related behaviors (Tamada et al., 2021). Similarly, overexpression of the N-terminal region of Magel2 is embryonic or neonatal lethal, whereas normal production of this Magel2 protein is not lethal, indicating toxic effects of the overexpression of the protein (Ieda et al., 2020). Thus, the *Madin* KO mouse model with a deletion including both genes is genetically and phenotypically more reliable and relevant to study PWS since both genes are deleted and the compensatory mechanisms and/or phenotypes linked to overexpresion that could occur in single KO does not occur in *Madin* KO mice, similar to the situation in PWS.

Our teams have created and extensively studied the *Necdin* $^{tm1.1Mus}$ and *Magel2*$^{tm1.1Mus}$ KO mouse models from which *Madin* mice have been created. We, and others such as the Wevrick's team, have revealed important and specific roles for each of these genes in the pathophysiology of PWS, and these mouse models have been used in several pre-clinical studies. However, phenotypic differences were observed between the six different *Necdin* KO models and the 3 different *Magel2* KO models (Table 1 and Kummerfeld et al., 2021) that have been described.

Those differences might be explained by the genomic constructions allowing either a deletion and lack of transcripts or creation of a truncated or fused proteins that might induce an additional phenotype to the loss of function of the normal proteins. Furthermore, at least in *Necdin*$^{tm1.1Mus}$ and *Magel2*$^{tm1.1Mus}$ KO mice, a stochastic and very low expression of the maternal allele has been detected for *Necdin* (Rieusset et al., 2013) and *Magel2* (Matarazzo et al., 2013), respectively. This weak expression was sufficient to alleviate the phenotypes (Rieusset et al., 2013) and explained part of the variability between pups from the same litters.

Here, we produced several cohorts of *Madin* KO mice in different animal facilities, all on the same C57Bl6/J genetic background, and observed a variability in the severity of the phenotype (in particular on the mortality rate at birth) linked to the cohort. We also observed this variability with the *Magel2*$^{tm1.1Mus}$ mice (unpublished data). We could correlate this phenotypic variability with the different levels of sanitary status of the animal facility in which animals were housed, *i.e.*, in terms of pathogens and sterility of food and water. For example, in a pathogen-free status and sterile food, the phenotype was much less severe (with 0% lethality) than in a conventional animal facility (with 60% lethality in mutant mice *versus* control littermates). It is interesting to note that MAGE genes, conserved in all eukaryotes, play a role in adaptation to stress (*e.g.*, nutritional, genotoxic, and heat) (Florke Gee et al., 2020) and that in the absence of stress, their function is not revealed. It is therefore likely that the phenotype of *Madin* KO mice could be highly dependent on the environment (including food and water) and this issue should be taken into consideration in all animal houses, where the absence of pathogens does not reflect real life. The environment is also a challenge in patients with PWS. For example, respiratory failure is the most common cause of death (73% of infants) and always occurs in a stressful environment (*e.g.*, airway infection, hypercapnia, hypoxia) that reveals their inability to adapt a respiratory response (Butler et al., 2017).

Feeding difficulties, respiratory deficits and low body weight are among the first symptoms observed in babies with PWS that are also found in our *Madin* KO mouse model in which there was an absence of milk in the stomachs of the neonates, a cyanotic appearance, a low body weight and somatic growth from birth to weaning. The absence of milk in the stomach was observed also observed in *Magel2* $^{tm1.1Mus}$ KO pups and was shown to result from a suckling deficit caused by a defect in oxytocin maturation and release. A similar reduction in the number of OT neurons was reported in the *Ndn*$^{tm1\text{-}Mus}$ KO mice (Muscatelli et al., 2000). Interestingly, *Madin* KO pups also display a defect of OT maturation. The cyanotic appearance of the babies was observed in *Necdin* $^{tm1.1Mus}$ KO neonates. It reflects respiratory distress that was extensively study in *Necdin* $^{tm1.1Mus}$ KO mice and characterized by frequent apneas and irregular rhythms in basal condition and altered ventilatory response to hypercapnia (Zanella et al., 2008). In adult *Madin KO* mice, differences in ventilatory parameters were detected in normal conditions and also a blunted response to hypercapnia.

One of the hallmarks of PWS is the progression of symptoms over time. The motor, and possibly sensory deficits, underlying hypotonicity of infants with PWS tend to disappear later in childhood. We did not observe motor deficits in *Madin* KO pups but our results suggest a delay in maturation of touch/proprioception sensory modalities. PWS is also characterized by endocrinopathies including growth deficiency, hypogonadism and delayed puberty that we have also been observed in our *Madin KO* mouse model. The feeding difficulties observed in infancy are replaced by hyperphagia, leading to the development of obesity (McAllister et al., 2011). Despite the development of many rodent models of PWS, only two models have somewhat reproduced this phenotypic trait. *Magel2* KO mice do not become obese, but tend to gain more weight after weaning (Bischof et al., 2007), and a strain of *Necdin* KO mice (on ICR background) (Fujiwara et al., 2012) become obese on a high-fat diet. More conflicting findings have been reported with the feeding behavior of *Magel2* KO mice with some studies describing

moderate increases (Dombret et al., 2012) and others slight decreases (Bischof et al., 2007; Kozlov et al., 2007) in food intake in mutant mice. All the other mouse models of PWS tend to be leaner than control littermates (Kummerfeld et al., 2021). Similarly, male *Madin* KO mice have reduced body weight and fat mass, and normal food consumption, energy expenditure, and locomotor activity. In addition, male *Madin* KO mice display an improved glucose tolerance. Altogether, these findings that the metabolic and feeding behavior defects observed in PWS might be independent of *Magel2* and *Necdin*.

Behavioural changes are present throughout the patient's life. Anxiety, interactions with novel object or social interactions are altered in *Necdin* and *Magel2* KO mice, with a variability in the severity of phenotype, partly due to the environmental context. *Madin* KO mice showed a preference for the novel object *versus* a familiar one and for a congener mouse *versus* an empty cage. However, the interest to move towards the novel object or the time spent to socialize is reduced compared with the controls, similarly to the *Necdin* KO mice. Importantly, the cohort of *Madin* mice investigated for adult behavior was generated in a “sterile” context (associated with 0% lethality), that could explain why we observed a milder alteration of social behavior compared with *Magel2* mice.

Previous transcriptomic analyses performed on *post-mortem* hypothalamic tissues of patients with PWS identified alterations in molecular pathways involved in neuronal loss, altered neuro-plasticity, and neuroinflammation (Bochukova et al., 2018). Interestingly, we found 261 genes that were commonly dysregulated in both *Madin* KO mice and PWS patients whose functions were related to synaptic and axonal function, making the *Madin* KO mice a particularly relevant model to study neurodevelopmental and neurocircuits defects associated with PWS. Supporting this idea, we observed structural alterations in POMC neuronal circuits in *Madin* KO mice, similar to what we previously reported in the *Magel2* KO model (Maillard et al., 2016).

In conclusion, we observed a wide range of phenotypes in *Madin* KO mice that cover neurodevelopmental symptoms of PWS. The genetics of *Madin* KO mice make them currently the most appropriate and genetically relevant pre-clinical model for studying PWS.

Methods

Sex as a biological variable

Our study examined male and female animals. Both sexes were pooled when no sex differences were found.

Study approval

All experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (N.R.C., 1996) and the European Communities Council Directive of September 22th 2010 (2010/63/EU, 74) and the approved protocol (APAFIS# 13387–2017122712209790 for the studies performed in Lille and accreditation no. B13-055-19 for the studies conducted in Marseille) by the Ethical Committee of the French Ministry of Agriculture.

Trans-allelic recombination to generate the *Madin* KO mouse model and housing conditions

We used a Cre-loxP site-specific recombination to mediate efficient trans-allelic recombination *in vivo*, as previously described (Wu et al., 2007), between loxP site in the *Necdin* KO mouse (*Ndn*$^{tm1\text{-}Mus}$) (Muscatelli et al., 2000) and loxP site in the *Magel2* KO mouse (*Magel2*$^{tm1\text{-}Mus}$) (Schaller et al., 2010). This approach can be used because both loxP sites are oriented in the same direction allowing the creation of one allele with the deletion of the DNA region between both loxP sites. We used an *Hprt*-Cre driver mouse in which a strong CAG promoter is inserted into the X-linked Hprt locus allowing a strong, constitutively expressed, Cre recombinase. *Hprt*-Cre/*Magel2* KO(-m/+p) male mice were generated and then crossed with Heterozygous *Necdin* KO female mice (-m/+p).

Behavioral tests in pups

Behavior tests performed during the two first weeks of postnatal life followed a protocol described in Roubertoux et al. (2018) (Roubertoux et al., 2018). The age of eye and auditory canal opening was checked by visual inspection. The righting response was performed by scoring the time for righting, *i.e.*, the ability of the pup that is on its back to stand up on its paws (scoring the time for righting). The rooting response assessed the disappearance of the rooting reflex triggered by bilateral stimulation of the snout. 3 consecutive tests are performed and scored, with the total score plotted on a graph (Score 0: pup roots; score 1: pup stops to root; score 2: pup removes the head from the fingers). The paw position test is indicative of the appearance of an adult pattern when all four paws were placed flat on the ground (score 1 per paw placed flat on the ground). The bar holding test consisted in scoring the time during which the pup is able to hang when putting the its ventral face on the bar just at the level of the diaphragm, the position was unstable and the pup hanged onto the bar to prevent falling. The pulling up on the bar after hanging test consisted in performing the bar holding test and assessing the pulling up on the bar after hanging. Three scores were given: score1: the pup pulled up by drawing the bar towards him; score 2: the pup braced himself with his hind feet; score 3: the pup stood or walked on the bar. The climb the slope test consisted of the pup climbing up a 30° slope. The pup is positioned with the head downward (stay still), it turned the head, then the body at 90°, then at 180° and climbed the slope. The response is due to the maturation of semicircular canals (inner ears). In the vertical climbing test, the pup climbed along the wire mesh of vertical grid. The score was the number of mesh wires that the pup covers in 20 sec. In the cliff drop avoidance test, the pup should turned away from the edge of a step, starting with the forepaws dangling over the edge of the slice (score 0: it remained motionless or fell from the edge; score 1: it turned the head aside; score 2: it turned the head

aside, pulled back the forepaws from the cliff and put them on the slice; score 3: it initiated a backward movement.

Behavioral studies in adult mice

Behavioral tests in adulthood were performed by Phenotype Expertise, Inc. (France) with an expert behaviorist. The number of tested animals was based on previous publications and Phenotype Expertise experience. For all tests, mice were first acclimated to the behavioral room for 30 minutes.

Rotarod. Mice were challenged to walk on a rotating rod that increases in speed over a predetermined period of time (for 5 min) until the animal falls. The latency to fall from the rod is determined and taken as a measure of motor function. The test is performed over three successive days. The daily trial consists of three measures spaced by 5 minutes, a mean of the three measures is considered for each day.

Elevated plus maze. The device consists of a labyrinth of 4 arms of 5 cm width located 80 cm above the ground. Two opposite arms are open (without wall) while the other two arms are closed by side walls. The light intensity was adjusted to 20 Lux on the open arms. Mice were initially placed on the central platform and left free to explore the cross-shaped labyrinth for 5 minutes. The maze was cleaned and wiped with H_2O and with 70% ethanol between each mouse. Animal movement was video-tracked using Ethovision software 11.5 (Noldus). Time spent in open and closed arms, the number of entries in open arms, as well as the distance covered, are directly measured by the software.

Open field. The open field test was performed in a 40 x 40 cm square arena with an indirect illumination of 60 lux. Mouse movement was video-tracked using Ethovision software 11.5 (Noldus) for 10 minutes. Total distance traveled and time in center (exclusion of a 5 cm border arena) are directly measured by the software. Grooming (time and events) and rearing were manually counted in live using manual functions of the software, by an experimented behaviorist. The open-field arena was cleaned and wiped with H_2O and with 70% ethanol between each mouse.

Spontaneous Social Interaction in an open field arena. Animals were first habituated to the apparatus for 30 min. Social interaction was measured using pairs of mice from different housing cages, and having the same genotype, the same gender, and approximately the same body weight. Each pair was placed in the open field arena for 15 min during which different behavioral parameters reflecting social interaction between the two mice were recorded (following and sniffing). A social interaction index was defined as the percentage of counts and duration of social events over the total social and individual events.

New object recognition. The arena used for the novel object recognition test was the same used for the open-field test. The arena was cleaned and wiped with 70% ethanol between each mouse. Two identical objects (50 ml orange corning tube) were placed in the opposite corners of the arena, 10 cm from the side walls. The tested mouse was placed at the opposite side of the arena and allowed to explore the arena for 10 min. After 1h, one object was randomly replaced with another novel object, which was of similar size but differ in the shape and color with the previous object (white and blue lego bricks), the other object (same object) was kept. Then, the same mouse was placed in the arena and allowed to explore the two objects (a new and an "old" familiar object) for 10 min. The movement of the mice was video-tracked with Ethovision 11.5 software. Time of exploration of both objects (nose located in a 2 cm area

around object) was automatically measured by the software. The traveled distance to reach the novel object or the same object (old object) was measured.

Three-chamber social preference test. The three-chamber apparatus consisted of a Plexiglas box (50x25 cm) with removable floor and partitions dividing the box into three chambers with 5-cm openings between chambers. The task was carried out in four trials. The three-chambers apparatus was cleaned and wiped with 70% ethanol between each trial and each three-chamber test experiments. In the first trial (habituation), a test mouse was placed in the center of the three-chamber unit, where two empty wire cages were placed in the left and right chambers to habituate the test mouse to arena. The mouse was allowed to freely explore each chamber. The mouse was video-tracked for 5 min using Ethovision software. At the end of the trial, the animal was gently directed to the central chamber with doors closed. In the second trial (social exploration), an 8 weeks old C57BL/6J congener mouse (S1) was placed randomly in one of the two wire cages to avoid a place preference. The second wire cage remained empty (E). Then, doors between chambers were opened and the test mouse was allowed to freely explore the arena for 10 min. The measure of the real social contact is represented by the time spent in nose-to-nose interactions with the mouse. This test was performed using grouped-house mice.

Metabolic phenotyping

Animals were weighed daily from birth to weaning (P21) and weekly from P21 to P168 using an analytical balance. Body length was measured at P24 and P60 with a rigid metric ruler. Body composition analysis was conducted weekly from P25 to P168 using a Minispec LF Series (Bruker Corporation, Massachusetts). Fat mass, lean mass, and free body fluids measurements were expressed as a percentage of total body weight. Infrared pictures were taken with a hand-held camera (E8, with an accuracy of 2% max 2 °C, FLIR) on freely moving and unshaven mice at P120 to assess interscapular BAT temperature. Food intake, O_2 and CO_2 production,

energy expenditure, respiratory exchange ratio (*i.e.*, VCO_2/O_2), and locomotive activity (XY) were monitored in fed mice, fasted mice for 12-hours and after a 48-hour refeeding period at P180 using a combined indirect calorimetry system (TSE Pheno Master Systems GmBH, Germany). The mice were acclimated in monitoring chambers for two days, and the data were collected for 6 days. These physiological measures were performed at the Mouse metabolic phenotypic platform of the University of Lille. Glucose tolerance tests were conducted in mice at ~P130 of age through i.p. injection of glucose (2 g/g body weight) after 6 hours of fasting. Blood glucose levels were measured at 0, 15, 30, 60, 90, 120, and 150 minutes post-injection, as previously described (Coupé et al., 2012).

Reproductive Phenotyping

Starting on P21, mice were inspected daily for imperforation of the vaginal membrane ("vaginal opening", VO). After that, vaginal smears were collected daily and analyzed under the microscope to identify the onset of puberty (first appearance of two consecutive days where vaginal smears contained cornified cells) and the specific day of the estrous cycle, as described previously (Nelson et al., 1990; Prevot et al., 2005). Male mice were checked daily for balano-preputial separation as an external sign of puberty onset.

Hormone assays

Serum insulin levels were measured in P130 mice before, 15, and 30 minutes after intraperitoneal i.p. glucose administration (2 mg glucose/g body weight) using commercially available insulin ELISA kits (Mercodia). Serum leptin levels were measured in fed mice at P160-P240 using commercially available leptin ELISA kits (DuoSet Ancillary).

In vivo plethysmography recordings

Unrestrained, non-anesthetized mice were monitored for their breathing activity using whole-body plethysmography equipment (EMKA Technologies, Paris, France). A constant air flow (0.5 l/min) circulated inside the 200 ml plethysmography chambers (maintained at 25 ± 0.5℃) using a vacuum pump (Vent 4, EMKA, Paris, France). Calibration of the amplitude of the signal was ensured by injecting 1 ml of air into the chamber during each recording session. Analog signals were acquired through a usbAMP device and processed using EMKA technologies IOX software (EMKA Technologies, Paris, France). Respiratory parameters (frequency, tidal volume, minute ventilation, apneas and irregularity score) were analysed using the Spike2 software (Cambridge Electrical Design, Cambridge, UK). Apneas were defined as a prolonged expiratory time equivalent to the loss of two respiratory cycles. The day before the experiment, WT and *Madin* KO littermates were habituated in the plethysmography chambers for 2 hours to reduce stress effect on breathing. Respiratory responses to hypercapnia were then evaluated by recording breathing activity for 1 hour under normocapnia, followed by a 10-minute hypercapnic challenge (4% CO2), and a subsequent 30-minute recovery period under normocapnia. Measurements were performed during quiet breathing pre- and post-challenge, and during the last 5 minutes of the challenge. Apneas were also quantified on a minute-by-minute basis during the post-challenge period.

Neuroanatomical studies

For standard immunohistochemistry, paraformaldehyde-fixed brains were then frozen, sectioned at 30-µm thickness, and processed for immunofluorescence using standard procedures (Park et al., 2020). For the iDISCO+ immunolabeling, whole brains were first dehydrated, then incubated with the primary and secondary antibodies and cleared as previously described (Casoni et al., 2016). The primary antibodies used for IHC were as follows: rabbit anti-POMC (1:10,000, Ref# H-029-30, Phoenix Pharmaceuticals). rabbit anti-AgRP (1:1,000,

Ref# H-003-53, Phoenix Pharmaceuticals), mouse anti-neurophysin 2 clone PS38 (1:1000, Ref# MABN844, Merck Millipore), rabbit anti-GnRH (1:3,000, Ref# #26950-1-AP, Proteintech), and rabbit anti-Necdin (1:500, Ref# 07-565, Merck Millipore). The primary antibodies were visualized with goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 568 (1:500, Ref# A11011, Invitrogen) or donkey ant-rabbit IgG with Alexa Fluor 568 (1:1,000, Ref# A10042, Invitrogen) or anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 647 secondary antibodies (1:500, Ref# A21235, Life Technologies). Brain sections were mounted on glycerol-based medium with DAPI to visualize cell nuclei.

2D images were acquired using a Leica Stellaris 5 confocal Microscope equipped with a 20x objective. Quantifications were performed in two sections per animal. Slides were numerically coded to obscure the experimental group. The image analysis was performed using the Fiji software (NIH) as previously described (Park et al., 2020). For the quantitative analysis of fiber density (for POMC and AgRP), a maximum intensity projection was performed on 5 µm of the Z-stack. The threshold was set manually to ensure that only a positive signal was measured. Images were then binarized, and a standardized region of interest (ROI) was placed within the nucleus of interest. The software then calculated the number of pixels in the ROI corresponding to the signal of interest. This pixel count was finally normalized to the dimensions of the ROI, ensuring comparability across all images. The integrated intensity, which reflects the total number of pixels in the binarized image, was then calculated within the ROI of each image of the stack (Bouret et al., 2004; Steculorum et al., 2015). For the quantitative analysis of cell numbers, PS38-immunopositive cells were manually counted using the Fiji software. Only cells with corresponding DAPI-stained nuclei were included in our counts.

3D Imaging was performed on a light sheet Ultramicroscope I (LaVision BioTec) equipped with a 1.1X/0.1NA objective and an Andor Neo 5.5 sCMOS camera. ImspectorPro

software (LaVision BioTec) was used for image acquisition, and the z-step between each image was fixed at 5 µm. Image stacks were converted to Imaris files (.ims) using ImarisFileConverter, and 3D reconstruction was performed using "volume rendering" of Imaris 9.8 (Oxford Instruments). Automatic spot detector function of Imaris software was used to count the number of GnRH immunoreactive cell bodies. Anatomic 3D neurons' distribution was done manually.

In situ hybridization

Brain sections from embyros were post-fixed with 4% paraformaldehyde and processed for *in situ* hybridization using antisense digoxigenin-labeled *Necdin* and *Magel2* riboprobes as described in (Watrin et al., 2005). *In situ* hybridization on adult brain sections were performed using fluorescent labelling as described in (Rieusset et al., 2013). The *Ndn* riboprobe (290 bp) hybridized to the 3' UTR of the Ndn mRNA (nt 2130 to 2420; accession number D76440). The Magel2 riboprobe (318 bp) hybridized to the 3' part of the Magel2 ORF (nt 3730 to 4048; accession number AK086725).

RNA extraction and RT-qPCR analyses

Wild-type and mutant newborns were sacrificed at P0. The hypothalamus was quickly dissected on ice and rapidly frozen in liquid nitrogen, then stored at −80 °C. Total RNA was isolated using the RNeasy® Mini Kit (Qiagen, cat #74104), according to the manufacturer's protocol and cDNAs were obtained by reverse transcription using QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, cat #205311), starting with 600 ng of total RNA.We performed RT-qPCR using Sybrgreen-based application (on the LightCycler®480 Instrument) to measure mRNAs quantity of *Necdin* and *Magel2* transcipts normalized with *GapdH* and *Actin* reference transcripts as previously described (Pallesi-Pocachard, 2017). The qPCR primers used were the following: *Necdin* , Forward :AACAACCGTATGCCCATGA and Reverse :

CTTCACATAGATGAGGCTCAGGAT; *Magel2*, Forward : CTGGGAGATTCAGAGGGCTA/ and Reverse : TGCGGAGTGTAGAGGGATTC.

RNA expression analysis by RNA sequencing

Mice were housed in a 12-h light/12-h dark cycle (LD) and were sacrificed six hours after light on ("DAY" group), or 18 hours after light on ("NIGHT" group).

Total RNA Sequencing. The construction of Illumina DNA libraries was prepared with Illumina Sample Preparation kit with rRNA depletion. Strand-specific RNAseq was done on Illumina HiSeq, 2x150 bp sequencing configuration (30 million reads per sample on average were obtained).

Mapping of total RNA-Seq. Paired-end reads (150bp) were aligned to the Mouse reference genome (UCSC mm10) using HISAT2 (Kim et al., 2015).

Quantification of RNA levels for each gene, and differential expression analysis. FeatureCounts (Liao et al 2018) was used to quantify the number of counts for each mRNA. Differential expression analysis was performed using DESeq2 (Anders and Huber, 2010). low count genes (<10 reads in total) were removed before running DESeq2.

Gene ontology analysis. Gene ontology (GO) analysis was performed using Panther web service (Mi et al., 2019) https://pantherdb.org. Enrichment test was performed for Biological Process. The analysis performed was Statistical overrepresentation test. Categories with adjusted *P* values (Benjamini–Hochberg) smaller than 0.05 were reported.

Data Availability

The data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo (accession no. GSE162751)

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism (version 10.2.2). Statistically significant outliers were calculated using Grubb's test for outliers. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Author contributions

F.M., S.G.B., and V.P. conceived and designed the project. F.S. and F.M. conceived the mouse model. P.-Y.B, A.S., F.S., J.B., M.C., D.B., F.O., C.S., F.M., A.-M.F.-B, J.K., and E.C. performed experiments. F.M., S.G.B., V.P., P.-Y.B., A.S., F.S., J.B., M.C., D.B., F.O., C.S., F.M., A.-M.F.-B., J.K., and E.C. analyzed data. P.-Y.B., A.S., A.-M..F-B., F.M., and S.G.B. wrote the manuscript. All the authors read and approved the manuscript.

Acknowledgments

We thank Jacques Van Helden and Jean-Louis Franc for discussions. We thank the INMED animal facility platform and the INMED Molecular Biology platform. We thank Meryem Tardivel and Antonino Bongiovanni from the BICEL Photonic Microscopy in Lille. We thank Julien Devassine (animal core facility, Lille) and members of the PLBS UAR2014-US41 for their expert technical support. SGB and FM are funded by the Foundation for Prader-Willi Research, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau, and l'Agence National pour la Recherche (ANR-22-CE16-0007, MATBIOTA).

References

Aebischer, J., Sturny, R., Andrieu, D., Rieusset, A., Schaller, F., Geib, S., Raoul, C., Muscatelli, F., 2011. Necdin protects embryonic motoneurons from programmed cell death. PloS One 6, e23764.

Anders, S., Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol. 11, R106.

Andrieu, D., Meziane, H., Marly, F., Angelats, C., Fernandez, P.-A., Muscatelli, F., 2006. Sensory defects in Necdin deficient mice result from a loss of sensory neurons correlated within an increase of developmental programmed cell death. BMC Dev. Biol. 6, 56.

Ates, T., Oncul, M., Dilsiz, P., Topcu, I.C., Civas, C.C., Alp, M.I., Aklan, I., Ates Oz, E., Yavuz, Y., Yilmaz, B., Sayar Atasoy, N., Atasoy, D., 2019. Inactivation of *Magel2* suppresses oxytocin neurons through synaptic excitation-inhibition imbalance. Neurobiol. Dis. 121, 58–64.

Barker, P.A., Salehi, A., 2002. The MAGE proteins: Emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. J. Neurosci. Res. 67, 705–712.

Bertoni, A., Schaller, F., Tyzio, R., Gaillard, S., Santini, F., Xolin, M., Diabira, D., Vaidyanathan, R., Matarazzo, V., Medina, I., Hammock, E., Zhang, J., Chini, B., Gaiarsa, J.-L., Muscatelli, F., 2021. Oxytocin administration in neonates shapes hippocampal circuitry and restores social behavior in a mouse model of autism. Mol. Psychiatry 26, 7582–7595.

Bischof, J.M., Stewart, C.L., Wevrick, R., 2007. Inactivation of the mouse Magel2 gene results in growth abnormalities similar to Prader-Willi syndrome. Hum. Mol. Genet. 16, 2713–2719.

Bochukova, E.G., Lawler, K., Croizier, S., Keogh, J.M., Patel, N., Strohbehn, G., Lo, K.K., Humphrey, J., Hokken-Koelega, A., Damen, L., Donze, S., Bouret, S.G., Plagnol, V., Farooqi, I.S., 2018. A Transcriptomic Signature of the Hypothalamic Response to Fasting and BDNF Deficiency in Prader-Willi Syndrome. Cell Rep. 22, 3401–3408.

Bouret, S.G., Draper, S.J., Simerly, R.B., 2004. Trophic Action of Leptin on Hypothalamic Neurons That Regulate Feeding. Science 304, 108–110.

Butler, M.G., Manzardo, A.M., Heinemann, J., Loker, C., Loker, J., 2017. Causes of death in Prader-Willi syndrome: Prader-Willi Syndrome Association (USA) 40-year mortality survey. Genet. Med. 19, 635–642.

Butler, M.G., Miller, J.L., Forster, J.L., 2019. Prader-Willi Syndrome - Clinical Genetics, Diagnosis and Treatment Approaches: An Update. Curr. Pediatr. Rev. 15, 207–244.

Casoni, F., Malone, S.A., Belle, M., Luzzati, F., Collier, F., Allet, C., Hrabovszky, E., Rasika, S., Prevot, V., Chédotal, A., Giacobini, P., 2016. Development of the neurons controlling fertility in humans: new insights from 3D imaging and transparent fetal brains. Dev. Camb. Engl. 143, 3969–3981. 4

Coupé, B., Ishii, Y., Dietrich, M.O., Komatsu, M., Horvath, T.L., Bouret, S.G., 2012. Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation. Cell Metab. 15, 247–255.

Dombret, C., Nguyen, T., Schakman, O., Michaud, J.L., Hardin-Pouzet, H., Bertrand, M.J.M., De Backer, O., 2012. Loss of Maged1 results in obesity, deficits of social interactions, impaired sexual behavior and severe alteration of mature oxytocin production in the hypothalamus. Hum. Mol. Genet. 21, 4703–4717.

Florke Gee, R.R., Chen, H., Lee, A.K., Daly, C.A., Wilander, B.A., Fon Tacer, K., Potts, P.R., 2020. Emerging roles of the MAGE protein family in stress response pathways. J. Biol. Chem. 295, 16121–16155.

Fountain, M.D., Schaaf, C.P., 2016. Prader-Willi Syndrome and Schaaf-Yang Syndrome: Neurodevelopmental Diseases Intersecting at the MAGEL2 Gene. Dis. Basel Switz. 4, 2.

Fountain, M.D., Tao, H., Chen, C.-A., Yin, J., Schaaf, C.P., 2017. Magel2 knockout mice manifest altered social phenotypes and a deficit in preference for social novelty. Genes Brain Behav. 16, 592–600.

Fujiwara, K., Hasegawa, K., Ohkumo, T., Miyoshi, H., Tseng, Y.-H., Yoshikawa, K., 2012. Necdin Controls Proliferation of White Adipocyte Progenitor Cells. PLOS ONE 7, e30948.

Gabriel, J.M., Merchant, M., Ohta, T., Ji, Y., Caldwell, R.G., Ramsey, M.J., Tucker, J.D., Longnecker, R., Nicholls, R.D., 1999. A transgene insertion creating a heritable chromosome deletion mouse model of Prader-Willi and Angelman syndromes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 9258–9263.

Gérard, M., Hernandez, L., Wevrick, R., Stewart, C.L., 1999. Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. Nat. Genet. 23, 199–202.

Herbison, A.E., 2016. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. Nat. Rev. Endocrinol. 12, 452–466.

Higgs, M.J., Hill, M.J., John, R.M., Isles, A.R., 2022. Systematic investigation of imprinted gene expression and enrichment in the mouse brain explored at single-cell resolution. BMC Genomics 23, 754. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08986-8

Höybye, C., Tauber, M., 2022. Approach to the Patient With Prader–Willi Syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 107, 1698–1705.

Ieda, D., Negishi, Y., Miyamoto, T., Johmura, Y., Kumamoto, N., Kato, K., Miyoshi, I., Nakanishi, M., Ugawa, S., Oishi, H., Saitoh, S., 2020. Two mouse models carrying truncating mutations in Magel2 show distinct phenotypes. PLOS ONE 15, e0237814. h

Kim, J.K., Kolodziejczyk, A.A., Ilicic, T., Teichmann, S.A., Marioni, J.C., 2015. Characterizing noise structure in single-cell RNA-seq distinguishes genuine from technical stochastic allelic expression. Nat. Commun. 6, 8687.

Kozlov, S.V., Bogenpohl, J.W., Howell, M.P., Wevrick, R., Panda, S., Hogenesch, J.B., Muglia, L.J., Van Gelder, R.N., Herzog, E.D., Stewart, C.L., 2007. The imprinted gene Magel2 regulates normal circadian output. Nat. Genet. 39, 1266–1272.

Kummerfeld, D.-M., Raabe, C.A., Brosius, J., Mo, D., Skryabin, B.V., Rozhdestvensky, T.S., 2021. A Comprehensive Review of Genetically Engineered Mouse Models for Prader-Willi Syndrome Research. Int. J. Mol. Sci. 22, 3613.

Lee, S., Walker, C.L., Wevrick, R., 2003. Prader-Willi syndrome transcripts are expressed in phenotypically significant regions of the developing mouse brain. Gene Expr. Patterns GEP 3, 599–609.

Lu, R., Dong, Y., Li, J.-D., 2020. Necdin regulates BMAL1 stability and circadian clock through SGT1-HSP90 chaperone machinery. Nucleic Acids Res. 48, 7944–7957.

Maillard, J., Park, S., Croizier, S., Vanacker, C., Cook, J.H., Prevot, V., Tauber, M., Bouret, S.G., 2016. Loss of Magel2 impairs the development of hypothalamic Anorexigenic circuits. Hum. Mol. Genet. 25, 3208–3215.

Matarazzo, V., Caccialupi, L., Schaller, F., Shvarev, Y., Kourdougli, N., Bertoni, A., Menuet, C., Voituron, N., Deneris, E., Gaspar, P., Bezin, L., Durbec, P., Hilaire, G., Muscatelli, F., 2013. Necdin shapes serotonergic development and SERT activity modulating breathing in a mouse model for Prader-Willi syndrome. eLife 6, e32640.

McAllister, C.J., Whittington, J.E., Holland, A.J., 2011. Development of the eating behaviour in Prader-Willi Syndrome: advances in our understanding. Int. J. Obes. 2005 35, 188–197.

Mercer, R.E., Kwolek, E.M., Bischof, J.M., van Eede, M., Henkelman, R.M., Wevrick, R., 2009. Regionally reduced brain volume, altered serotonin neurochemistry, and abnormal behavior in mice null for the circadian rhythm output gene Magel2. Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 150B, 1085–1099.

Meziane, H., Schaller, F., Bauer, S., Villard, C., Matarazzo, V., Riet, F., Guillon, G., Lafitte, D., Desarmenien, M.G., Tauber, M., Muscatelli, F., 2015. An Early Postnatal Oxytocin Treatment Prevents Social and Learning Deficits in Adult Mice Deficient for Magel2, a Gene Involved in Prader-Willi Syndrome and Autism. Biol. Psychiatry 78, 85–94.

Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X., Thomas, P.D., 2019. PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. Nucleic Acids Res. 47, D419–D426.

Muscatelli, F., Abrous, D.N., Massacrier, A., Boccaccio, I., Le Moal, M., Cau, P., Cremer, H., 2000. Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. Hum. Mol. Genet. 9, 3101–3110.

Nelson, J.F., Karelus, K., Felicio, L.S., Johnson, T.E., 1990. Genetic influences on the timing of puberty in mice. Biol. Reprod. 42, 649–655.

Oncul, M., Dilsiz, P., Ates Oz, E., Ates, T., Aklan, I., Celik, E., Sayar Atasoy, N., Atasoy, D., 2018. Impaired melanocortin pathway function in Prader-Willi syndrome gene-Magel2 deficient mice. Hum. Mol. Genet. 27, 3129–3136.

Pallesi-Pocachard, E., 2017. Quantification of NMDAR Subunit Genes Expression by qRT-PCR. Methods Mol. Biol. Clifton NJ 1677, 83–92.

Park, S., Jang, A., Bouret, S.G., 2020. Maternal obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes metabolic alterations and abnormal hypothalamic development in the offspring. PLOS Biol. 18, e3000296.

Prevot, V., Lomniczi, A., Corfas, G., Ojeda, S.R., 2005. erbB-1 and erbB-4 Receptors Act in Concert to Facilitate Female Sexual Development and Mature Reproductive Function. Endocrinology 146, 1465–1472.

Rieusset, A., Schaller, F., Unmehopa, U., Matarazzo, V., Watrin, F., Linke, M., Georges, B., Bischof, J., Dijkstra, F., Bloemsma, M., Corby, S., Michel, F.J., Wevrick, R., Zechner, U., Swaab, D., Dudley, K., Bezin, L., Muscatelli, F., 2013. Stochastic Loss of Silencing of the Imprinted Ndn/NDN Allele, in a Mouse Model and Humans with Prader-Willi Syndrome, Has Functional Consequences. PLoS Genet. 9, e1003752.

Roubertoux, P.L., Ghata, A., Carlier, M., 2018. Measuring Preweaning Sensorial and Motor Development in the Mouse. Curr. Protoc. Mouse Biol. 8, 54–78.

Schaaf, C.P., Gonzalez-Garay, M.L., Xia, F., Potocki, L., Gripp, K.W., Zhang, B., Peters, B.A., McElwain, M.A., Drmanac, R., Beaudet, A.L., Caskey, C.T., Yang, Y., 2013. Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. Nat. Genet. 45, 1405–1408.

Schaller, F., Watrin, F., Sturny, R., Massacrier, A., Szepetowski, P., Muscatelli, F., 2010. A single postnatal injection of oxytocin rescues the lethal feeding behaviour in mouse newborns deficient for the imprinted Magel2 gene. Hum. Mol. Genet. 19, 4895–4905.

Steculorum, S.M., Collden, G., Coupe, B., Croizier, S., Lockie, S., Andrews, Z.B., Jarosch, F., Klussmann, S., Bouret, S.G., 2015. Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits. J. Clin. Invest.

Stefan, M., Ji, H., Simmons, R.A., Cummings, D.E., Ahima, R.S., Friedman, M.I., Nicholls, R.D., 2005. Hormonal and Metabolic Defects in a Prader-Willi Syndrome Mouse Model with Neonatal Failure to Thrive. Endocrinology 146, 4377–4385.

Swaab, D.F., 1997. Prader-Willi syndrome and the hypothalamus. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 Suppl. 423, 50–54.

Swaab, D.F., Purba, J.S., Hofman, M.A., 1995. Alterations in the hypothalamic paraventricular nucleus and its oxytocin neurons (putative satiety cells) in Prader-Willi syndrome: a study of five cases. J. Clin. Endocrinol. Metab. 80, 573–579.

Tamada, K., Fukumoto, K., Toya, T., Nakai, N., Awasthi, J.R., Tanaka, S., Okabe, S., Spitz, F., Saitow, F., Suzuki, H., Takumi, T., 2021. Genetic dissection identifies Necdin as a driver gene in a mouse model of paternal 15q duplications. Nat. Commun. 12, 4056.

Tennese, A.A., Wevrick, R., 2011. Impaired hypothalamic regulation of endocrine function and delayed counterregulatory response to hypoglycemia in Magel2-null mice. Endocrinology 152, 967–978.

Vaidyanathan, R., Schaller, F., Muscatelli, F., Hammock, E.A.D., 2020. Colocalization of Oxtr with Prader-Willi syndrome transcripts in the trigeminal ganglion of neonatal mice. Hum. Mol. Genet. 29, 2065–2075.

Vanacker, C., Trova, S., Shruti, S., Casoni, F., Messina, A., Croizier, S., Malone, S., Ternier, G., Hanchate, N.K., Rasika, S., Bouret, S.G., Ciofi, P., Giacobini, P., Prevot, V., 2020. Neuropilin-1 expression in GnRH neurons regulates prepubertal weight gain and sexual attraction. EMBO J. 39, e104633.

Watrin, F., Le Meur, E., Roeckel, N., Ripoche, M.-A., Dandolo, L., Muscatelli, F., 2005. The Prader-Willi syndrome murine imprinting center is not involved in the spatio-temporal transcriptional regulation of the Necdin gene. BMC Genet. 6, 1.

Wijesuriya, T.M., De Ceuninck, L., Masschaele, D., Sanderson, M.R., Carias, K.V., Tavernier, J., Wevrick, R., 2017. The Prader-Willi syndrome proteins MAGEL2 and necdin regulate leptin receptor cell surface abundance through ubiquitination pathways. Hum. Mol. Genet. 26, 4215–4230.

Wu, S., Ying, G., Wu, Q., Capecchi, M.R., 2007. Toward simpler and faster genome-wide mutagenesis in mice. Nat. Genet. 39, 922–930.

Zanella, S., Watrin, F., Mebarek, S., Marly, F., Roussel, M., Gire, C., Diene, G., Tauber, M., Muscatelli, F., Hilaire, G., 2008. Necdin Plays a Role in the Serotonergic Modulation of the Mouse Respiratory Network: Implication for Prader-Willi Syndrome. J. Neurosci. 28, 1745–1755.

Zhang, J., Cai, F., Lu, R., Xing, X., Xu, L., Wu, K., Gong, Z., Zhang, Q., Zhang, Y., Xing, M., Song, W., Li, J.-D., 2023. CNTNAP2 intracellular domain (CICD) generated by γ-secretase cleavage improves autism-related behaviors. Signal Transduct. Target. Ther. 8, 1–12.

Zheng, B., Sage, M., Sheppeard, E.A., Jurecic, V., Bradley, A., 2000. Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. Mol. Cell. Biol. 20, 648–655.

Table 1. Phenotypic comparison of the *Madin* KO mice with *Magel2* and *Necdin* single KO models. Up- and down-regulations of physiological parameters are represented by arrows (↑ and ↓). Data on *Magel2* and *Necdin* KO models are derived from Kummerfeld et al., 2021.

	Post-natal Deficiency	Behavior	Metabolism and Body composition	Puberty and Fertility	Neuronal alteration
***Madin* KO**	0-60% Lethality Cyanosis Impaired neonatal feeding ↓ postanal growth	Impaired circadian rhythm	↓ body weight (♂) ↓ fat mass (♂) ↑ lean mass (♂ and ♀) ↓ fasting glycemia (♂ and ♀) ↓ body size pre-weening (♀) ↑ glucose tolerance (♂)	Delay onset of puberty	↑ VA10/PS38 neuron ratio ↓ POMC+ fibers (♂)
***Magel2*$^{tm1.1Mus}$ (*Magel2*$^{m+/p-}$)**	50% Lethality Impaired neonatal feeding ↓ postanal growth	Impairedl social behavior Impaired learning ability	Normal body weight	Progressive infertility (F.Muscatelli personal report)	↑ VA10/PS38 neuron ratio
***Magel2*^{tm1Stw} /J (*Magel2*$^{m+/p-}$)**	10% Lethality ↓ postanal growth	Impaired feeding behavior ↓ general activity Anxiety Impaired social behavior	Normal body weight ↑ fat mass ↓ lean mass ↓ bone mineral density Impared glucose and choelesterol homeostasis Insulin and Leptin resistance	Delayed onset of puberty Progressive infertility	↓ Oxytocin ↓ Dopamin ↓ Serotonin ↓ POMC+ fibers (♂)
***Magel2*$^{p.Y5}$**	None	Normal behavior	↓ body weight (♂)	Normal fertility	None
***B6.129S1(Cg)-Ndn*^{tm2Stw} /J (*Ndn*^{tm2Stw})**	25-95 % Lethality	Normal behavior	Normal body weight	Normal fertility	None
***Ndn*^{tm1Ky} (*Ndn*$^{m+/p-}$)**	None	Impaired breathing ↓ Pain sensitivity	Normal body weight	Normal fertility	Overall reduction of neurons at birth
***Ndn*^{tm1Alb} (*Ndn*$^{m+/p-}$)**	None	Normal behavior	Normal body weight	Normal fertility	None
***Ndn*$^{tm1.1Mus}$ (*Ndn*$^{m+/p-}$)**	21–31% Lethality Cyanosis Respiratory distress	Impaired circadian rhythm ↑ skin scraping Normal loco-motor activity Normal anxiety ↑ learning and memory	Normal body weight	Normal fertility	↑ VA10/PS38 neuron ratio ~ 29% oxytocin neurons loss ~25% of LHRH neurons loss ↓ serotonin

Figures & Figure Legends

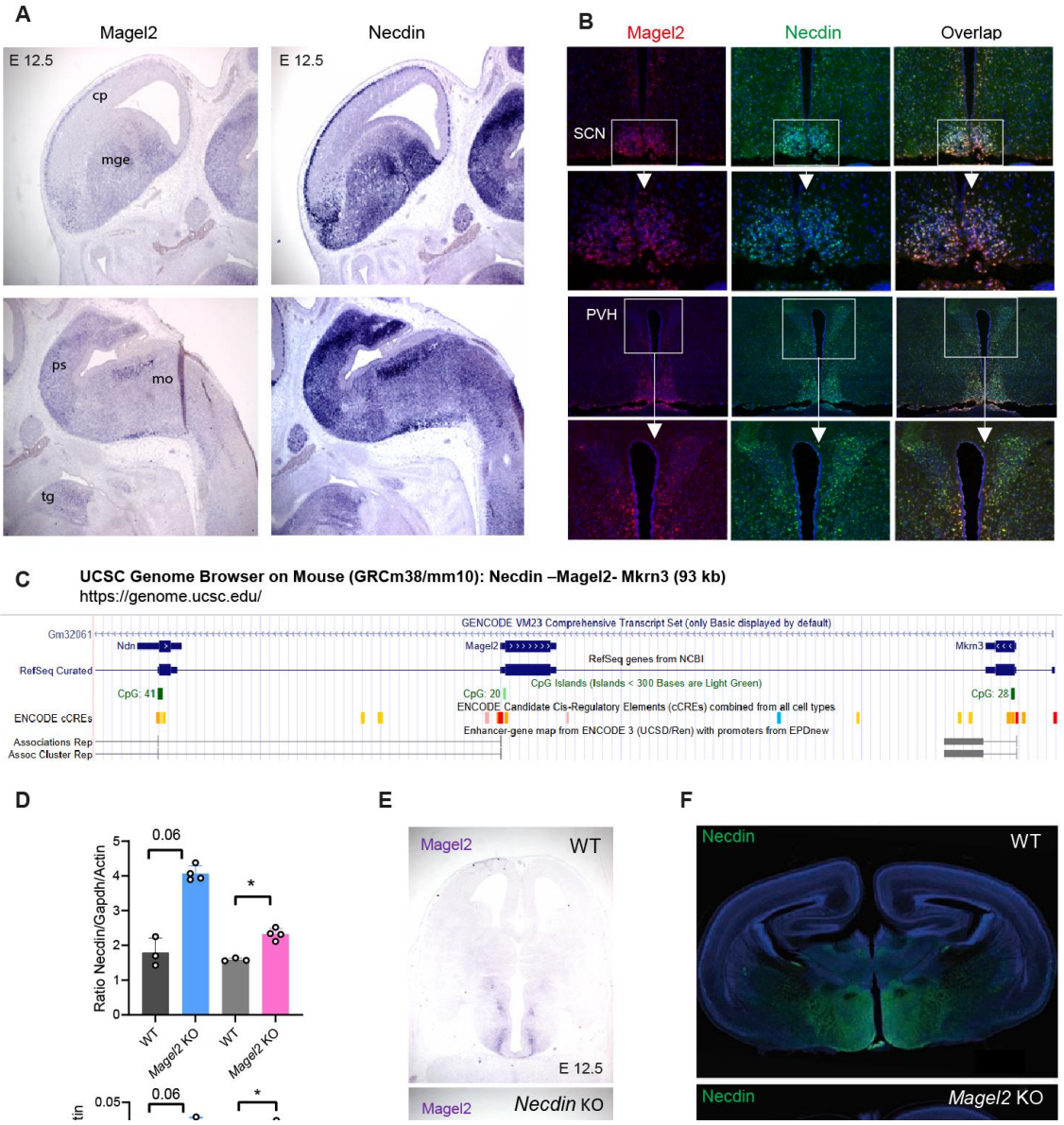
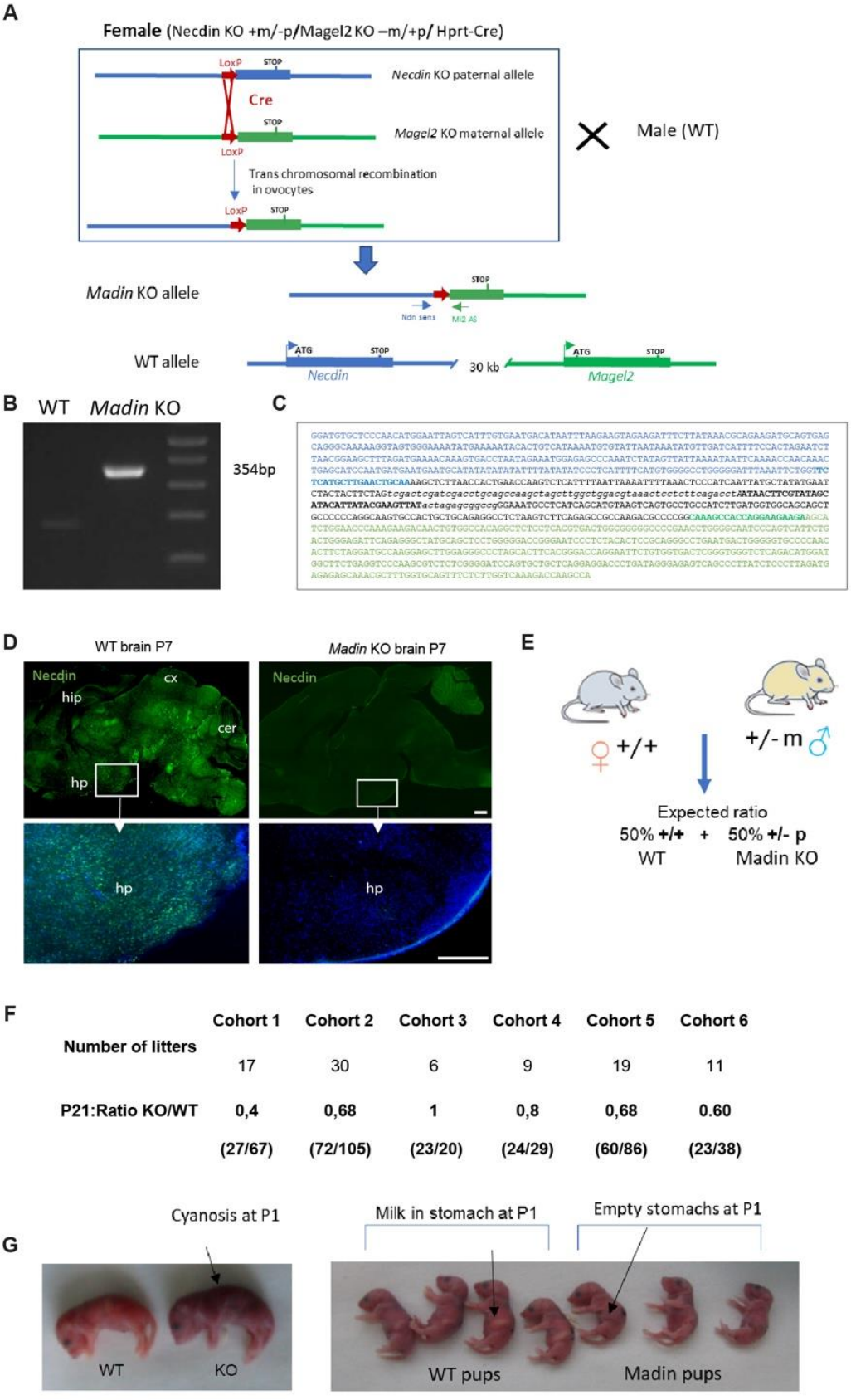


Figure 1. Co-expression and co-regulation of *Necdin* and *Magel2* genes in the mouse brain. (**A,B**) Images showing *Necdin* and *Magel2* mRNA-expressing cells in (**A**) the forebrain and brainstem of E12 mice and (**B**) in the hypothalamus of adult mice. (**C**) Map of the 93kb mouse genomic region including *Necdin, Magel2* and *Mkrn3* genes, ENCODE Cis regulatory elements, and associations between enhancers and promoters of genes, extracted from UCSC Genome Browser. A co-regulation of *Magel2* and *Necdin* via shared enhancer is proposed. (**D**) RT-qPCR analysis showing relative levels of *Necdin* and *Magel2* mRNA in wild-type (WT), *Magel2* KO, or *Necdin* KO male and female mice at P0 (n = 3-5 animals per group). (**E**) Images showing *Magel2* mRNA-expression in the brain of E12.5 WT and *Necdin* KO embryos at E12.5. (**F**) Images showing Necdin immunoreactivity in forebrain sections of WT and *Magel2* KO mice at P0. Data are presented as mean ± SEM. Statistical significance between groups was determined by a Mann-Whitney test (D). $*P < 0.05$. Scale bar: 500 μm. cp, cortical plate; hp, hypothalamus; mge, median ganglion eminence; mo, medulla oblongata; ps, pons; tg, tongue; PVH, paraventricular nucleus; SCN, suprachiasmatic nucleus.



	Cohort 1	Cohort 2	Cohort 3	Cohort 4	Cohort 5	Cohort 6
Number of litters	17	30	6	9	19	11
P21:Ratio KO/WT	**0,4**	**0,68**	**1**	**0,8**	**0,68**	**0.60**
	(27/67)	**(72/105)**	**(23/20)**	**(24/29)**	**(60/86)**	**(23/38)**

Figure 2. Construction and validation of the *Madin* KO mouse model. (**A**) Strategy to obtain a 32 kb deletion including both the *Necdin* and *Magel2* genes using a trans-allelic recombination approach. First, a female mouse containing the maternal allele with the *Magel2* deletion, the paternal allele with the *Necdin* deletion, and containing the *Hprt*-Cre gene was created using both *Necdin*$^{tm1\text{-}Mus}$ and *Magel2* $^{tm1\text{-}Mus}$ KO models and a transgenic mouse line expressing the Cre recombinase under Hprt promoter. We then crossed these female mice with wild-type (WT) male mice and screened the litter for the recombinant *Madin* KO allele using PCR with *Necdin* sense and *Magel2* antisense primers. The *Madin* allele being created in the ovocytes. (**B**) PCR product obtained from the recombinant *Madin* allele (354bp). (**C**) Sequence of the recombined *Madin* allele with the *Necdin* upstream sequence (blue) and *Ndn* sense primer (bold blue), the LoxP sequence (bold black) and *Magel2* sequence (green) Ml2 anti-sense primer (bold green) validate the recombination at the loxP sites. (**D**) Images showing Necdin immunoreactivity in sagittal sections of WT and *Magel2* KO mouse brains at P7. (**E**) Breeding strategy to generate *Madin* KO and WT litters with an expected ratio of 1 *Madin* KO /1WT. (**F**) Ratio of *Madin* KO and WT mice at P21 from six cohorts produced in different laboratories. (**G**) Photos showing cyanosis and lack of milk in the stomach associated to the death of *Madin* KO pups at P1. Scale bar: 400 μm. cer, cerebellum' cx, cortex; hip, hippocampus; hp, hypothalamus

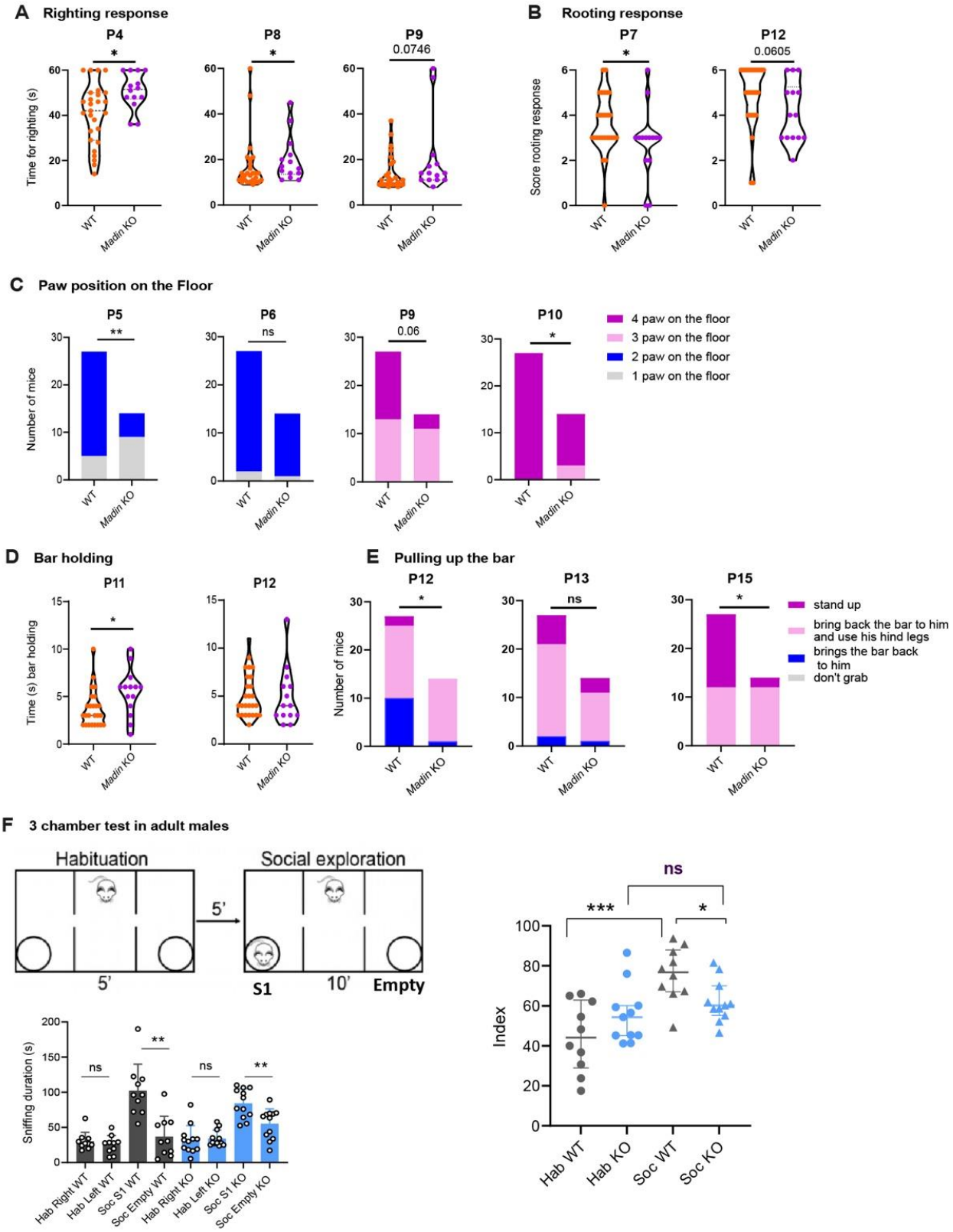

A Righting response
P4
P8
P9
0.0746
Time for righting (s)
WT
Madin KO
B Rooting response
P7
P12
0.0605
Score rooting response
C Paw position on the Floor
P5
P6
P9
0.06
P10
Number of mice
4 paw on the floor
3 paw on the floor
2 paw on the floor
1 paw on the floor
D Bar holding
P11
P12
Time (s) bar holding
E Pulling up the bar
P12
P13
P15
Number of mice
stand up
bring back the bar to him and use his hind legs
brings the bar back to him
don't grab
F 3 chamber test in adult males
Habituation
Social exploration
5'
10'
S1
Empty
Sniffing duration (s)
Hab Right WT
Hab Left WT
Soc S1 WT
Soc Empty WT
Hab Right KO
Hab Left KO
Soc S1 KO
Soc Empty KO
Index
Hab WT
Hab KO
Soc WT
Soc KO

Figure 3. *Madin* KO mice display early sensory alterations and social exploration deficits during adulthood. (**A**) righting response in WT and *Madin* KO mice at P4, P8, and P9 (n = 14-27 animals per group), (**B**) rooting response in P7 and P12 WT and *Madin* KO pups (n = 14-27 animals per group), (**C**) paw position test in WT and *Madin* KO mice at P5, P6, P9, and P10 ((n = 14-27 animals per group), (**D**) holding bar test in P11 and P12 WT and *Madin* KO pups (n = 14-27 animals per group), (**E**) test assessing the pulling up on the bar after hanging in P12, P13, and P15 WT and *Madin* KO pups (n = 14-27 animals per group), and (**F**) 3-chamber test in adult WT and *Madin* mice (n = 14-27 animals per group). Data are presented as mean ± SEM. Statistical significance between groups was determined by a Mann-Whitney test (A,B,D), a Chi^2 test (C,E), or a Wilcoxon matched pairs test and Mann Whitney test (F). * P <0.05, ** P < 0.01

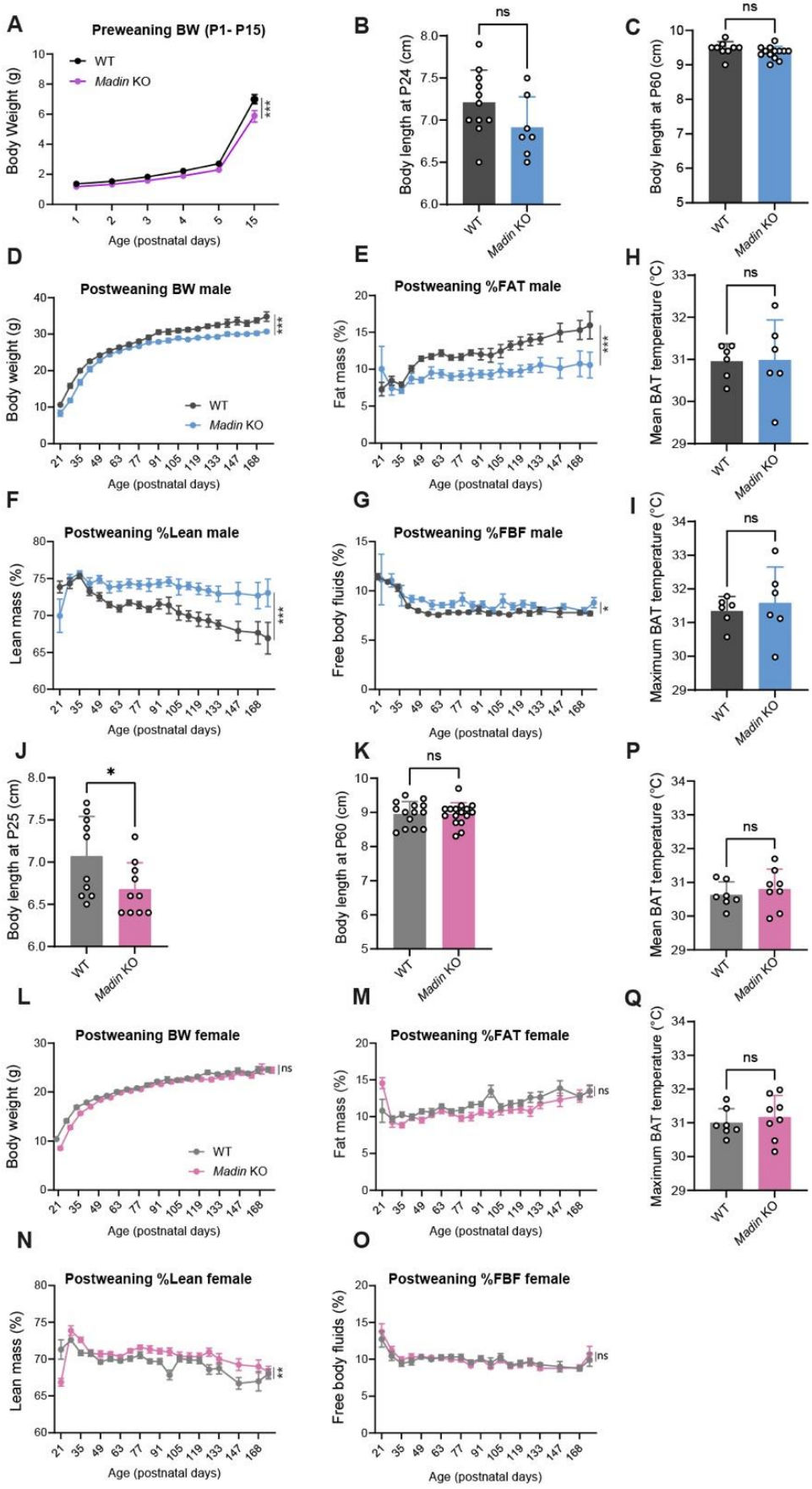

A
Preweaning BW (P1- P15)
Body Weight (g)
WT
Madin KO
***
Age (postnatal days)
B
ns
Body length at P24 (cm)
WT
Madin KO
C
ns
Body length at P60 (cm)
WT
Madin KO
D
Postweaning BW male
Body weight (g)
***
WT
Madin KO
Age (postnatal days)
E
Postweaning %FAT male
Fat mass (%)
***
Age (postnatal days)
H
ns
Mean BAT temperature (°C)
WT
Madin KO
F
Postweaning %Lean male
Lean mass (%)
***
Age (postnatal days)
G
Postweaning %FBF male
Free body fluids (%)
*
Age (postnatal days)
I
ns
Maximum BAT temperature (°C)
WT
Madin KO
J
*
Body length at P25 (cm)
WT
Madin KO
K
ns
Body length at P60 (cm)
WT
Madin KO
P
ns
Mean BAT temperature (°C)
WT
Madin KO
L
Postweaning BW female
Body weight (g)
ns
WT
Madin KO
Age (postnatal days)
M
Postweaning %FAT female
Fat mass (%)
ns
Age (postnatal days)
Q
ns
Maximum BAT temperature (°C)
WT
Madin KO
N
Postweaning %Lean female
Lean mass (%)
**
Age (postnatal days)
O
Postweaning %FBF female
Free body fluids (%)
ns
Age (postnatal days)

Figure 4. Sexually dimorphic effects of *Magel2* and *Necdin* deficiencies on growth curves and body composition. (**A**) Body weight from birth (P0) to P15 of *Madin* KO and wild-type mice (n = 13–28 animals per group). Body length at P24 and adulthood (P60) of (**B, C**) male and (**J, K**) female *Madin* KO and wild-type mice (n = 13–7 animals per group). Body weight (**D, L**), fat mass (**E, M**), lean mass (**F, N**), and free body fluids (**G, O**) of (**D-G**) male and (**L-O**) female *Madin* KO and wild-type mice from weaning (P21) to P168 (n = 13–18 animals per group). (**H, P**) Mean and (**I, Q**) maximum brown adipose tissue temperature in (**H, I**) male and (**P, Q**) female *Madin* KO and wild-type mice at P120 (n = 6 animals per group). Data are presented as mean ± SEM. Statistical significance between groups was determined by Mixed-effect test (A,D,E,F,G,L,M,N,O), Student's t-test (B,C,J,K,L,Q,R) or a Mann-Whitney test (H,I) . *$P \leq 0.033$., **$P \leq 0.002$, ***$P \leq 0.0002$.

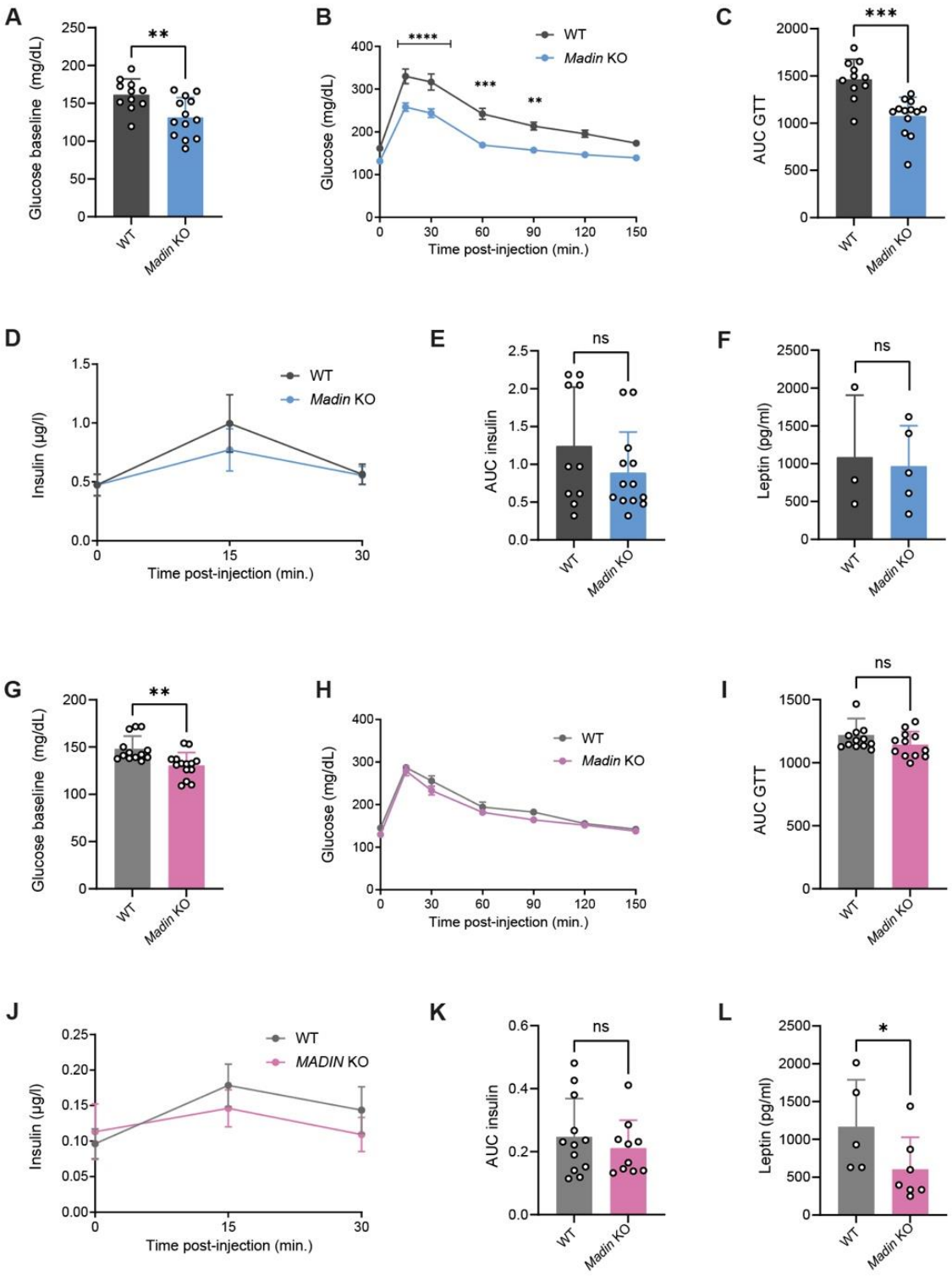

A
Glucose baseline (mg/dL)
**
WT
Madin KO
B
Glucose (mg/dL)
****
***
**
WT
Madin KO
Time post-injection (min.)
C
AUC GTT
***
WT
Madin KO
D
Insulin (µg/l)
WT
Madin KO
Time post-injection (min.)
E
AUC insulin
ns
WT
Madin KO
F
Leptin (pg/ml)
ns
WT
Madin KO
G
Glucose baseline (mg/dL)
**
WT
Madin KO
H
Glucose (mg/dL)
WT
Madin KO
Time post-injection (min.)
I
AUC GTT
ns
WT
Madin KO
J
Insulin (µg/l)
WT
MADIN KO
Time post-injection (min.)
K
AUC insulin
ns
WT
Madin KO
L
Leptin (pg/ml)
*
WT
Madin KO

Figure 5. The combined loss of *Magel2* and *Necdin* alters glucose metabolism in males. (**A, G**) Basal glycemia, (**B, H**) Glucose tolerance tests (GTT), (**C, I**) areas under the GTT curve, (**D, J**) Serum insulin levels during (GTT) and (**E, K**) areas under the curve in (**A-E**) male and (**G-K**) female *Madin* KO and wild-type mice at P130 (n = 11–13 animals per group). (**F, L**) Serum Leptin concentration in (**F**) male and (**L**) female *Madin* KO and wild-type mice at P160-P240 (n = 3–4 animals per group). Data are presented as mean ± SEM. Statistical significance between groups was determined by Mann-Whitney test (A,G,E,I,K,L), or two-way ANOVA with the Geisser-Grennhouse correction following by a Tukey's multiple comparisons test (B,H) or a Sidak's multiple comparisons test (D,J). *$P \leq 0.033$, **$P \leq 0.002$, ***$P \leq 0.0002$., ****$P \leq 0.0001$

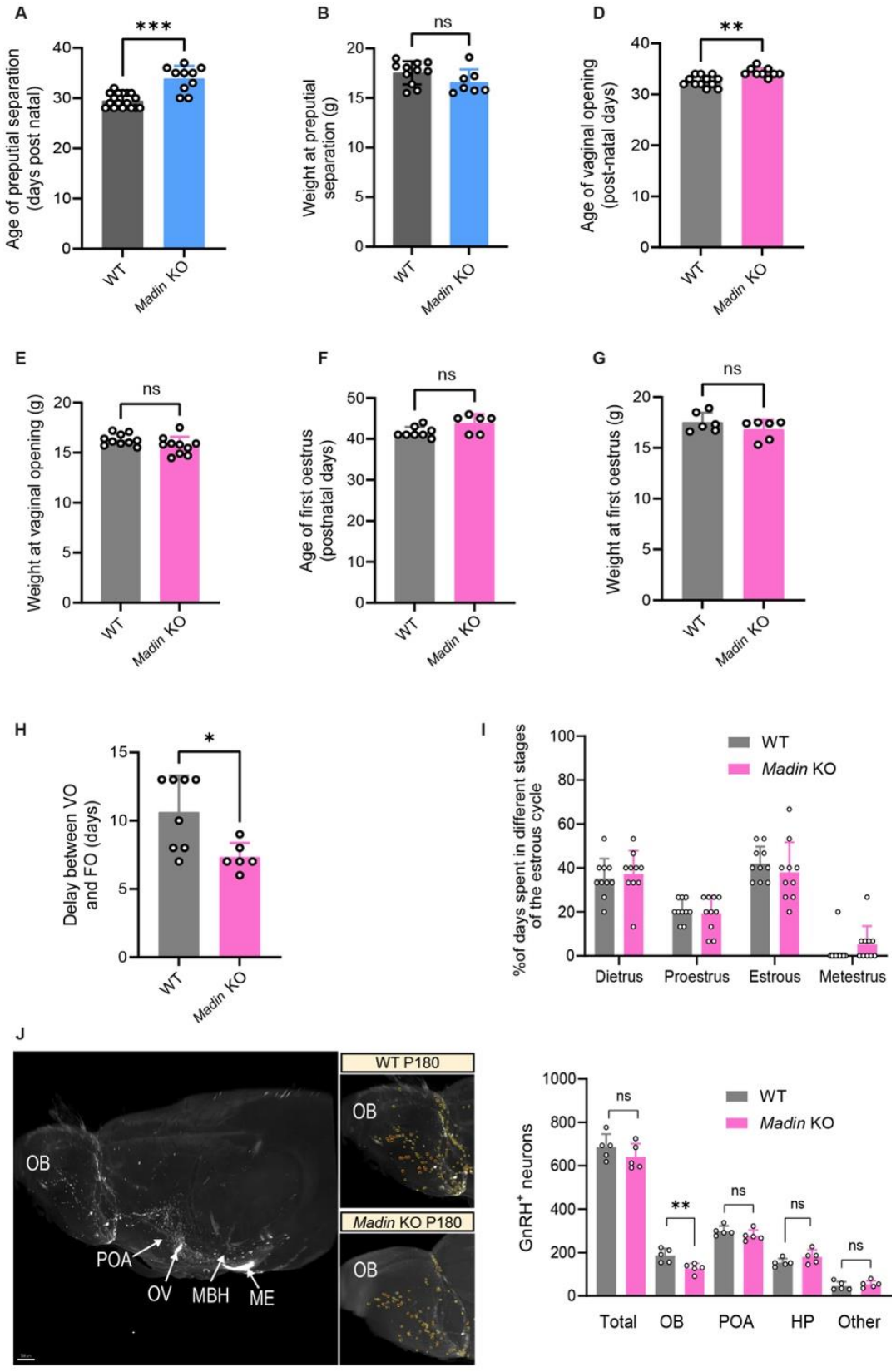

A
***
Age of preputial separation (days post natal)
WT
Madin KO
B
ns
Weight at preputial separation (g)
D
**
Age of vaginal opening (post-natal days)
E
ns
Weight at vaginal opening (g)
F
ns
Age of first oestrus (postnatal days)
G
ns
Weight at first oestrus (g)
H
*
Delay between VO and FO (days)
I
WT
Madin KO
%of days spent in different stages of the estrous cycle
Dietrus
Proestrus
Estrous
Metestrus
J
WT P180
Madin KO P180
OB
POA
OV
MBH
ME
GnRH+ neurons
Total
OB
POA
HP
Other

Figure 6. Delayed the onset of puberty in *Madin* KO mice. (**A**) Age and (**B**) weight of balano-preputial separation in male *Madin* KO or wild-type mice (n = 18-20 animals per group). (**C**) Age and (**D**) weight of vaginal opening, (**E**) age and (**F**) weight of first estrous, (**G**) delay between vaginal opening (VO) and first estrous, and (**H**) percentage of days spent in different stages of the estrous cycle in female *Madin* KO or wild-type mice (n = 10-12 animals per group). (**I**) Representative image of cleared brains and immunolabeling for GnRH quantification of the number of GnRH-immunoreactive neurons in female *Madin* KO or wild-type mice at P180 (n = 5 animals per group). Data are presented as mean ± SEM. Statistical significance between groups was determined using a Mann-Whitney Test (A-J). **P ≤ 0.033., **P ≤ 0.002, ***P ≤ 0.0002., ****P ≤ 0.0001.* MBH, mediobasal hypothalamus, ME, median eminence, OB, olfactory bulb, OV, organum vasculosum of the lamila terminalis, POA, preoptic area

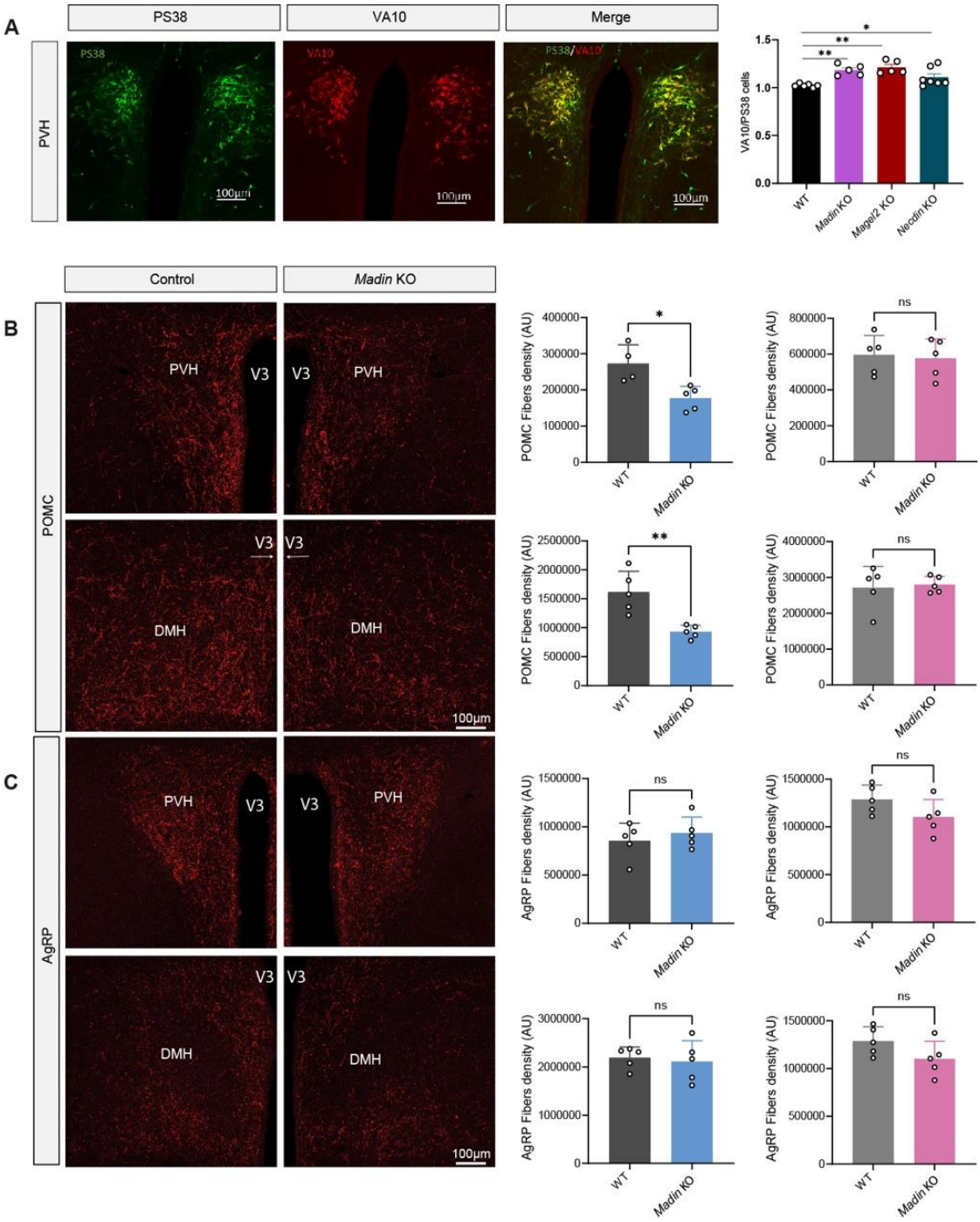

A
PS38
VA10
Merge
PVH
100µm
VA10/PS38 cells
WT
Madin KO
Magel2 KO
Necdin KO
B
Control
Madin KO
POMC
PVH
V3
DMH
100µm
POMC Fibers density (AU)
C
AgRP
AgRP Fibers density (AU)
ns

Figure 7. Disruption of hypothalamic melanocortin circuits in *Madin* KO mice. (**A**) Confocal images and quantification of the ratio of PS38- and VA10-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus (PVH) of P0 *Madin* KO and wild-type mice. (**B-C**) Confocal images and quantification of the density of (**B**) POMC- and (**C**) AgRP-immunoreactive fibers innervating the paraventricular (PVH) and the dorsomedial (DMH) nuclei of the hypothalamus of male (blue) and female (pink) *Madin* KO or wild-type mice at P98 (n = 5 animals per group). Data are presented as mean ± SEM. Statistical significance between groups was determined by a Mann-Whitney Test (B-C) or a Mixed-Effect test (A). *$P \leq 0.033$., **$P \leq 0.002$. Scale bar: 50 μm. V3, third ventricle.

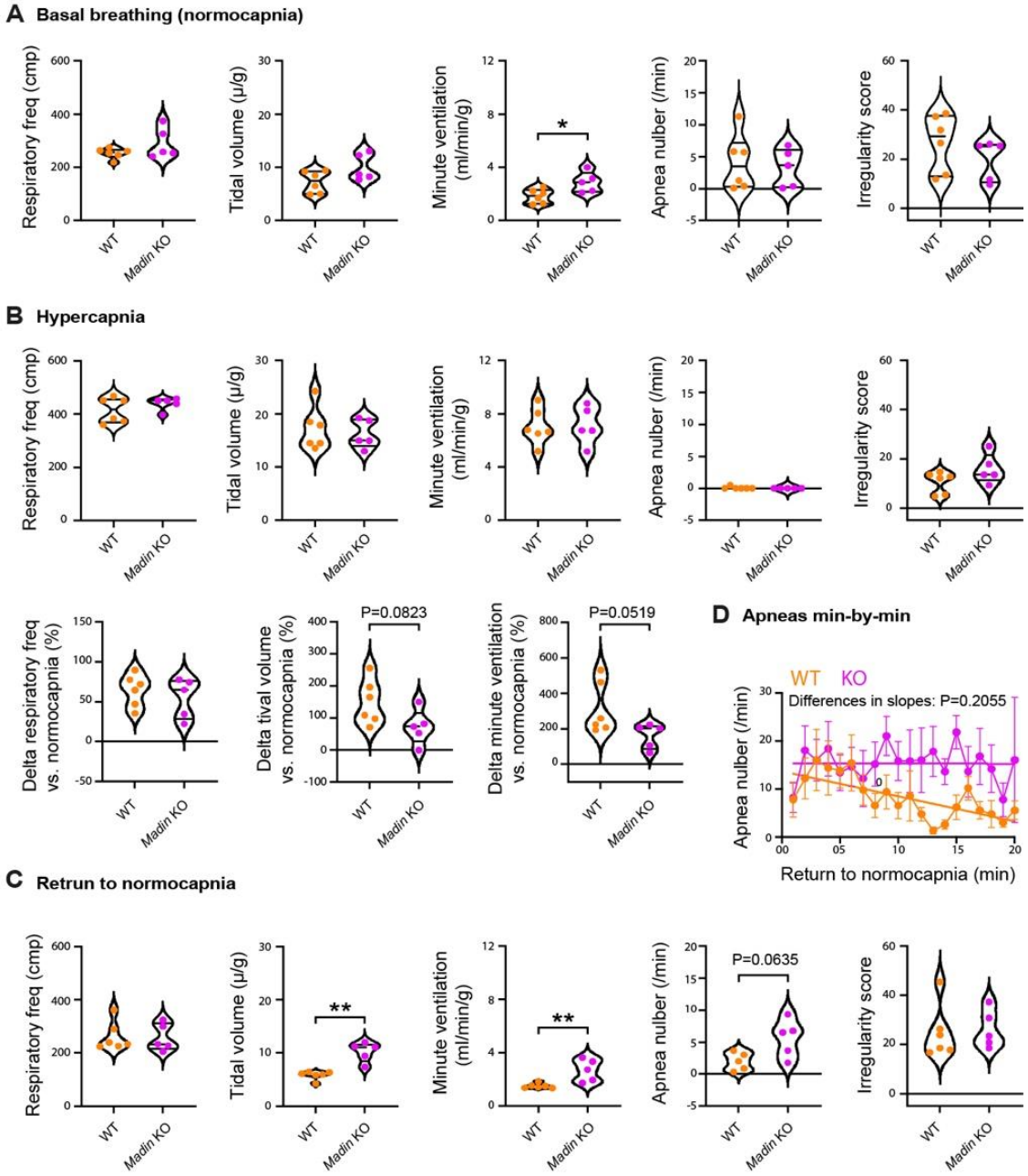


Figure 8. Increased ventilation and post-hypercapnic apneas in *Madin* KO mice. (**A-C**) Analysis of the breathing activity in P30 *Madin* KO (n = 5 animals per group) and WT (n = 6 animals per group) mice using *in vivo* whole-body plethysmography (**A**) during basal conditions (normocapnia) and (**B**) during a 10 min hypercapnic challenge (4% CO_2) and (**C**) during the first 20 min of return to normocapnia following the hypercapnic challenge. (**D**) Analysis of the number of apneas per minute during the first 20 min of return to normocapnia. Statistical significance between groups was determined by a Mann-Whitney Test (A-C) or a Linear fitting with the least squares regression method, extra sum-of-squares F Test to compare slope differences (D). **P* < 0.05., ***P* < 0.001.

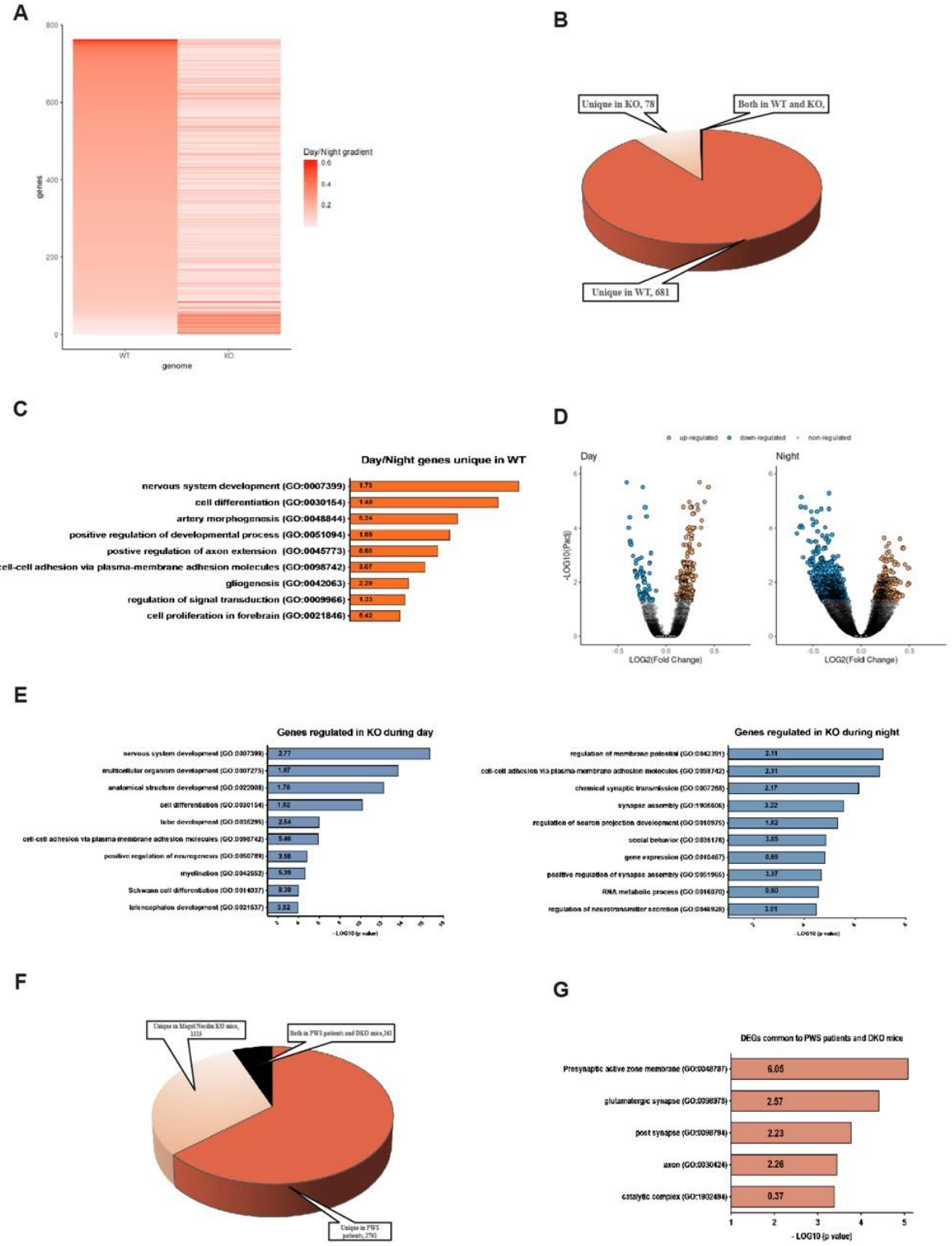

A
genes
Day/Night gradient
genome
WT
KO
B
Unique in KO, 78
Both in WT and KO,
Unique in WT, 681
C
Day/Night genes unique in WT
nervous system development (GO:0007399)
cell differentiation (GO:0030154)
artery morphogenesis (GO:0048844)
positive regulation of developmental process (GO:0051094)
postive regulation of axon extension (GO:0045773)
cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules (GO:0098742)
gliogenesis (GO:0042063)
regulation of signal transduction (GO:0009966)
cell proliferation in forebrain (GO:0021846)
D
up-regulated
down-regulated
non-regulated
Day
Night
-LOG10(Padj)
LOG2(Fold Change)
E
Genes regulated in KO during day
nervous system development (GO:0007399)
multicellular organism development (GO:0007275)
anatomical structure development (GO:0048856)
cell differentiation (GO:0030154)
lung development (GO:0030324)
cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules (GO:0098742)
positive regulation of neurogenesis (GO:0050769)
myelination (GO:0042552)
Schwann cell differentiation (GO:0014037)
telencephalon development (GO:0021537)
- LOG10 (p value)
Genes regulated in KO during night
regulation of membrane potential (GO:0042391)
cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules (GO:0098742)
chemical synaptic transmission (GO:0007268)
synapse assembly (GO:1905606)
regulation of neuron projection development (GO:0010975)
social behavior (GO:0035176)
gene expression (GO:0010467)
positive regulation of synapse assembly (GO:0051965)
RNA metabolic process (GO:0016070)
regulation of neurotransmitter secretion (GO:0046928)
- LOG10 (p value)
F
Unique in Magel/Necdin KO mice, 1335
Both in PWS patients and DKO mice,581
Unique in PWS patients, 2761
G
DEGs common to PWS patients and DKO mice
Presynaptic active zone membrane (GO:0048787)
glutamatergic synapse (GO:0098978)
post synapse (GO:0098794)
axon (GO:0030424)
catalytic complex (GO:1902494)
- LOG10 (p value)

Figure 9. Transcriptomic analysis of genes that are dysregulated in the hypothalamus of *Madin* KO mice. (**A**) Heat maps representing the gradient of change (as the absolute value of Log2 fold change) between day and night for all expressed genes in wild-type (WT, left part) and for corresponding genes displayed in the same order in *Madin* KO mice (right part) at P70-P98 (n = 5 animals per group). (**B**) Impact of Magel2+Necdin double deletion on differentially day/night expressed genes. 681 genes differentially expressed between day and night in WT lose their differential day/night expression in KO (Unique in WT, 90%), while 78 genes acquire a *de novo* day/night difference in expression (Unique in KO, 10%). Only two genes display a differential day/night expression in both mouse lineages (Both in WT and KO). (**C**) Functional characterization by Panther Analysis of genes belonging to the category "Unique in WT" showing the top 10 Gene Ontology biological processes with the highest *p* value. The numbers inside the columns correspond to the fold enrichment. (**D**) Volcano plots illustrating up-regulated (orange points) and down-regulated (blue points) genes in *Madin* KO *versus* WT mice during the day (left part) and during the night (right part). During the day, 74% of genes are up-regulated in *Madin* KO mice while 68% are down-regulated during night. (**E**) Functional characterization by Panther Analysis of genes impacted in *Madin* KO mice during the day (left part) and during the night (right part) showing the top 10 Gene Ontology biological processes with the highest *p* value. The numbers inside the columns correspond to the fold enrichment. (**F**) Diagram showing genes that are commonly dysregulated in the hypothalamus of *Madin* KO mice and patients with PWS (Bochukova et al., 2018), genes that are uniquely dysregulated in *Madin* KO mice, and genes that are uniquely dysregulated in patients with PWS. (**G**) Functional characterization by Panther Analysis of genes commonly impacted in the hypothalamus of *Madin* KO mice and PWS patients showing the top 5 Gene Ontology biological processes with the highest *p* value.

Supplemental Table 1. Commonly dysregulated genes in both *Madin* KO mice and PWS patients

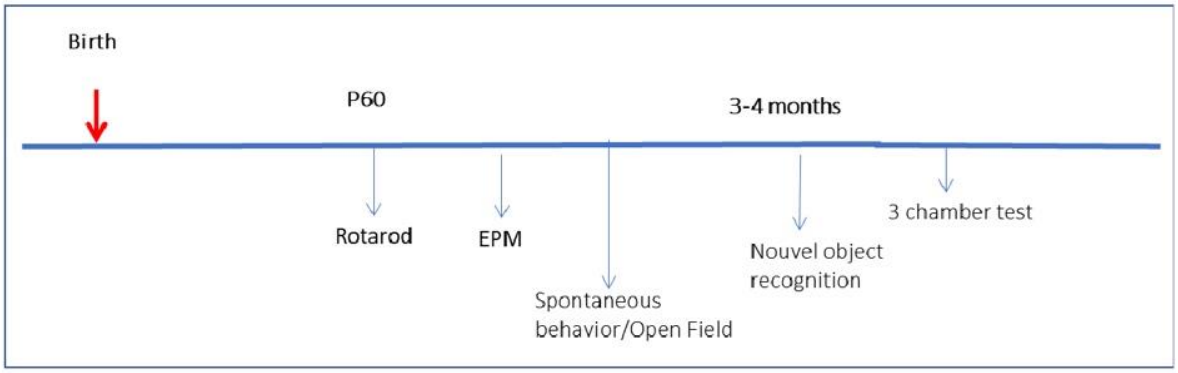
DAY TF in DKO mice (27 items)	Night TF in DKO mice (69 items)	TF common in DEGs in PWS (Cell Report) and Day TF in DKO mice (7 items)	TF common in DEGs in PWS (Cell Report) and Night TF in DKO mice (15 items)
AHDC1	AEBP1	Egr3	Aebp1
CIC	ALX3	Fosl2	Alx3
EGR3	ARID5B	Gli1	Arid5b
FOSB	ARNT	Hif3a	Etv6
FOSL2	ARNTL	Prr12	Jund
FOXB1	ARX	Rfx5	Klf8
FOXK1	ATF1	Sox9	Klf9
GLI1	BAZ2B		Npas2
HES5	BHLHE41		Pbx1
HEYL	BNC2		Prox2
HIF3A	EBF1		Rfx4
HLF	ESRRA		Scml4
KMT2B	ESRRG		Smad3
MEF2D	ETV6		Tbx15
NFIX	FLI1		Zbtb20
NR2F6	FLYWCH1		
OTP	FOXP1		
PRR12	GTF3A		
RAX	HDX		
RFX5	IRF2		
SALL1	JAZF1		
SIX3	JUND		
SOX9	KLF12		
SREBF1	KLF8		
UNCX	KLF9		
XBP1	LCORL		
ZKSCAN2	LIN28B		
	MAF		
	MBD2		
	MBD3		
	MEF2C		
	NFIA		
	NPAS2		
	NPAS3		
	NR1D1		
	NR3C2		
	NR6A1		
	NRF1		
	PBX1		

DAY TF in DKO mice (27 items)	Night TF in DKO mice (69 items)	TF common in DEGs in PWS (Cell Report) and Day TF in DKO mice (27 items)	TF common in DEGs in PWS (Cell Report) and Night TF in DKO mice (69 items)
	PRDM5		
	PRDM6		
	PRMT3		
	PROX2		
	PRRX2		
	RBPJ		
	RFX4		
	RREB1		
	SCMH1		
	SCML4		
	SETBP1		
	SMAD3		
	SMYD3		
	SOX5		
	SP8		
	TBX15		
	TCF7L1		
	TEAD1		
	TERF1		
	TET2		
	THRB		
	TSHZ2		
	ZBTB20		
	ZBTB7C		
	ZEB1		
	ZFHX3		
	ZFPM2		
	ZMAT1		
	ZMAT4		
	ZUP1		

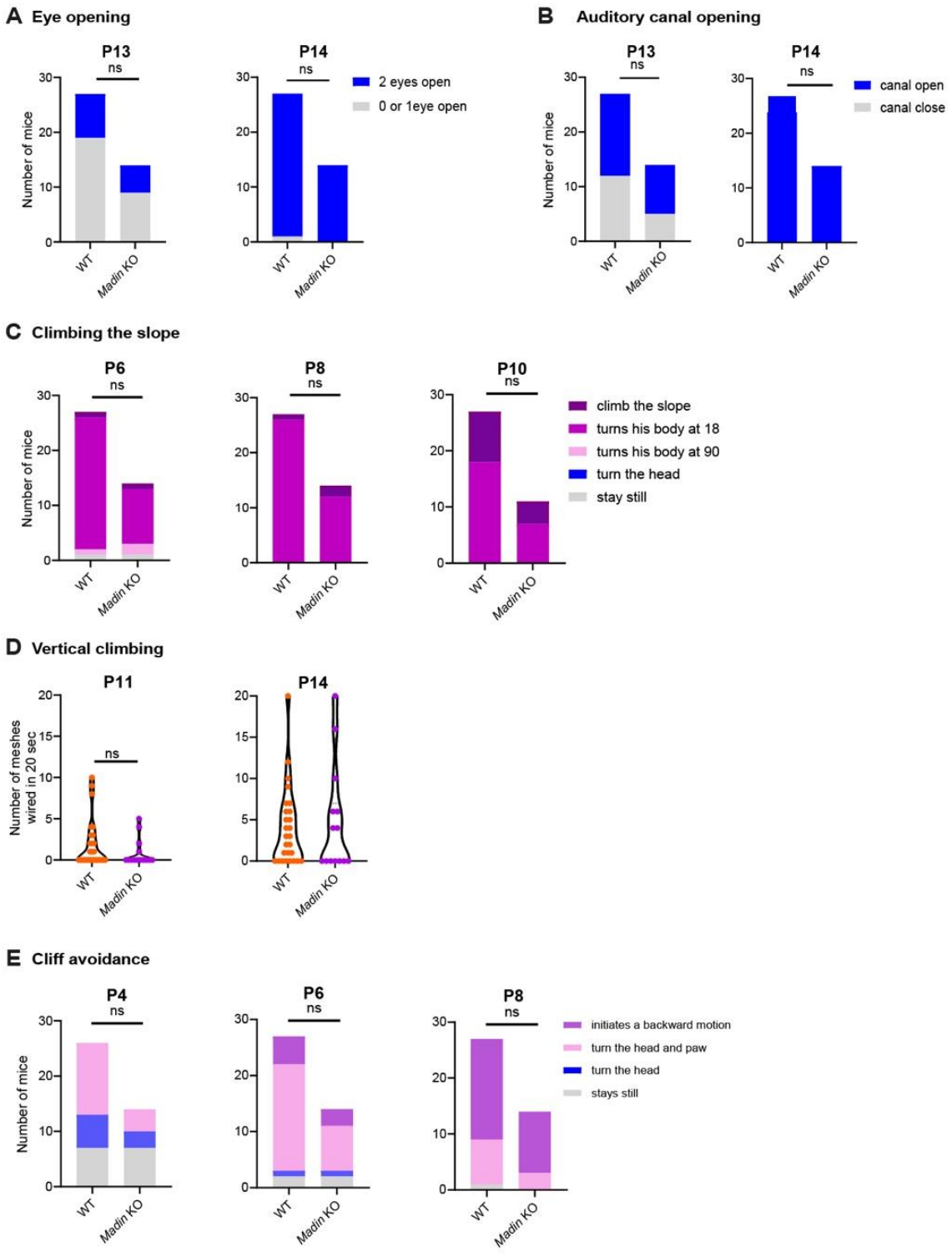
A **Tests measuring Preweaning Sensorial and Motor Development**
Adapted from L. Roubertoux et al. (2018)

	PD 1	PD 2	PD 3	PD 4	PD 5	PD 6	PD 7	PD 8	PD 9	PD 10	PD 11	PD 12	PD 13	PD 14	PD 15
Righting response			X	X	X	X	X	X	X						
Cliff avoidance			X	X	X	X	X	X							
Adult paw position					X	X	X	X	X	X					
Adult walking pattern						X	X	X	X	X					
Reaction to slope						X	X	X	X	X					
Rooting reflex							X	X	X	X	X	X	X	X	
Vertical climbing									X	X	X	X	X	X	
Climb the slope						X	X	X	X	X					
Bar holding										X	X	X	X	X	
Eyelid opening														X	X
Opening auditory canal														X	X

B **Tests measuring behavior at adulthood**

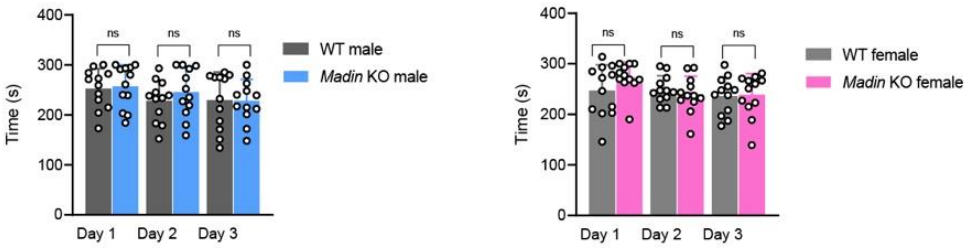


Supplemental Figure 1. Behavioral study paradigm. (**A**) Table listing the eleven tests performed to evaluate preweaning sensorial and motor development in *Madin* KO and WT pups between postnatal day (P)3 and P15. (**B**) Timeline of behavioral tests perform in adult *Madin* KO and WT mice. **P*<0.05, ***P*<0.01.

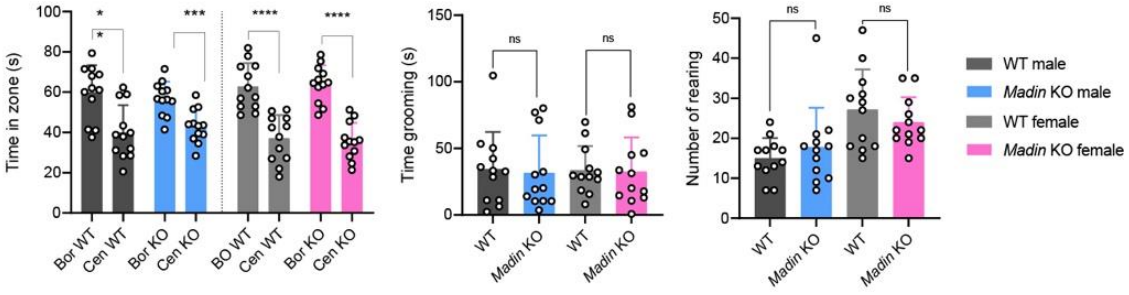

A Eye opening
P13
ns
P14
ns
2 eyes open
0 or 1eye open
Number of mice
WT
Madin KO
B Auditory canal opening
P13
ns
P14
ns
canal open
canal close
C Climbing the slope
P6
ns
P8
ns
P10
ns
climb the slope
turns his body at 18
turns his body at 90
turn the head
stay still
D Vertical climbing
P11
ns
P14
Number of meshes wired in 20 sec
E Cliff avoidance
P4
ns
P6
ns
P8
ns
initiates a backward motion
turn the head and paw
turn the head
stays still

Supplemental Figure 2: Behavioral tests performed in the two first weeks of postnatal life in *Madin* KO and WT mice. (**A**) Number of pups displaying eye opening and (**B**) auditory canal opening at P13 and P14 (n = 14-27 animals per group). (**C**) Climbing 30° slope test in pups at P6, P8, and P10 and (**D**) vertical climbing test in pups at P11 and P14 (n = 14-27 animals per group). (**E**) Cliff avoidance test in pups at P4, P6, and P8. Statistical significance between groups was determined by a Chi^2 test (A,B,C,E), or a Mann-Whitney test (D).

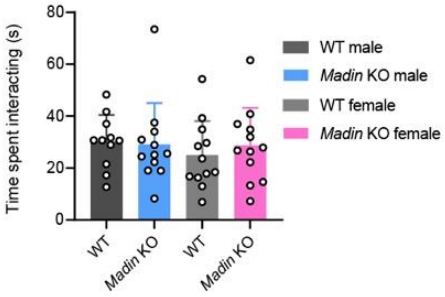
A **Rotarod**



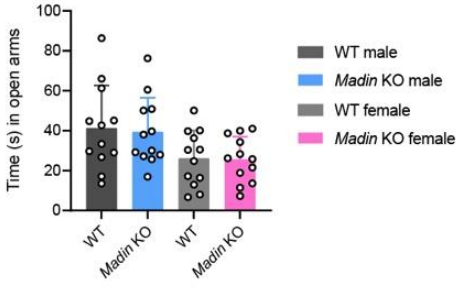
C **Open Field**



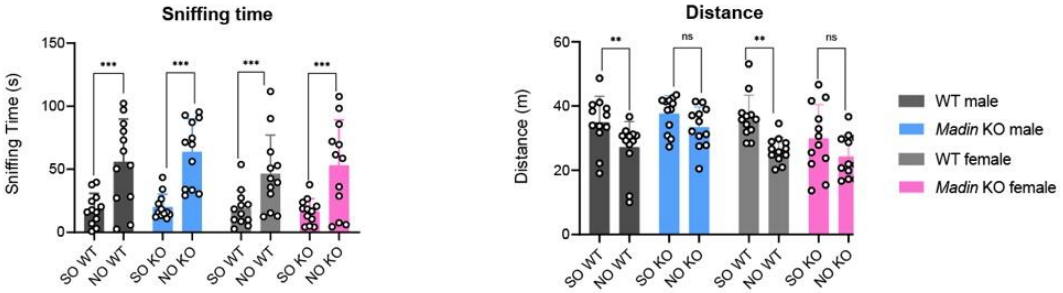
D **Spontaneous social interaction**



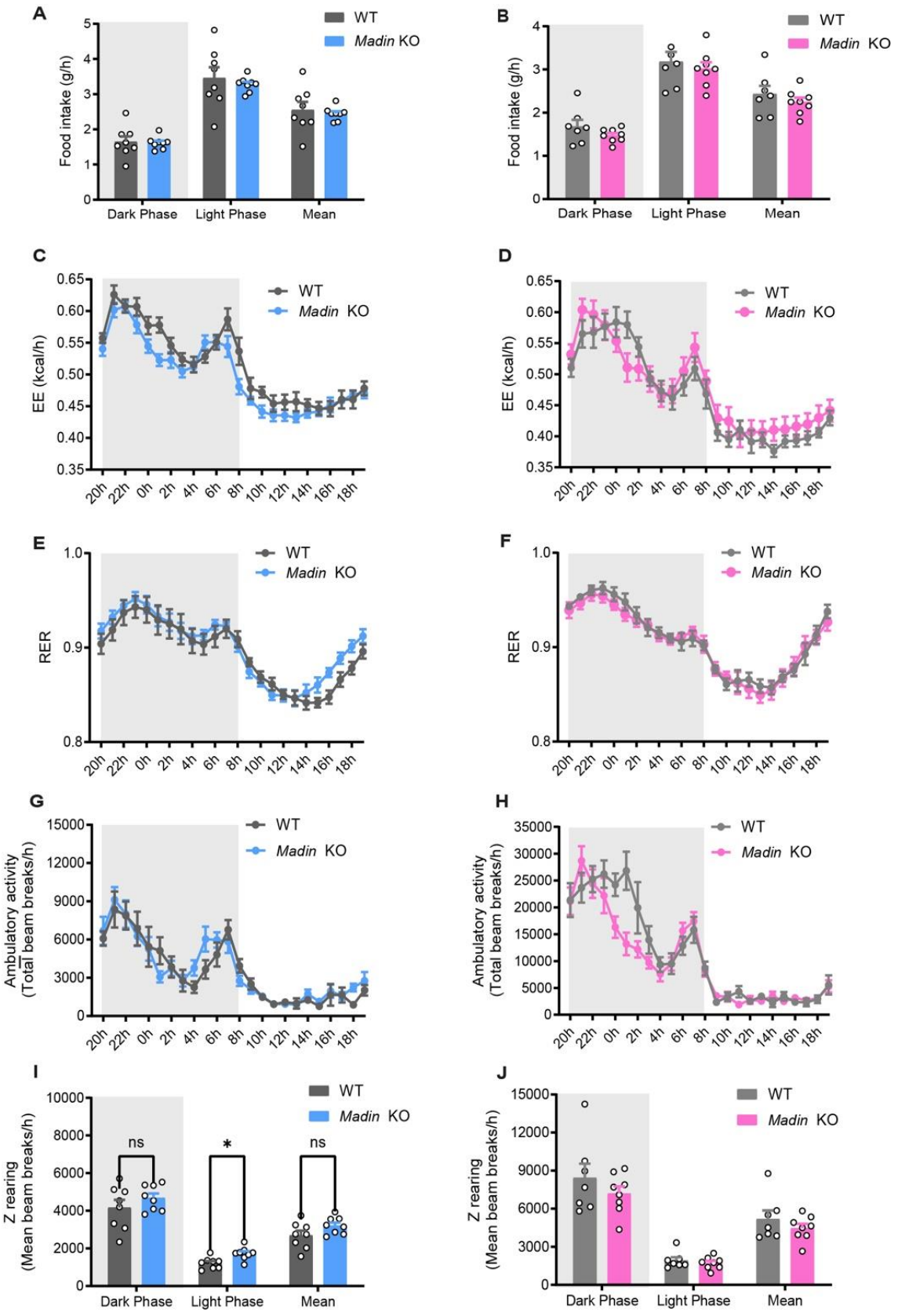
B **Elevated plus maze**



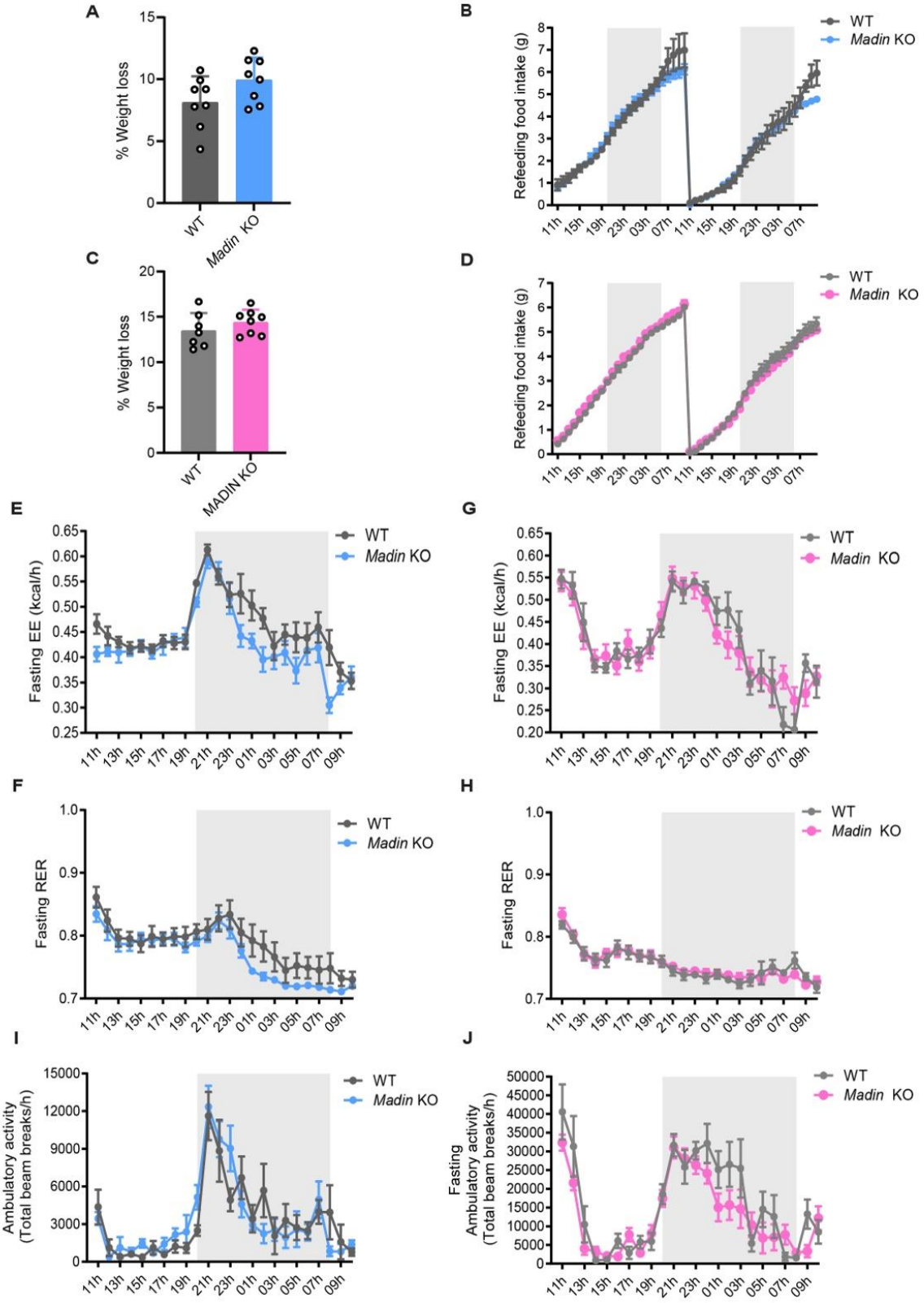
E **Novel Object Recognition**



Supplemental Figure 3. Motor ability and spontaneous, anxiety and social behaviors in adult *Madin* KO and WT mice. (**A**) Rotarod, (**B**) open field, (**C**) spontaneous interaction, (**D**) elevated plus maze, and object recognition tests in adult WT and *Madin* KO mice (n = 12 animals per group). Data are presented as mean ± SEM. Statistical significance between groups was determined by a two-way repeated measures ANOVA (A), a Mann-Whitney test (B,C,D), or a Wilcoxon matched pairs test (E). **P* < 0.05, ***P* < 0.01.


A
Food intake (g/h)
WT
Madin KO
Dark Phase
Light Phase
Mean
B
Food intake (g/h)
WT
Madin KO
Dark Phase
Light Phase
Mean
C
EE (kcal/h)
WT
Madin KO
20h 22h 0h 2h 4h 6h 8h 10h 12h 14h 16h 18h
D
EE (kcal/h)
WT
Madin KO
20h 22h 0h 2h 4h 6h 8h 10h 12h 14h 16h 18h
E
RER
WT
Madin KO
20h 22h 0h 2h 4h 6h 8h 10h 12h 14h 16h 18h
F
RER
WT
Madin KO
20h 22h 0h 2h 4h 6h 8h 10h 12h 14h 16h 18h
G
Ambulatory activity (Total beam breaks/h)
WT
Madin KO
20h 22h 0h 2h 4h 6h 8h 10h 12h 14h 16h 18h
H
Ambulatory activity (Total beam breaks/h)
WT
Madin KO
20h 22h 0h 2h 4h 6h 8h 10h 12h 14h 16h 18h
I
Z rearing (Mean beam breaks/h)
WT
Madin KO
ns
*
ns
Dark Phase
Light Phase
Mean
J
Z rearing (Mean beam breaks/h)
WT
Madin KO
Dark Phase
Light Phase
Mean

Supplemental Figure 4. *Madin* KO mice display normal regulation of energy balance. (**A, B**) Food intake, (**C, D**) energy expenditure, (**E, F**) respiratory exchange ratio (RER), (**G, H**) spontaneous locomotor activity (xy), and (**I, J**) number of z-rearing in (**A, C, E, G, I**) male and (**B, D, F, H, J**) female *Madin* KO and wild-type mice at P180 (n = 7-8 animals per group). Data are presented as mean ± SEM. Statistical significance between groups was determined by a Mann-Whitney test (A,B,I,J), a 2-way ANOVA followed by an uncorrected Fisher's least significant difference (LSD) test (C,D,E,F,G,H). *$P \leq 0.05$.


A
% Weight loss
WT
Madin KO
B
Refeeding food intake (g)
WT
Madin KO
C
% Weight loss
WT
MADIN KO
D
Refeeding food intake (g)
WT
Madin KO
E
Fasting EE (kcal/h)
WT
Madin KO
G
Fasting EE (kcal/h)
WT
Madin KO
F
Fasting RER
WT
Madin KO
H
Fasting RER
WT
Madin KO
I
Fasting Ambulatory activity (Total beam breaks/h)
WT
Madin KO
J
Fasting Ambulatory activity (Total beam breaks/h)
WT
Madin KO

Supplemental Figure 5. Normal response to fasting and refeeding in *Madin* KO mice. (**A, C**) % weight loss after fasting, (**B, D**) cumulative food intake after refeeding, (**E, G**) energy expenditure during fasting, **(F, H)** respiratory exchange ratio (RER) during fasting, (**I, J**) spontaneous locomotor activity (xy), in (**A, B, E, F, I**) male and (**C, D, G, H, J**) female *Madin* KO and wild-type mice at P180 (n = 7-8 animals per group). Data are presented as mean ± SEM. Statistical significance between groups was determined by a Mann-Whitney test (A,B), a 2-way ANOVA followed by an uncorrected Fisher's least significant difference (LSD) test (B-J).

Résultats remarquables

Les principaux résultats de notre étude sur le nouveau modèle murin double KO *Madin* peuvent être listés de la façon suivante :

- Régulation génique et fonctionnelle :

Les gènes *Magel2* et *Necdin* sont co-régulés dans l'espace et le temps au sein de l'hypothalamus en développement, partageant un activateur commun et montrant un chevauchement partiel de leurs fonctions.

La perte de fonction de *Magel2* entraîne une surexpression de *Necdin* et inversement, suggérant une compensation fonctionnelle qui pourrait atténuer les symptômes observés dans ces modèles par rapport au syndrome de Prader-Willi complet.

- Phénotypes observés :

Létalité : Le nouveau modèle de souris *Madin* KO présente une létalité périnatale variable en fonction des conditions sanitaire d'hébergement (0-60%) durant les premiers jours de vie. La létalité mesurée est due à des difficultés respiratoires et des déficits alimentaires, récapitulant ainsi les phénotypes des souris KO pour *Necdin*$^{tm1\text{-}Mus}$ et *Magel2*$^{tm1\text{-}Mus}$ ainsi que l'insuffisance respiratoire qui est la cause la plus fréquente de décès chez les nourrissons atteint du SPW (73 %) (Butler et al., 2017).

Comportement : Les souriceaux *Madin* KO montrent un retard de maturation sensorielle (tactile et proprioceptive) sans déficit des capacités motrices, et même une augmentation de la force musculaire. Les souris *Madin* KO adultes présentent des déficits de sociabilité et un moindre intérêt pour la nouveauté.

Métabolisme : Conformément aux difficultés alimentaires périnatales, les jeunes souris *Madin* KO développent un retard de croissance, avec un poids et une taille réduite (ce dernier seulement chez les souris femelles). À l'âge adulte, ils ne développent pas d'obésité mais au contraire présentent un poids corporel plus faible associé à une réduction de la masse grasse (chez les souris mâles). Les souris *Madin* KO mâles répondent également mieux à un bolus hyperglycémique sans hyper-insulinémie.

Reproduction : La puberté est retardée chez les souris *Madin* KO mâles et femelles. Cependant, les cycles œstraux des souris *Madin* KO femelles sont normaux.

Neuroanatomie : Une accumulation de la forme intermédiaire de l'ocytocine est observée chez les souris *Madin* KO, similaire à celle des modèles simples KO. La densité des fibres immunoréactives pour la POMC est altérée dans le PVH et le DMH des souris *Madin* KO mâles, mais pas chez les souris femelles, similaire à ce qui a été observé dans le modèle Magel2-ko. Une diminution du nombre de neurones à GnRH dans les bulbes olfactif a aussi été observée. Une diminution qui fait échos, bien que différente, à la diminution globale du nombre de neurones GnRH retrouvée dans le cerveau du modèle *Necdin* KO (Miller et al., 2009).

Expression génique : L'étude transcriptomique à partir d'hypothalamus de souris *Madin* KO a identifié des modifications significatives de l'expression génique : 68 gènes étaient régulés à la baisse et 193 à la hausse. Ces gènes sont impliqués dans divers processus biologiques tels que le développement du système nerveux, la différenciation cellulaire, l'adhésion cellule-cellule, et la régulation de l'horloge circadienne. De plus 681 des 683 gènes qui présentent normalement une variation jour/nuit perdent cette variation et 78 gènes acquièrent une variation jour/nuit dans l'hypothalamus des souris *Madin* KO, indiquant une perturbation des rythmes circadiens. De manière intéressante, certains de ces gènes montrent une régulation similaire chez l'humain, suggérant une conservation des mécanismes pathologiques entre notre modèle murins et les patients humain.

En conclusion, nous avons démontré que le modèle de souris *Madin* KO présente non seulement une fiabilité génétique et phénotypique accrue, mais aussi une pertinence supérieure pour l'étude du SPW par rapport aux modèles simples de KO de *Necdin* ou *Magel2*. Les phénotypes observés chez nos souris *Madin* KO couvrent une large gamme de symptômes précoces du SPW, étroitement alignés avec ceux observés chez les patients. De plus La concordance entre les dérégulations de l'expression génétique observées dans notre modèle *Madin* KO et celles chez les patients atteints de SPW renforce l'utilité de ce modèle pour comprendre les mécanismes de la maladie. A ce jour, les souris *Madin* KO sont actuellement le modèle le plus approprié et le plus pertinent pour étudier le SPW (Figure 14).

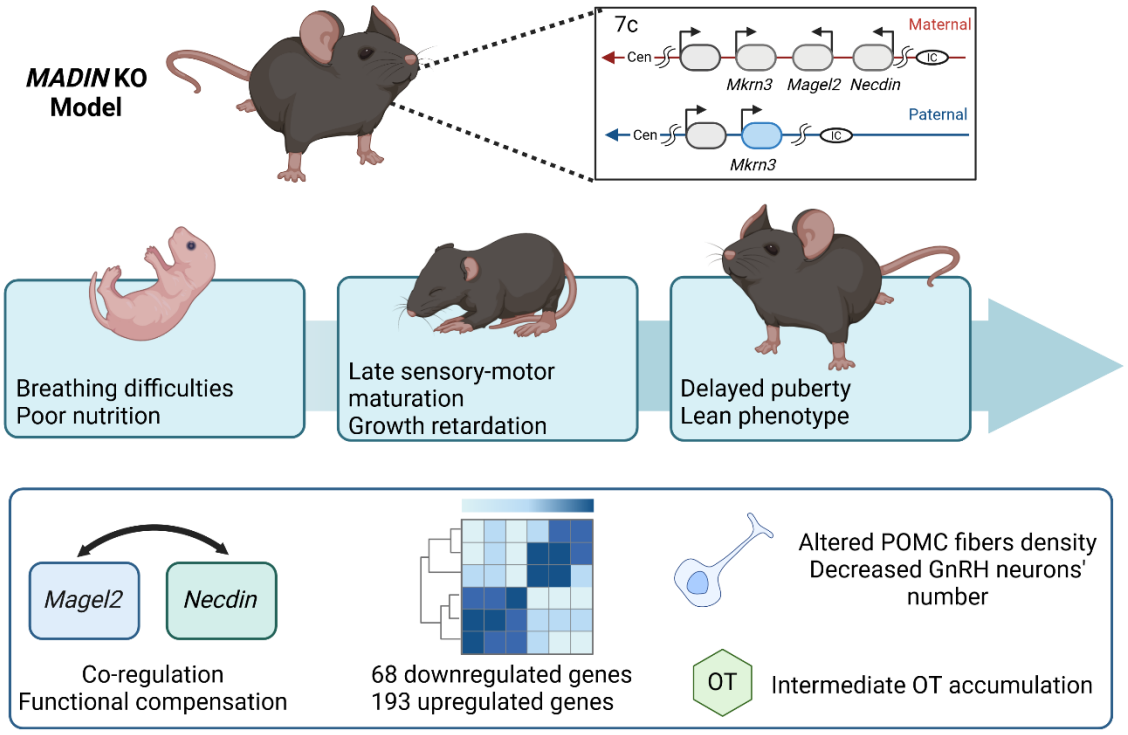


Figure 14 : Représentation graphique des conclusions de l'article 1. Le nouveau modèle *Madin* KO, combinant la perte de fonction des gènes Magel2 et Necdin, s'affranchie de la redondance fonctionelle de ces deux gènes et exprime une large gamme de symptômes précoces du SPW, étroitement alignés avec ceux observés chez les patients. Il constitue aujourd'hui le modèle le plus approprié et le plus pertinent pour étudier le SPW.

2. La libération vésiculaire de l'ocytocine favorise le développement du circuit mélanocortinergique au cours d'une période critique néonatale

Préambule

Les résultats liés à mon second objectif sont développés dans cette partie. Ils ont consistés à étudier le rôle de l'ocytocine (OT) durant des périodes critiques de la vie sur le développement du système mélanocortinergique et les mécanismes sous-jacents de cet effet.

Comme observé précédemment, des dérégulations du système à OT ont été observées tant chez les patients atteints du SPW ainsi que dans les modèles murins correspondants. Les données de la littérature suggèrent un effet bénéfique du traitement à l'OT sur la régulation de l'appétit, surtout lorsque cette neurohormone est administrés tôt dans la vie. Chez la souris, une administration sous-cutanée unique d'OT juste après la naissance rétablit une succion normale chez les petits *Magel2*$^{tm1.1Mus}$. L'OT sous sa forme mature est exprimée uniquement à la naissance, une période qui coïncide avec le développement des projections du système mélanocortinergique. Nous proposons donc que l'OT puisse servir de modulateur neurodéveloppemental crucial pendant une période critique du développement postnatale sur le système mélanocortinergique.

Pour valider notre hypothèse, nous avons réalisé une série d'expériences sur quatre modèles murins complémentaires. Le premier modèle, basé sur le récepteur DREADDi, nous a permis d'inhiber les neurones à OT durant trois périodes du développement postnatal : néonatale (P0-P7), juvénile (P25-P32) et adulte (P63-P70), afin de confirmer l'existence d'une période postnatale critique durant laquelle l'OT est susceptible de jouer un rôle dans le développement du système mélanocortinergique. Compte tenu de l'approche générale du modèle DREADDi, qui inhibe la sécrétion active ainsi que la libération de facteurs diffusibles, les effets observés pourraient être attribuables à d'autres éléments libérés par les neurones à OT. Pour compléter notre premier modèle, nous avons intégré les modèles suivants :

- Un modèle *nNOS* KO, qui nous permet de déterminer si les effets neurodéveloppementaux observés sont dus à la sécrétion de NO par les neurones à OT.
- Un modèle génétique d'expression de la toxine botulique dans les neurones à OT, iBOT (*Ot-Cre::BoNT/B*), afin de déterminer si les effets observés sont dus à la libération par exocytose.

- Un modèle pharmacologique d'inhibition des neurones à OT (OTRA) pour confirmer le rôle de la signalisation OT via son récepteur dans le développement du système mélanocortinergique.

Les neurones à OT sont hypo-actifs dans les modèles *Magel2*$^{tm1.1Mus}$ du SPW, qui présentent également des altérations du système mélanocortinergique. Nous nous sommes demandé si l'activation chémogénétique, via le recepteur DREADDq, de ces neurones durant la période postnatale précoce pourrait compenser cette diminution d'activation et permettre une restauration des projections mélanocortinergiques.

Cette étude est également le fruit d'une collaboration avec l'équipe du Docteur Françoise Muscatelli. Françoise Muscatelli et Fabienne Schaller ont généré et traité les trois cohortes DREADDi et la cohorte DREADDq. Pour ma part, je me suis chargé de générer les modèles *nNOS* KO, iBOT et d'inhibition pharmacologique. Soyoung Park a réalisé les études *in vitro*. J'ai réalisé l'ensemble des études neuroanatomiques, RNAscope et métaboliques présentées par la suite. Ce travail fait l'objet d'une publication dans laquelle je suis le premier auteur.

À travers cette étude, nous espérons mettre en lumière un nouveau rôle neurodéveloppemental pour l'OT, et ainsi améliorer notre compréhension des mécanismes sous-jacents liant les dysfonctions du système ocytocinergique durant les périodes critiques du développement aux dysfonctionnements développementaux des réseaux centraux régulant la prise alimentaire.

Vesicle-mediated Oxytocin Release Promotes the Development of Melanocortin Circuits during a Neonatal Critical Period

Pierre-Yves Barelle[1,2], Fabienne Schaller[3], Soyoung Park[4], Emilie Caron[1,2], Jessica Klucznik[1,2], Phillipe Ciofi[5], Françoise Muscatelli[3], Sebastien G Bouret[1,2*]

[1] *Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Lille Neuroscience and Cognition, UMR-S 1172, Lille F-59000, France*

[2] *FHU 1000 Days for Health, School of Medicine, Lille F-59000, France*

[3] *Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED), INSERM, Aix Marseille Université, Marseille, France*

[4] *Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, USA*

[5] *Inserm, U1215, Neurocentre Magendie, Université de Bordeaux, Bordeaux F-33077, France*

***Contact information:** Sebastien G. Bouret (sebastien.bouret@inserm.fr)

Abstract

The hypothalamus plays a critical role in regulating essential bodily functions, including energy balance. It is an exceedingly complex and heterogeneous structure that contains a variety of neuronal systems that are interconnected with each other. In particular, the melanocortin system, which consists of pro-opiomelanocortin (POMC)-containing neurons and neurons producing agouti-related peptide (AgRP), display a remarkable anatomical relationship with oxytocin (OT) neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH). Here, we show that oxytocin neurons play a role in the development of the melanocortin system. Chemogenetic inhibition of OT neurons during the first week of postnatal life disrupts the development of POMC and AgRP projections specifically to the PVH without affecting the innervation of other target nuclei. Notably, silencing OT-containing neurons during juvenile or adult stages does not impact melanocortin circuits, suggesting that OT neurons play a developmental role in POMC and AgRP projections during a neonatal critical period. OT neurons produce various neuropeptides and neurotransmitters, which can be targeted through chemogenetic manipulation. The genetic expression of the botulinum toxin serotype B light chain in OT-expressing neurons reveals that the developmental actions of OT neurons depend on SNARE-mediated exocytosis. Additionally, administering an OT receptor antagonist during the first postnatal week results in similar defects in the development of melanocortin circuits associated with long-term effects on metabolism. These findings demonstrate that OT functions as a paracrine neurotrophic factor, coordinating the development of melanocortin circuits during a restricted neonatal critical period.

Introduction

The hypothalamus is an exceedingly complex brain region that is critical to vital functions. It contains a variety of neuronal systems that must be organized in defined circuits to ensure body homeostasis in response to changes in internal and environmental conditions. The hypothalamic melanocortin system plays a particularly important role in regulating energy balance and adiposity. It is composed of neurons that produce alpha-melanocyte-stimulating hormone (α-MSH), a peptide derived from pro-opiomelanocortin (POMC), and neurons that contain agouti-related peptide (AgRP), an endogenous inverse agonist at α-MSH receptors. POMC neurons exhibit anorexigenic effects, whereas AgRP neurons display orexigenic effects. Both neuronal populations are predominantly located in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) and send axonal projections to other hypothalamic nuclei, including the paraventricular nucleus (PVH) (Sawchenko and Swanson 1982). The PVH is strategically located to integrate hormonal and neural information. It sends axonal outputs to various brain structures and the posterior pituitary to control behaviors and bodily functions. Distinct PVH cell types integrate melanocortin's signal to regulate feeding behavior and energy balance, including neurons producing oxytocin (OT) (Atasoy et al. 2012). Initially identified as a hormone influencing parturition and lactation, OT is now recognized for its broader pleiotropic effects, influencing behavioral and physiological functions ranging from social interaction to stress response and metabolic regulation (Hurlemann and Grinevich 2018).

Optimal hypothalamic function depends on the establishment of its complex neuronal connectivity during development. In rodents, melanocortin circuits develop during the first two postnatal weeks (Bouret, Draper, and Simerly 2004a; Grove et al. 2003). The development of OT neurons precedes that of melanocortin circuits (Bouret and Muscatelli 2021), suggesting that it could play a key role in the development and functional integration of POMC and AgRP axonal projections. This hypothesis is supported by evidence showing OT's involvement in brain maturation. For example, OT triggers an excitatory-to-inhibitory switch of GABA actions in the fetal hippocampus shortly before birth (Tyzio et al. 2006). Moreover, OT influences the formation and refinement of neural circuits within the amygdala with long-term effects on emotional regulation and social behavior (Knoop et al. 2022). In addition, evidence suggests that OT may exert enduring neurobehavioral effects when administered during early life. For example, a single administration of OT at birth corrects suckling deficits in the *Magel2* KO mouse model of Prader-Willi Syndrome (Schaller et al. 2010). Also, neonatal OT treatment in

the same mouse model causes long-term beneficial effects on social behavior and learning, whereas adult treatment has only a transient effect (Meziane et al. 2015).

In the present paper, we investigated the importance of OT neurons in the development of melanocortin circuits. Our findings demonstrate that temporarily silencing OT-producing neurons during the initial week after birth leads to enduring alterations in the connectivity between both POMC and AgRP neurons and the PVH. We further establish that the developmental influence of OT neurons on melanocortin circuits is facilitated through SNARE-mediated exocytosis and necessitates the binding of OT to its receptor. Additionally, our research reveals that chemogenetically stimulating OT neurons can rescue the abnormal development of POMC circuits in *a* mouse model of Prader-Willi Syndrome (PWS). This research underscores the significance of OT signaling during early life stages in shaping neural networks essential for metabolic regulation.

Results

Close anatomical association between POMC and AgRP fibers and oxytocin neurons in the paraventricular nucleus

ARH projections are largely intrahypothalamic, with a great density of fibers and terminals found in the PVH (Bouret, Draper, and Simerly 2004a). We used a three-dimensional proximity analysis of POMC- and AgRP-immunoreactive fibers to investigate their spatial relationships with OT neurons in the PVH. We found that POMC and AgRP axons converge preferentially on OT cell bodies and processes **(Figure 1 A,C)**. Nearly 75% of POMC- and AgRP-immunoreactive fibers found in the PVH are located within 12 µm of OT-positive neurons **(Figure 1 B,D)**. Strikingly, the presence of POMC and AgRP fibers was mainly observed in the ventral portion of the PVH, where OT neurons are predominantly located, leaving a central zone within the PVH partially devoid of fibers **(Figure 1 A)**. This distinctive arrangement of POMC and AgRP fibers towards OT neurons suggests that OT may act as a neurotrophic factor to direct POMC and AgRP fivers toward their direction.

Neonatal chemogenetic inhibition of oxytocin neurons disrupts melanocortin circuits

To examine whether OT-containing neurons influence the development of melanocortin circuits, we first developed a transgenic mouse model in which OT neurons are chemogenetically inhibited by crossing *Ot*-Cre mice with Rosa-CAG-LSL-HA-hM4Di-p2a-mCitrine mice **(Figure 2A)**. We confirmed that the inhibitory DREADD was selectively expressed in OT neurons by observing mCitrine fluorescence, which was included in the targeting vector, in OT-immunopositive neurons **(Figure 2B)**. To determine whether OT-containing neurons exert neurodevelopmental actions during critical period(s), we chemogenetically silenced OT neurons during different periods of postnatal life by injecting a new DREADD ligand called compound 21 (Cmpd-21) during the following developmental periods: neonatal (P0-P7), juvenile (P25-P32), and adulthood (P53-P60). The advantage of using Cmpd-21, in comparison to clozapine-N-oxide (CNO) injections, is that Cmpd-21 is a very potent full agonist of hM4Di, it has a superior brain penetration and long-lasting presence, and does not cause off-target effects on a wide range of behavioral measures (Jendryka et al. 2019).

Chemogenetic inhibition of OT-containing neurons during the neonatal life in males resulted in a 2.4- and 1.8-fold reduction in the density of POMC- and AgRP-immunoreactive fibers innervating the PVH, respectively **(Figure 2C-D)**. Interestingly, this effect appeared specific to the PVH since POMC and AgRP projections to the dorsomedial nucleus of the hypothalamus (DMH) were unaffected **(Figure 2E-F)**. In contrast, chemoinhibition of OT-containing neurons during the juvenile period or the adult life had no impact on the density of POMC- or AgRP-containing projections to either the PVH or the DMH **(Figure 2C-F)**. We also checked whether chemoinhibition of OT-containing neurons could impact OT neurons themselves and found no alterations in the oxytocinergic system, as evidenced by a normal number of OT cells in the PVH **(Figure 2G)** and an unaltered density of OT-immunoreactive fibers in the LHA **(Figure 2H)**. Notably, we found that the effects of OT chemoinhibition were sex-specific, with females not being affected **(Supplementary Figure 1)**.

Normal development of melanocortin circuits in mice lacking nitric oxide

Previous studies have demonstrated that a subset of PVH neurons express neuronal nitric oxide synthase (nNOS) (Chachlaki et al. 2017). We investigated whether these nNOS-positive cells found in the PVH could be oxytocinergic neurons and found that the vast majority of OT-positive cells in the PVH co-express nNOS during neonatal life **(Figure 3A)**. Because nitric oxide (NO) has been implicated in axonal growth and guidance (Tojima, Itofusa, and Kamiguchi 2009; Welshhans 2007), and because activation of hM4Di has been shown to alter NO production (Kim et al. 2021), we investigated whether the aberrant POMC and AgRP circuits seen after chemogenetic inhibition of OT neurons could be mediated through NO by examining melanocortin circuits in *nNOS* KO mice. The results showed that there were no alterations in the density of POMC and AgRP neuronal projections to the PVH **(Figure 3B,C; Supplementary Figure 1)** and DMH **(Figure 3D,E; Supplementary Figure 1)** in male and female *nNOS* KO mice. In addition, the oxytocinergic system appears normal in mutant mice (**Figure 3F,G; Supplementary Figure 1).** These results indicate that whereas many OT neurons co-express NO this gaseous neurotransmitter is not involved in the establishment of melanocortin circuits.

Oxytocin neurons influence the development of melanocortin circuits through a SNARE protein-dependent process that requires the presence of functional vesicle-associated proteins

The results described above suggest that the neurodevelopment effects of OT-producing neurons' chemoinhibition are not mediated by diffusible molecules such as NO, but rather involve the release of large molecules such as neuropeptides and neurotransmitters. To test this hypothesis, we used a conditional mouse model expressing the botulinum toxin serotype B light chain (BoNT/B), causing inhibition of SNARE-mediated exocytosis (Slezak et al. 2012). These mice were crossed with *Ot*-Cre mice to induce OT neuron-specific blockade of SNARE-dependent exocytosis **(Figure 4A)**.

Blockade of vesicular fusion in OT-containing neurons of male, but not female, mice resulted in a 1.8-fold reduction in the density of POMC- and AgRP-immunoreactive fibers innervating the PVH. Similar to the chemoinhibition of OT neurons, the effect of exocytosis blockade on melanocortin circuits was specific to the innervation of the PVH **(Figure 4 B,C; Supplementary Figure 1)**, as the density of POMC and AgRP projections to the DMH was comparable between *Ot*-Cre::BoN/T and control mice **(Figure 4 D,E; Supplementary Figure 1)**. Similarly, the exocytose blockade did not cause neuroanatomical alterations of the oxytocinergic system **(Figure 4 F,G; Supplementary Figure 1)**.

Together, these results suggest that the normal development of melanocortin circuitry to the PVH requires exocytosis from OT-containing neurons.

OTR signaling is required for normal development of melanocortin circuits

OT neurons express a variety of neuropeptides and neurotransmitters such as OT, vasopressin, and glutamate, all of which can be affected in our *Ot*-Cre::R26-hM4Di-DREADD and *Ot*-Cre::BoN/T mouse models. To further explore whether the neurodevelopment effects of OT-containing neurons on POMC and AgRP circuits could be mediated by OT *per se*, we first investigated whether POMC and AgRP neurons expressed the oxytocin receptor (OTR). Quantitative analysis of gene expression using RNAscope reveals that *Otr* mRNA is ubiquitously expressed in the hypothalamus, including in the ARH, VMH, DMH, and PVH, throughout postnatal life **(Figure 5A-C).** Among all hypothalamic nuclei examined, the VMH consistently showed the highest expression of *Otr* across all ages tested **(Figure 5C)**. Within the ARH, *Otr* was found in 60.5% of *Pomc* neurons at P0, increasing to 73% by P60 **(Figure 5D,E)**. 28.2% of *Agrp* neurons co-expressed *Otr* mRNA at P0, rising to 42.8% at P60 **(Figure**

5D,E). Notably, the majority of *Pomc*- and *Agrp*-expressing neurons expressed relatively low levels of *Otr* mRNA **(Fig5, E)**. These observations suggest that OT can potentially act directly on POMC and AgRP neurons as early as birth and throughout postnatal development.

To determine if OT acts directly on arcuate neurons to influence axon growth, we performed a series of experiments in which ARH explants from neonatal WT mice were cultured *ex vivo* and exposed to OT. After 48h, the density of axons extending from arcuate explants in which OT was added to the culture medium was 1.8-fold higher than that of control explants **(Figure 6)**. Together, these data provide evidence that OT acts directly on arcuate neurons to promote axon growth. To investigate the *in vivo* relevance of these findings, we examined melanocortin circuits in WT mice that were injected from P0 to P7 with L-368,889, a specific oxytocin receptor antagonist (OTRA) **(Figure 7A)**. Adult male mice treated with the OTRA neonatally displayed a 2-fold reduction in the density of immunoreactive POMC fibers innervating the PVH **(Figure 7B)**, but innervation of the DMH was unchanged **(Figure 7D)**. Interestingly, we did not find no alterations in melanocortin or OT circuits in females treated with L-368,889 neonatally, nor any changes in AgRP circuits in either male or female mice **(Figure 7C,E,F,G; Supplementary Figure 1)**.

These results are consistent with our findings in both *Ot*-Cre::R26-hM4Di-DREADD and *Ot*-Cre::BoN/T mouse models, substantiating the requirement of OT secretion and binding to its receptor to promote the development of POMC projections to the PVH during a neonatal critical period.

Neonatal blockade of oxytocin signaling causes lifelong metabolic dysregulations

We also investigated the long-term physiological consequences of OTRA during neonatal life. Male and female mice treated with the OTRA neonatally had normal body weight **(Figure 8A)**. However, neonatal treatment with the OTRA in male, but not in female (data not shown), mice resulted in reduced adiposity and elevated lean mass compared to control animals **(Figure 8B)**. It is known that body composition could be a factor influencing glucose regulation. Adult mice treated with L-368,889 neonatally displayed lower fasting glycemia levels than their respective controls (**Figure 8K**). In addition, neonatal OTRA resulted in improved glucose tolerance after a glucose challenge (**Figure 8L,M**). We also conducted a comprehensive assessment of energy balance regulation of adult mice treated with L-368,889 neonatally. Neonatal OTRA resulted in a significant increase in cumulative and nocturnal food intake **(Figure 8 C,D),** and a higher mean and diurnal respiratory exchange ratio (RER) **(Figure 8 E,F)**, suggesting a shift toward a

more carbohydrate-centric metabolism in these animals. However, locomotor activity, energy expenditure (EE), and z-rearing were unaffected in OTRA-treated animals **(Figure 8G-J)**.

Neonatal chemogenetic activation of oxytocin neurons rescues POMC circuit deficits in *Magel2* KO mice

Dysregulation of the OT system has been linked to various forms of obesity, including of genetic origins such as PWS (Bochukova et al. 2018). Interestingly, the *Magel2* KO mouse model of PWS displays a marked reduction in OT content at birth (Schaller et al. 2010) associated with alterations in POMC neurocircuitry (Maillard et al. 2016). Based on these observations, we used a stimulatory Cre-dependent DREADD approach to explore the ability of OT neurons to functionally rescue the neurodevelopmental deficits of POMC circuits in *Magel2* KO mice. To do so, we crossed *Ot*-Cre::R26-hM3Dq-DREADD mice with *Magel2* KO animals **(Figure 9A)**. We specifically chemogenetically stimulated OT neurons in *Magel2* KO mice during the first week of postnatal life, given our previous findings revealing a critical neonatal period for the neurodevelopmental actions of OT on melanocortin circuits. Our results revealed a significant increase in the density of POMC-immunoreactive fibers in the PVH of *Magel2* KO, *Ot*-Cre::R26-hM3Dq-DREADD mice treated with Cmpd-21 neonatally **(Figure 9B)**. The chemoactivation of OT neurons was specific to the POMC innervation of the PVH, since the density of POMC projections to the DMH, and the density of AgRP fibers to the PVH appeared comparable between *Magel2* KO, R26-hM3Dq-DREADD and *Magel2* KO, *Ot*-Cre::R26-hM3Dq-DREADD mice **(Figure 9C,D).** Surprisingly, the density of AgRP fibers was also increased in the DMH of *Magel2* KO, *Ot*-Cre::R26-hM3Dq-DREADD mice treated with Cmpd-21 neonatally **(Figure 9E)**. However, the chemogenetic activation of OT neurons did not affect the OT system in *Magel2* KO mice **(Figure 9F,G)**.

Discussion

POMC and AgRP neurons send extensive axonal projections to the PVH, particularly toward OT neurons, to modulate feeding and metabolism. However, whether OT neurons actively contribute to the development of melanocortin circuitry is unknown. The present study shows that chemogenetic inhibition of OT-expressing neurons during the neonatal period, but not during the juvenile or the adult period, disrupts POMC and AgRP innervation of the PVH. We also sought to elucidate the factors and mechanisms underlying these neurodevelopmental effects since OT neurons can produce a variety of neuropeptides and neurotransmitters including OT, vasopressin, and glutamate, but also diffusible factors such as NO, which has been shown to play a role in axonal guidance (Tojima, Itofusa, et Kamiguchi 2009; Castellani et al. 2002; Welshhans 2007). Therefore, we investigated whether the neurodevelopmental alterations observed upon chemogenetic silencing of OT neurons were triggered by neuropeptides secreted by exocytosis from OT neurons or mediated through NO production. No alterations in POMC or AgRP neuronal projections were found in *nNOS* KO mice. However, the development of POMC and AgRP circuits to the PVH was altered in animals expressing botulinum toxin serotype B light chain genes in OT-producing neurons, suggesting that melanocortin circuits' development is dependent on SNARE-mediated exocytosis.

In agreement with existing literature supporting a direct role for OT in neuronal development (Tyzio et al. 2006; Pekarek et al. 2022; Grinevich et al. 2014), our study provides evidence for the direct involvement of OT as the main factor driving neurodevelopmental effects on melanocortin circuits. This hypothesis is supported by our experiments using pharmacological antagonism of OTR during neonatal life and showing that it recapitulates the developmental alterations in POMC and AgRP neuronal circuits observed in mice with chemogenetic inhibition of OT-producing neurons and mice expressing botulinum toxin serotype B light chain genes in OT-containing neurons. Moreover, we found that *Otr* is expressed in POMC and AgRP neurons throughout development. Furthermore, direct exposure of OT to arcuate nucleus explants *ex vivo* promotes axonal growth. Together, these observations support the hypothesis that OT exerts its neurodevelopmental effect on the melanocortin system directly via its receptor. It is also likely that the neurotrophic effects of OT are local at the levels of the PVH since we only found alterations in POMC and AgRP innervations to the PVH, where OT neurons are found, but not to other target nuclei.

The unique metabolic profile of animals treated with the OTR antagonist neonatally remains particularly intriguing. Neonatal OTR antagonism causes an increase in food intake and the use

of carbohydrates as a fuel source, but it is also associated with reduced fat mass, increased lean mass, and improved glucose tolerance. This complex phenotype may be explained by the ubiquitous expression of *Otr* throughout the CNS and the body that may be targeted with the OTR antagonism (Grinevich et al. 2014; Son et al. 2022; Elabd et al. 2008; Sun et al. 2019; Tamma et al. 2009; Zingg and Laporte 2003). For example, the hyperphagia may be the result of altered OTR signaling in POMC neurons since these neurons are known for their anorexigenic action, and we found that *Otr* is expressed throughout the ARH during postnatal development with nearly 60-75% of *Otr*+ neurons being POMC neurons. Moreover, previous studies have reported that intra-ARH OT injections reduce food intake (Maejima et al. 2014). However, OT can also act on other neural networks to control food intake, such as the mesolimbic pathway (*i.e.*, the nucleus accumbens and ventral tegmental area) and particularly its interactions with the dopaminergic system to modulate responses to external social stimuli (Shamay-Tsoory and Abu-Akel 2016). In addition, other aspects of metabolism, such as body composition, may be caused by a direct effect of the OTR antagonist on adipocytes. The white adipose tissue develops during the developmental window during which the OTR antagonist injection occurred (Han et al., Development, 2011), and it is the organ that expresses the highest levels of *Otr* (Sun et al., PNAS, 2019). Moreover, mice lacking *Otr* display an increased fat mass (Sun et al., PNAS, 2019). Although the site(s) of action of the OTR antagonist remains to be identified, our findings are intriguing as they show that blocking OT signaling during a discrete period of life is sufficient to cause lifelong metabolic effects, highlighting the importance of controlling optimal OT function during early life.

The pathological relevance of our findings is demonstrated by experiments in *Magel2* KO mice, a mouse model of PWS. *Magel2* KO mice display a marked reduction in OT content at birth and during infancy (Schaller et al. 2010). Interestingly, the *Magel* KO mouse model also has alterations in POMC neurocircuits (Maillard et al. 2016). Here, we found that chemogenetic reactivation of OT neurons during a neonatal critical period can restore the defective POMC projections in *Magel* KO mice. Interestingly, the loss of OT neurons' activity is a hallmark of other perinatally-acquired health conditions such as those linked to maternal obesity (Buffington et al. 2016). Pups born to obese dams have fewer OT immunoreactive neurons in the hypothalamus, and correcting OT levels using a microbiota intervention rescues social deficits in this offspring (Buffington et al. 2016). Maternal obesity also causes lifelong weight gain and glucose intolerance associated with a disruption in POMC and AgRP axonal projections during adulthood (Vogt et al. 2014; Kirk et al. 2009; Park, Jang, et Bouret 2020).

Whether reactivation of OT also functionally rescues abnormal development of the melanocortin system with the associated metabolic defects remains to be determined.

In conclusion, this comprehensive study highlights a novel role for OT neurons in the development of the melanocortin system, with a paracrine neurotrophic effect in the PVH during a neonatal critical period. We have also identified some of the complex neurobiological mechanisms by which OT neurons influence the wiring of melanocortin circuits, highlighting the role of OT exocytosis and OTR-dependent signaling. Additionally, altered metabolic profiles in models with disrupted OT signaling reveal OT's broad influence on metabolic processes, emphasizing the potential long-term impacts of early postnatal manipulations of OT pathways on metabolic health. This research not only highlights the essential role of OT-expressing neurons in neural development but also expands our understanding of their extensive contributions to brain function and metabolic regulation. It identifies potential critical timing and targets for therapeutic interventions in neurodevelopmental disorders such as PWS.

Methods

Sex as a biological variable

Our study examined male and female animals. Both sexes were pooled when no sex differences were found.

Study approval

All experiments were performed in accordance with the guidelines for animal use specified by the European Union Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU) and the approved protocol (APAFIS# 13387–2017122712209790 for the studies performed in Lille and authorization APAFIS#27108-2020090909383268 v2 for the studies conducted in Bordeaux) by the Ethical Committee of the French Ministry of Education and Research.

Animals

All mice were housed under specific pathogen-free conditions within a temperature-controlled environment (21-22°C), maintaining a 12-hour light/dark cycle and 40% humidity. The mice had *ad libitum* access to food and water. The strains used in this study included C57BL/6J wild-type mice (JAX #000664), Oxytocin-Ires Cre mice (JAX #024234), Rosa-CAG-LSL-HA-hM4Di-pta-mCitrine mice (JAX #026219, also called R26-LSL-hM4Di-DREADD mice), BoNT/B$^{loxP\text{-}STOP\text{-}loxP}$ mice (JAX #018056), *Nos1* KO mice (JAX #002986), and *Magel2* KO (*Magel2*$^{tm1.1Mus}$, provided by Dr. Francoise Muscatelli, INMED, Marseille, France). All mice were backcrossed in a C57BL/6J background.

Chemogenetic inhibition of OT neurons

Ot-Cre mice were mated to R26-hM4Di-DREADD mice to generate mice that expressed inhibitory DREADD in OT neurons. *Ot*-Cre::R26-hM4Di-DREADD mice and R26-hM4Di-DREADD (control) mice received an intraperitoneal injection of the DREADD agonist ligand, compound-21 (C21; Cat. No. SML2392, Sigma-Aldrich, 2.5mg/kg body weight) twice a day either from P0 to P7, or from P25 to P32, or from P63 to P70.

Inhibition of SNARE-dependent vesicular secretion in OT neurons

Ot-Cre mice were mated to BoNT/B$^{loxP\text{-}STOP\text{-}loxP}$ mice to generate mice expressing the botulinum toxin serotype B light chain in OT neurons, blocking exocytosis. BoNT/B were used as controls

Pharmacological blockade of OTR

Mice were injected intraperitoneally twice daily with the OTR antagonist L-368 889 (10 mg/kg BW, Cat #2641, Tocris, UK) from P0 to P7. Controls received injections with an equivalent volume of vehicle (0.9% NaCl).

Chemogenetic activation of OT neurons in *Magel2* KO mice

Ot-Cre mice were mated with R26-hM3Dq-DREADD mice to generate mice that expressed stimulatory DREADD in OT neurons. These mice were then crossed with *Magel2*$^{tm1.1Mus}$ KO mice to generate *Magel2* KO, *Ot*-Cre::R26-hM3Dq-DREADD mice. *Magel2* KO, *Ot*-Cre::R26-hM3Dq-DREADD mice and *Magel2* KO, R26-hM3Dq-DREADD (control) mice received an intraperitoneal injection of the DREADD agonist ligand, compound-21 (C21; Cat. No. SML2392, Sigma-Aldrich, 2.5mg/kg body weight) twice a day from P0 to P7.

Immunohistochemistry

Mice were perfused transcardially at P100 with 4% paraformaldehyde for AgRP, POMC, and PS38 immunolabelings and at P10 with a mixture of 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid for NOS1 and PS38 co-immunolabeling. Brains were then frozen, sectioned, and processed for immunofluorescence using standard procedures (Park, Jang, and Bouret 2020). The primary antibodies used for IHC were as follows: rabbit anti-POMC (1:10,000, Ref# H-029-30, Phoenix Pharmaceuticals), rabbit anti-AgRP (1:1,000, Ref# H-003-53, Phoenix Pharmaceuticals), mouse anti-neurophysin 2 clone PS38 (1:1,000, Ref# MABN844, Merck Millipore), and got anti-NOS1 (1:4,000, gift from Dr. P. C. Emson, The 1810 Babraham Institute, Cambridge, UK Cat# K205, RRID:AB_2895154). The primary antibodies were visualized with goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 568 (1:500, Ref# A11011, Invitrogen) or goat anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 647 secondary antibodies (1:500, Ref# A21235, Life Technologies) or donkey anti-mouse IgG conjugated with TRITC (1;1,000, Cat# 715-025-151, Jackson Immunoresearch) or donkey anti-goat IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (1:1,000, Cat# 705-545-147, Jackson Immunoresearch). Sections were mounted on Glycerol-based-medium with DAPI to visualize cell nuclei.

Images were acquired using an AxioImager Z2 Apotome microscope equipped with a 40X objective (AxioCam MRm camera, Zeiss) for the quantitative analysis of POMC, AgRP, and PS38 immunolabelings and using a Leica SP8 confocal microscope equipped with a 40X objective for the analysis of NOS1 and PS38 co-immunolabeling. Quantifications were performed in two sections per animal. Slides were numerically coded to obscure the

experimental group. The image analysis was performed using the Fiji software (NIH) as previously described (Park, Jang, and Bouret 2020). For the quantitative analysis of fiber density (for POMC, AgRP, and PS38), a maximum intensity projection was performed on 5 µm of the Z-stack. The threshold was set manually to ensure that only a positive signal was measured. Images were then binarized, and a standardized region of interest (ROI) was placed within the nucleus of interest. The software then calculated the number of pixels in the ROI corresponding to the signal of interest. This pixel count was finally normalized to the dimensions of the ROI, ensuring comparability across all images. The integrated intensity, which reflects the total number of pixels in the binarized image, was then calculated within the ROI of each image of the stack (Bouret, Draper, and Simerly 2004a; Steculorum et al. 2015b; Park, Jang, and Bouret 2020). For the quantitative analysis of cell numbers, PS38-immunopositive cells were manually counted using the Fiji software. Only cells with corresponding DAPI-stained nuclei were included in our counts. In addition, the Imaris software was used to isolate the 3D volumes corresponding to the immunohistological labeling of PS38+ neurons and AgRP+ and POMC+ fibers in the PVH. The "shortest distance to surface" formula included in the Imaris software was then used to evaluate the proximity of the AgRP or POMC signals to the PS38 signals. This distance was used as a proxy to determine the distance between PS38+ neurons and AgRP+ or POMC+ projections.

RNAscope fluorescent in situ hybridization (FISH)

FISH was performed on fresh-frozen brain sections derived from WT mice at P0, P5, P10, P25, and P60 using the RNAscope Multiplex Fluorescent Kit v2 according to the manufacturer's instruction (Advanced Cell Diagnosis, Inc., CA, USA) and as previously described (Duquenne et al. 2021). Adjustment of protease incubation time was made for the labeling of perinatal tissues. Commercially available probes were used to detect *Oxtr* (ACD, Ref: 412171), *Pomc* (ACD, Ref: 314081-C2), and *Agrp* (ACD, Ref: 400711-C3) mRNAs. Sections were mounted on a glycerol-based medium with DAPI to visualize the border of each nucleus. Images were acquired using an AxioImager Z2 Apotome microscope (AxioCam MRm camera, Zeiss) and Zen 3.1 (blue edition) software. The quantitative analysis of *Oxtr* mRNA was performed in the ARH, VMH, DMH, and PVH by counting the number of *Oxtr* positive spots within each nucleus using the Fiji software. The total number of transcripts was then normalized to the area of each respective nucleus. The quantitative analysis of *Pomc* and *Agrp* cells expressing *Oxtr* was categorized based on the degree of co-localization with *Oxtr*-positive spots. This classification system established five distinct classes of *Oxtr* mRNA expression: none (0 spots/cell), low (1-3 spots/cell), medium (4-6 spots/cell), high (7-9 spots/cell), and very high (10+ spots/cell).

Isolated ARH explant culture

Brains were collected from P4 WT mice and sectioned at 200-µm thickness with a vibroslicer as previously described (Bouret, Draper, and Simerly 2004b). The ARH was then carefully dissected out of each section under a stereomicroscope. Explants were cultured onto a rat tail collagen matrix (BD Bioscience), and each explant was incubated with fresh modified Basal Medium Eagle (Invitrogen) containing OT (100 ng/ml) or vehicle (NaCl). After 48 hours, the explants were fixed in paraformaldehyde, and neurites extending from the explants were stained with a TUJ1 (βIII tubulin) antibody (rabbit, 1:5,000, Covance, cat# MMS-435P) as described previously (Bouret, Draper, and Simerly 2004b). Image analysis was performed using a Zeiss LSM 710 confocal system equipped with a 10X objective. Slides were numerically coded to obscure the treatment group. The image analysis was performed using the Fiji software (NIH) as previously described (Bouret, Draper, and Simerly 2004b).

Metabolic phenotyping

Animals were weighed using an analytical balance at P100. Body composition analysis was conducted using a Minispec LF50 Series (Bruker Corporation, Massachusetts) at P100. Fat mass, lean mass, and free body fluids measurements were expressed as a percentage of total body weight. Food intake, O_2 and CO_2 production, energy expenditure, respiratory exchange ratio (RER, *i.e.*, VCO_2/O_2), locomotive activity (XY), and Z rearing were monitored in fed mice at P100 using a combined indirect calorimetry system (TSE Pheno Master Systems GmBH, Germany). The mice were acclimated in monitoring chambers for two days, and the data were collected for six days. These physiological measures were performed at the mouse metabolic phenotyping platform of the University of Lille. Glucose tolerance tests were conducted in mice at P100 through i.p. injection of glucose (2g/kg body weight) after an overnight fasting. Blood glucose levels were measured at 0, 15, 30, 60, 90, 120 minutes post-injection, as previously described (Coupé et al. 2012).

Statistical analysis

Values are represented as the mean + SEM or mean ± SEM. Statistical analyses were conducted using GraphPad Prism (version Version 10.2.2). Data sets were analyzed for statistical significance using a Mann Whitney test. Statistically significant outliers were calculated using Grubb's test for outliers. $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Acknowledgments

We thank Meryem Tardivel and Antonino Bongiovanni from the BICEL Photonic Microscopy. We also thank the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, a member of the national infrastructure France BioImaging supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). The technical assistance of Sébastien Marais, Magali Mondin, and Christel Poujols is acknowledged. We thank Julien Devassine (animal core facility, Lille) and members of the PLBS UAR2014-US41 for their expert technical support. SGB is funded by the Foundation for Prader-Willi Research, Fédération pour la Recherche sur le Cerveau, and l'Agence National pour la Recherche (ANR-22-CE16-0007, MATBIOTA). Figures 2A, 4A, 7A, and 9A were created with BioRender.com.

References

Atasoy, Deniz, J. Nicholas Betley, Helen H. Su, and Scott M. Sternson. 2012. « Deconstruction of a Neural Circuit for Hunger ». *Nature* 488 (7410): 172-77.

Bochukova, Elena G., Katherine Lawler, Sophie Croizier, Julia M. Keogh, Nisha Patel, Garth Strohbehn, Kitty K. Lo, et al. 2018. « A Transcriptomic Signature of the Hypothalamic Response to Fasting and BDNF Deficiency in Prader-Willi Syndrome ». *Cell Reports* 22 (13): 3401-8.

Bouret, Sebastien G., Shin J. Draper, and Richard B. Simerly. 2004a. « Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice ». *The Journal of Neuroscience* 24 (11): 2797-2805.

Bouret, Sebastien G, Shin J. Draper, and Richard B. Simerly. 2004b. « Trophic Action of Leptin on Hypothalamic Neurons That Regulate Feeding ». *Science* 304 (5667): 108-10. 4.

Bouret, Sebastien G., and Françoise Muscatelli. 2021. « Ontogenesis of Hypothalamic Neurons in Mammals ». In *Neuroanatomy of Neuroendocrine Systems*, édité par Valery Grinevich et Árpád Dobolyi, 3-40. Cham: Springer International Publishing.

Buffington, Shelly A., Gonzalo Viana Di Prisco, Thomas A. Auchtung, Nadim J. Ajami, Joseph F. Petrosino, and Mauro Costa-Mattioli. 2016. « Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring ». *Cell* 165 (7): 1762.

Chachlaki, Konstantina, Samuel A. Malone, Emily Qualls-Creekmore, Erik Hrabovszky, Heike Münzberg, Paolo Giacobini, Fabrice Ango, and Vincent Prevot. 2017. « Phenotyping of nNOS neurons in the postnatal and adult female mouse hypothalamus ». *The Journal of comparative neurology* 525 (15): 3177-89.

Coupé, Bérengère, Yuko Ishii, Marcelo O. Dietrich, Masaaki Komatsu, Tamas L. Horvath, et Sebastien G. Bouret. 2012. « Loss of Autophagy in Pro-Opiomelanocortin Neurons Perturbs Axon Growth and Causes Metabolic Dysregulation ». *Cell Metabolism* 15 (2): 247-55.

Duquenne, Manon, Cintia Folgueira, Cyril Bourouh, Marion Millet, Anisia Silva, Jérôme Clasadonte, Monica Imbernon, et al. 2021. « Leptin Brain Entry via a Tanycytic LepR-EGFR Shuttle Controls Lipid Metabolism and Pancreas Function ». *Nature Metabolism* 3 (8): 1071-90.

Elabd, Christian, Armelle Basillais, Hélène Beaupied, Véronique Breuil, Nicole Wagner, Marcel Scheideler, Laure-Emmanuelle Zaragosi, et al. 2008. « Oxytocin Controls Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells and Reverses Osteoporosis ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (9): 2399-2407.

Grove, K. L, S Allen, B. E Grayson, and M. S Smith. 2003. « Postnatal development of the hypothalamic neuropeptide Y system ». *Neuroscience* 116 (2): 393-406.

Grinevich, Valery, Michel G. Desarménien, Bice Chini, Maithé Tauber, and Françoise Muscatelli. 2014. « Ontogenesis of Oxytocin Pathways in the Mammalian Brain: Late Maturation and Psychosocial Disorders ». *Frontiers in Neuroanatomy* 8:164.

Hurlemann, Rene, and Valery Grinevich, éd. 2018. *Behavioral Pharmacology of Neuropeptides: Oxytocin*. Vol. 35. Current Topics in Behavioral Neurosciences. Cham: Springer International Publishing.

Jendryka, Martin, Monika Palchaudhuri, Daniel Ursu, Bastiaan van der Veen, Birgit Liss, Dennis Kätzel, Wiebke Nissen, and Anton Pekcec. 2019. « Pharmacokinetic and

Pharmacodynamic Actions of Clozapine-N-Oxide, Clozapine, and Compound 21 in DREADD-Based Chemogenetics in Mice ». *Scientific Reports* 9 (1): 4522. h
Kim, Jae-Hong, Md Habibur Rahman, Won Ha Lee, and Kyoungho Suk. 2021. « Chemogenetic Stimulation of the Gi Pathway in Astrocytes Suppresses Neuroinflammation ». *Pharmacology Research & Perspectives* 9 (6): e00822.
Kirk, Shona L., Anne-Maj Samuelsson, Marco Argenton, Hannah Dhonye, Theodosis Kalamatianos, Lucilla Poston, Paul D. Taylor, and Clive W. Coen. 2009. « Maternal Obesity Induced by Diet in Rats Permanently Influences Central Processes Regulating Food Intake in Offspring ». *PloS One* 4 (6): e5870.
Knoop, Marit, Marie-Laure Possovre, Alice Jacquens, Alexandre Charlet, Olivier Baud, andPascal Darbon. 2022. « The Role of Oxytocin in Abnormal Brain Development: Effect on Glial Cells and Neuroinflammation ». *Cells* 11 (23): 3899.
Maejima, Yuko, Kazuya Sakuma, Putra Santoso, Darambazar Gantulga, Kenichi Katsurada, Yoichi Ueta, Yuichi Hiraoka, et al. 2014. « Oxytocinergic Circuit from Paraventricular and Supraoptic Nuclei to Arcuate POMC Neurons in Hypothalamus ». *FEBS Letters* 588 (23): 4404-12.
Meziane, Hamid, Fabienne Schaller, Sylvian Bauer, Claude Villard, Valery Matarazzo, Fabrice Riet, Gilles Guillon, et al. 2015. « An Early Postnatal Oxytocin Treatment Prevents Social and Learning Deficits in Adult Mice Deficient for Magel2, a Gene Involved in Prader-Willi Syndrome and Autism ». *Biological Psychiatry* 78 (2): 85-94.
Park, Soyoung, Alice Jang, and Sebastien G. Bouret. 2020. « Maternal Obesity-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Causes Metabolic Alterations and Abnormal Hypothalamic Development in the Offspring ». *PLOS Biology* 18 (3): e3000296.
Sawchenko, P. E., and L. W. Swanson. 1982. « Immunohistochemical Identification of Neurons in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus That Project to the Medulla or to the Spinal Cord in the Rat ». *The Journal of Comparative Neurology* 205 (3): 260-72.
Schaller, Fabienne, Françoise Watrin, Rachel Sturny, Annick Massacrier, Pierre Szepetowski, and Françoise Muscatelli. 2010. « A single postnatal injection of oxytocin rescues the lethal feeding behaviour in mouse newborns deficient for the imprinted Magel2 gene ». *Human Molecular Genetics* 19 (24): 4895-4905.
Slezak, Michal, Antje Grosche, Aurore Niemiec, Naoyuki Tanimoto, Thomas Pannicke, Thomas A. Münch, Britni Crocker, et al. 2012. « Relevance of Exocytotic Glutamate Release from Retinal Glia ». *Neuron* 74 (3): 504-16.
Son, Seoyoung, Steffy B. Manjila, Kyra T. Newmaster, Yuan-Ting Wu, Daniel J. Vanselow, Matt Ciarletta, Todd E. Anthony, Keith C. Cheng, and Yongsoo Kim. 2022. « Whole-Brain Wiring Diagram of Oxytocin System in Adult Mice ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 42 (25): 5021-33.
Steculorum, Sophie M., Gustav Collden, Berengere Coupe, Sophie Croizier, Sarah Lockie, Zane B. Andrews, Florian Jarosch, Sven Klussmann, and Sebastien G. Bouret. 2015a. « Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits ». *Journal of Clinical Investigation*.
Sun, Li, Daria Lizneva, Yaoting Ji, Graziana Colaianni, Elina Hadelia, Anisa Gumerova, Kseniia Ievleva, et al. 2019. « Oxytocin Regulates Body Composition ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (52): 26808-15.
Tamma, Roberto, Graziana Colaianni, Ling-ling Zhu, Adriana DiBenedetto, Giovanni Greco, Gabriella Montemurro, Nicola Patano, et al. 2009. « Oxytocin is an anabolic bone hormone ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (17): 7149-54.

Tojima, Takuro, Rurika Itofusa, and Hiroyuki Kamiguchi. 2009. « The Nitric Oxide–CGMP Pathway Controls the Directional Polarity of Growth Cone Guidance via Modulating Cytosolic Ca2+ Signals ». *Journal of Neuroscience* 29 (24): 7886-97.

Tyzio, Roman, Rosa Cossart, Ilgam Khalilov, Marat Minlebaev, Christian A. Hübner, Alfonso Represa, Yehezkel Ben-Ari, and Rustem Khazipov. 2006. « Maternal Oxytocin Triggers a Transient Inhibitory Switch in GABA Signaling in the Fetal Brain during Delivery ». *Science (New York, N.Y.)* 314 (5806): 1788-92.

Vogt, Merly C., Lars Paeger, Simon Hess, Sophie M. Steculorum, Motoharu Awazawa, Brigitte Hampel, Susanne Neupert, et al. 2014. « Neonatal Insulin Action Impairs Hypothalamic Neurocircuit Formation in Response to Maternal High-Fat Feeding ». *Cell* 156 (3): 495-509.

Welshhans. 2007. « Nitric oxide regulates growth cone filopodial dynamics via ryanodine receptor-mediated calcium release - Welshhans - 2007 - European Journal of Neuroscience - Wiley Online Library ». 2007.

Zingg, Hans H., and Stephane A. Laporte. 2003. « The Oxytocin Receptor ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 14 (5): 222-27.

Figures

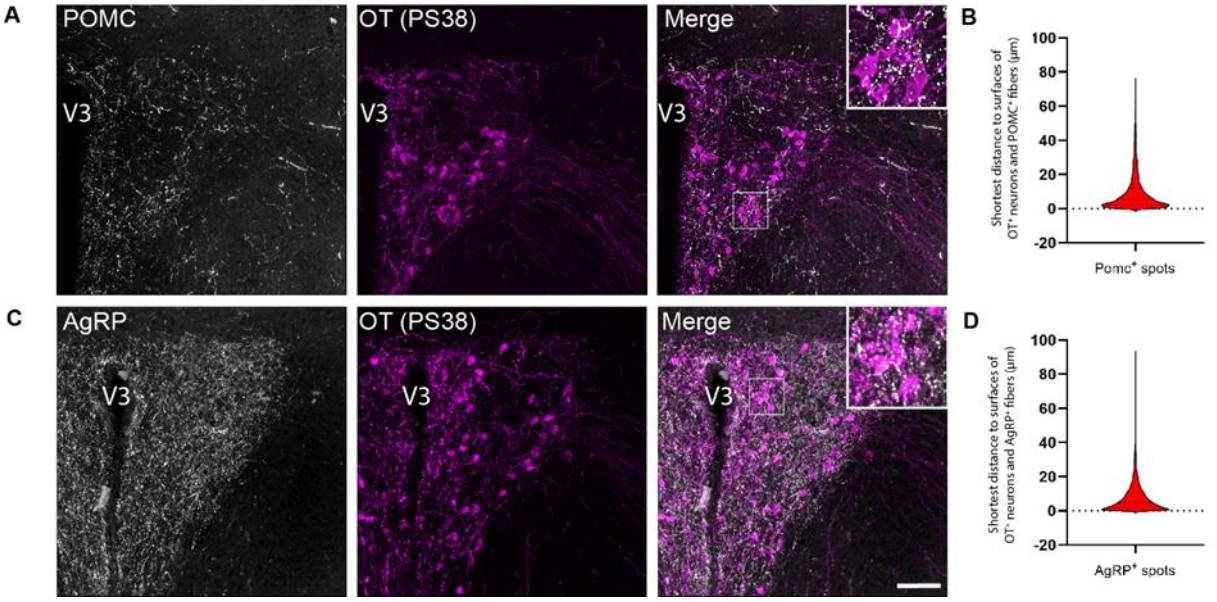


Figure 1. Close anatomical association between POMC and AgRP fibers and oxytocin neurons in the paraventricular nucleus. (**A,C**). Representative images of OT (PS38) immunoreactive neurons and (**A**) POMC- and (**C**) AgRP-immunoreactive fibers in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH). (**B,D**). Quantification of the shortest distance between (**B**) POMC- (**B**) or (**D**) AgRP-immunoreactive fibers and OT-immunoreactive processes within the PVH (n = 5 animals per group). V3, third ventricle. Scale bar, 50µm.

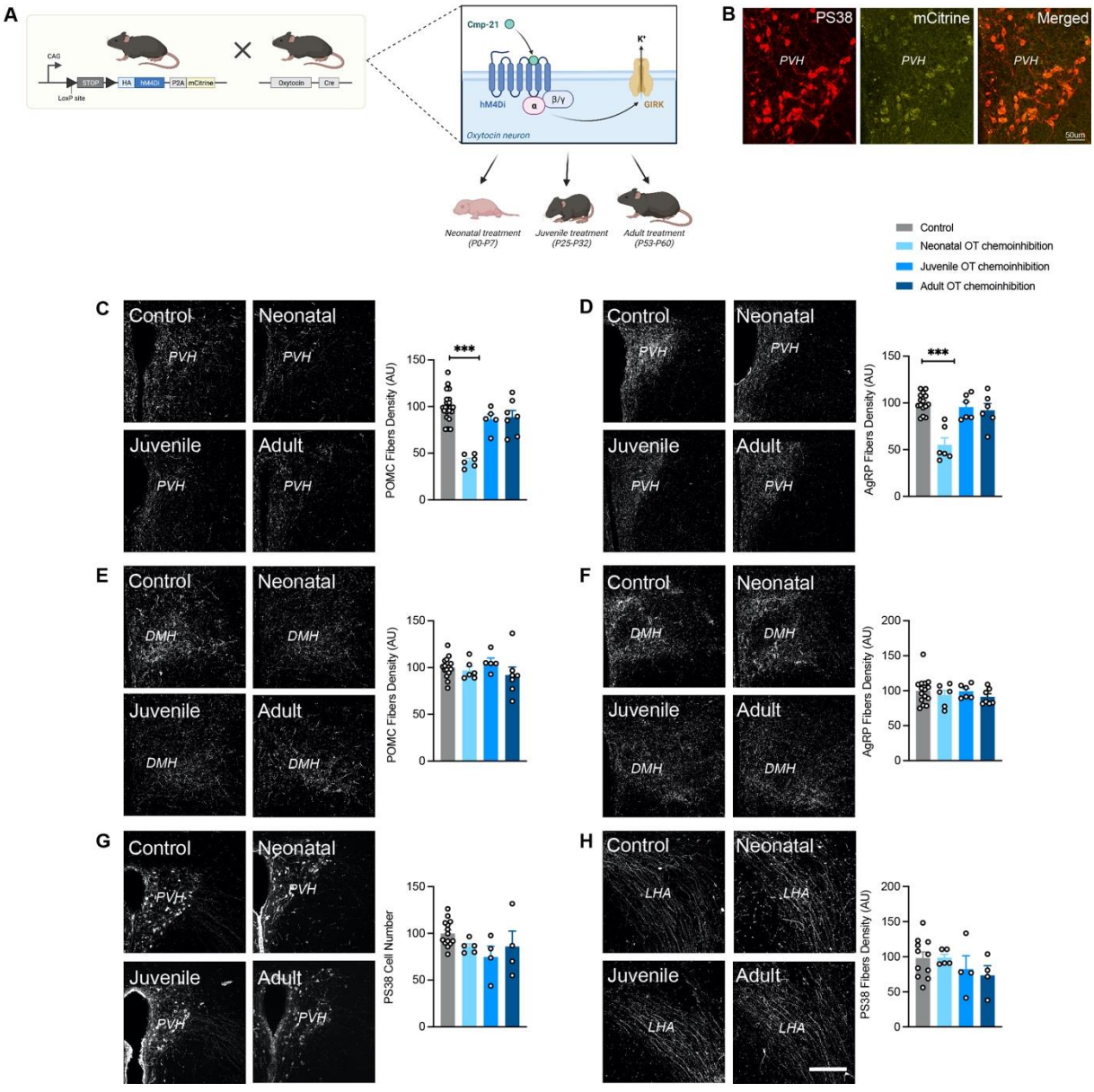

A
CAG
STOP
HA
hM4Di
P2A
mCitrine
LoxP site
Oxytocin
Cre
Cmp-21
K+
hM4Di
α
β/γ
GIRK
Oxytocin neuron
Neonatal treatment (P0-P7)
Juvenile treatment (P25-P32)
Adult treatment (P53-P60)
B
PS38
mCitrine
Merged
PVH
50um
Control
Neonatal OT chemoinhibition
Juvenile OT chemoinhibition
Adult OT chemoinhibition
C
Control
Neonatal
Juvenile
Adult
PVH
POMC Fibers Density (AU)
***
D
AgRP Fibers Density (AU)
E
DMH
F
G
PS38 Cell Number
H
LHA
PS38 Fibers Density (AU)

Figure 2. Neonatal chemogenetic inhibition of OT neurons disrupts melanocortin circuits. (**A**) Description of the animal model. (**B**) Representative images and quantification of OT neurons containing mCitrine. (**C-F**) Representative images and quantification of (**C, E**) POMC and (**D, F**) AgRP fibers innervating the (**C, D**) paraventricular nucleus (PVH) and (**E, F**) dorsomedial nucleus (DMH) of R26-LSL-hM4Di-DREADD (control) and *Ot*-Cre::R26-LSL-hM4Di-DREADD injected with Compound-21 neonatally, or during juvenile life, or during adulthood (n = 6-6 animals per group). (**G, H**) Representative images and quantification of OT (PS38+) neurons and fibers innervating the (**G**) PVH and (**H**) lateral hypothalamic area (LHA), respectively, in R26-LSL-hM4Di-DREADD (control) and *Ot*-Cre::R26-LSL-hM4Di-DREADD injected with Compound-21 neonatally, or during juvenile life, or during adulthood (n = 4-5 animals per group). Data are presented as mean + SEM. ***$P < 0.001$. Scale bar, 200μm.

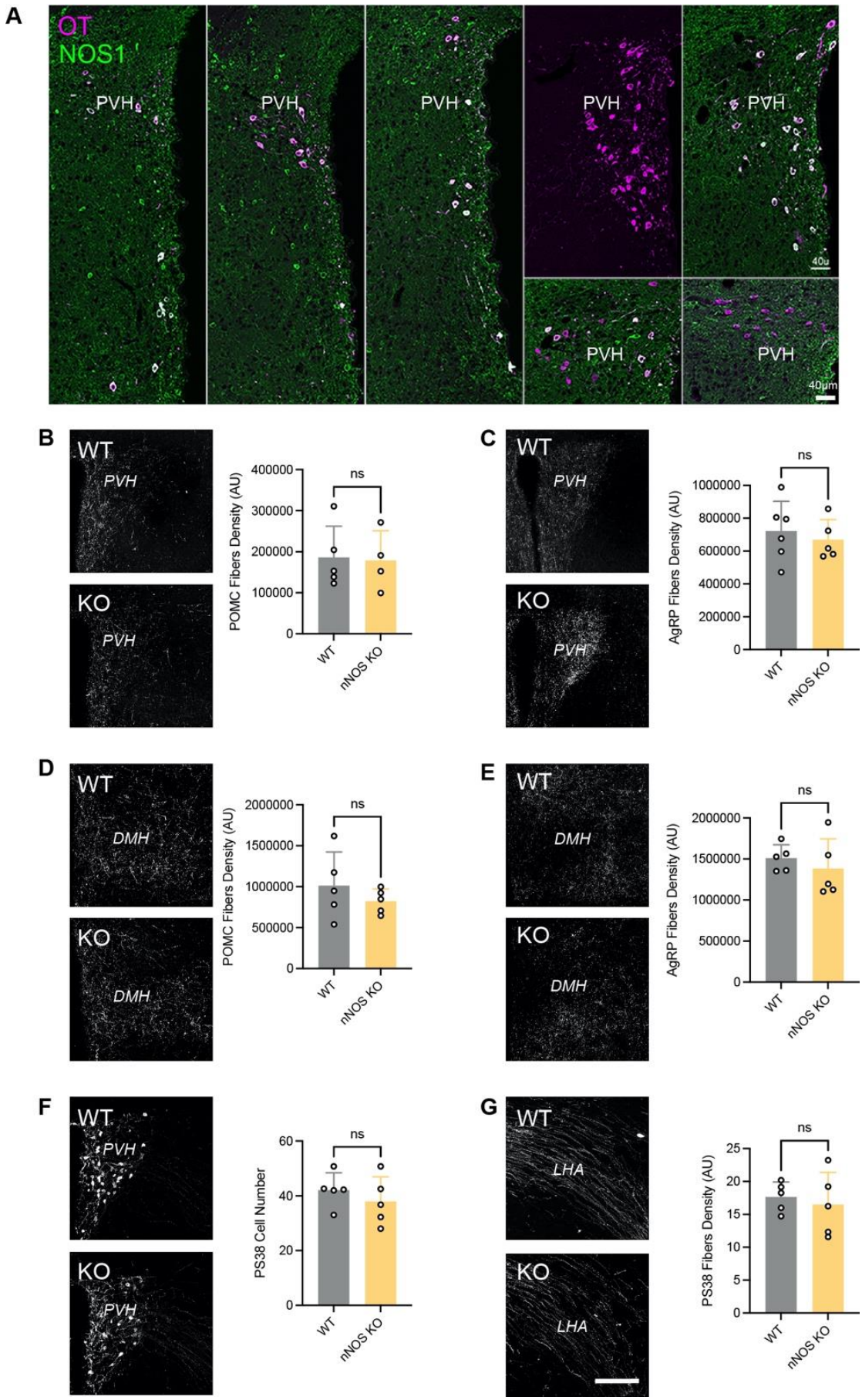

A
OT
NOS1
PVH
PVH
PVH
PVH
PVH
PVH
PVH
40u
40µm
B
WT
PVH
KO
PVH
POMC Fibers Density (AU)
400000
300000
200000
100000
0
ns
WT
nNOS KO
C
WT
PVH
KO
PVH
AgRP Fibers Density (AU)
1000000
800000
600000
400000
200000
0
ns
WT
nNOS KO
D
WT
DMH
KO
DMH
POMC Fibers Density (AU)
2000000
1500000
1000000
500000
0
ns
WT
nNOS KO
E
WT
DMH
KO
DMH
AgRP Fibers Density (AU)
2000000
1500000
1000000
500000
0
ns
WT
nNOS KO
F
WT
PVH
KO
PVH
PS38 Cell Number
60
40
20
0
ns
WT
nNOS KO
G
WT
LHA
KO
LHA
PS38 Fibers Density (AU)
25
20
15
10
5
0
ns
WT
nNOS KO

Figure 3. Normal development of melanocortin circuits in nitric oxide deficient mice. (**A**) Representative images of single optical sections of the hypothalamus of P10 mice showing OT and nitric oxide co-labeling in the paraventricular nucleus (PVH). (**B-E**) Representative images and quantification of (**B, D**) POMC and (**C, E**) AgRP fibers innervating the (**B, C**) paraventricular nucleus (PVH) and (**D, E**) dorsomedial nucleus (DMH) of wild-type (control) and *nNOS* KO mice (n = 5animals per group). (**F, G**) Representative images and quantification of OT (PS38+) neurons and fibers innervating the (**F**) PVH and (**G**) lateral hypothalamic area (LHA), respectively, in wild-type (control) and *nNOS* KO mice (n = 5 animals per group). Data are presented as mean + SEM. Scale bars, 40 μm (A), 200 μm (B-G).

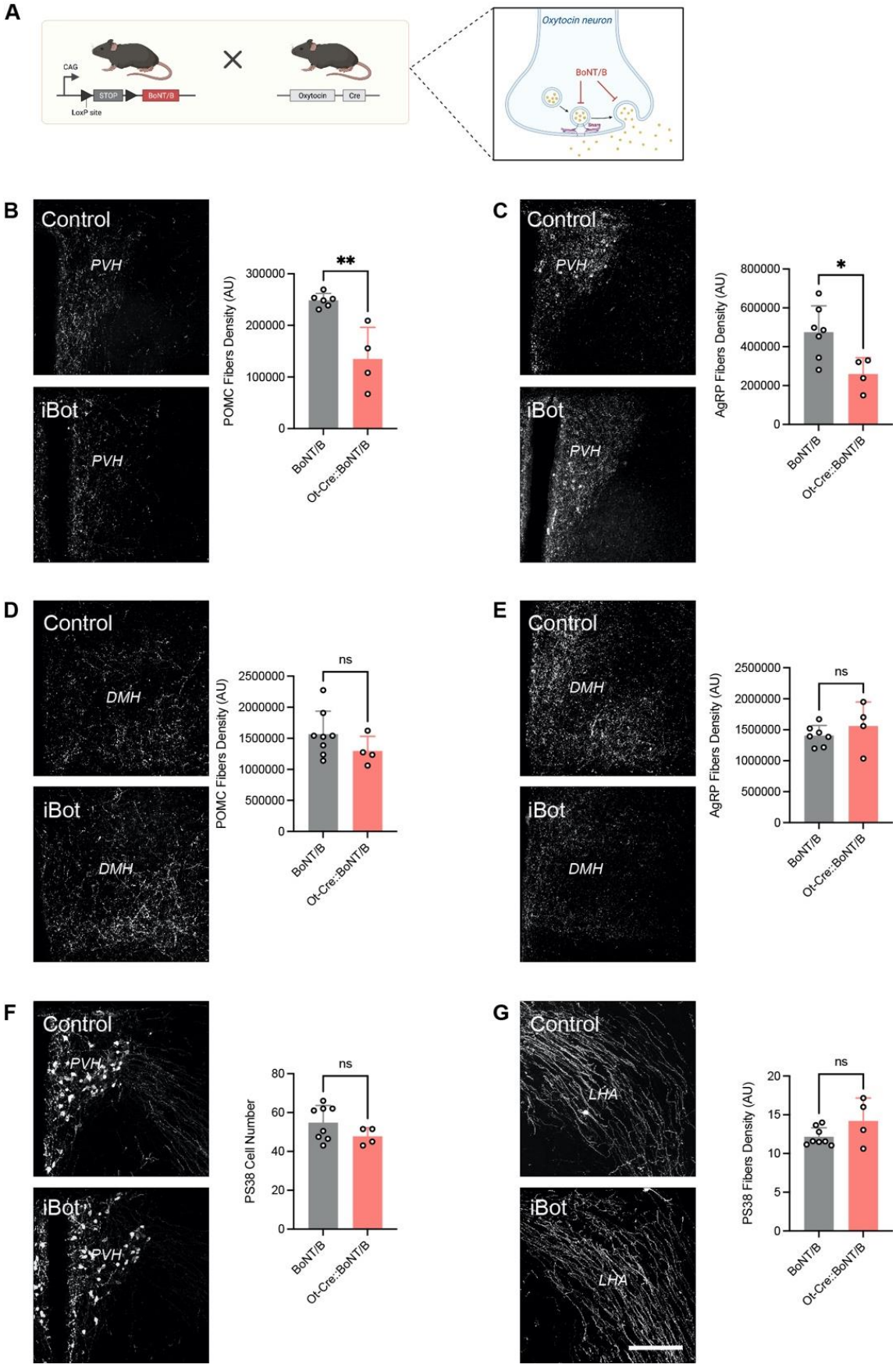

A
CAG
STOP
BoNT/B
LoxP site
Oxytocin
Cre
Oxytocin neuron
BoNT/B
B
Control
PVH
iBot
PVH
POMC Fibers Density (AU)
300000
200000
100000
0
**
BoNT/B
Ot-Cre::BoNT/B
C
Control
PVH
iBot
PVH
AgRP Fibers Density (AU)
800000
600000
400000
200000
0
*
BoNT/B
Ot-Cre::BoNT/B
D
Control
DMH
iBot
DMH
POMC Fibers Density (AU)
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
ns
BoNT/B
Ot-Cre::BoNT/B
E
Control
DMH
iBot
DMH
AgRP Fibers Density (AU)
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
ns
BoNT/B
Ot-Cre::BoNT/B
F
Control
PVH
iBot
PVH
PS38 Cell Number
80
60
40
20
0
ns
BoNT/B
Ot-Cre::BoNT/B
G
Control
LHA
iBot
LHA
PS38 Fibers Density (AU)
20
15
10
5
0
ns
BoNT/B
Ot-Cre::BoNT/B

Figure 4. Blocking exocytosis of OT neurons perturbs the development of melanocortin circuits. (**A**) Description of the animal model. (**B-E**) Representative images and quantification of (**B, D**) POMC and (**C, E**) AgRP fibers innervating the (**B, C**) paraventricular nucleus (PVH) and (**D, E**) dorsomedial nucleus (DMH) of wild-type (control) and *nNOS* KO mice (n = 4-8 animals per group). (**F, G**) Representative images and quantification of OT (PS38+) neurons and fibers innervating the (**F**) PVH and (**G**) lateral hypothalamic area (LHA), respectively, in wild-type (control) and *nNOS* KO mice (n = 8-4 animals per group). Data are presented as mean + SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01. Scale bar, 200 μm.

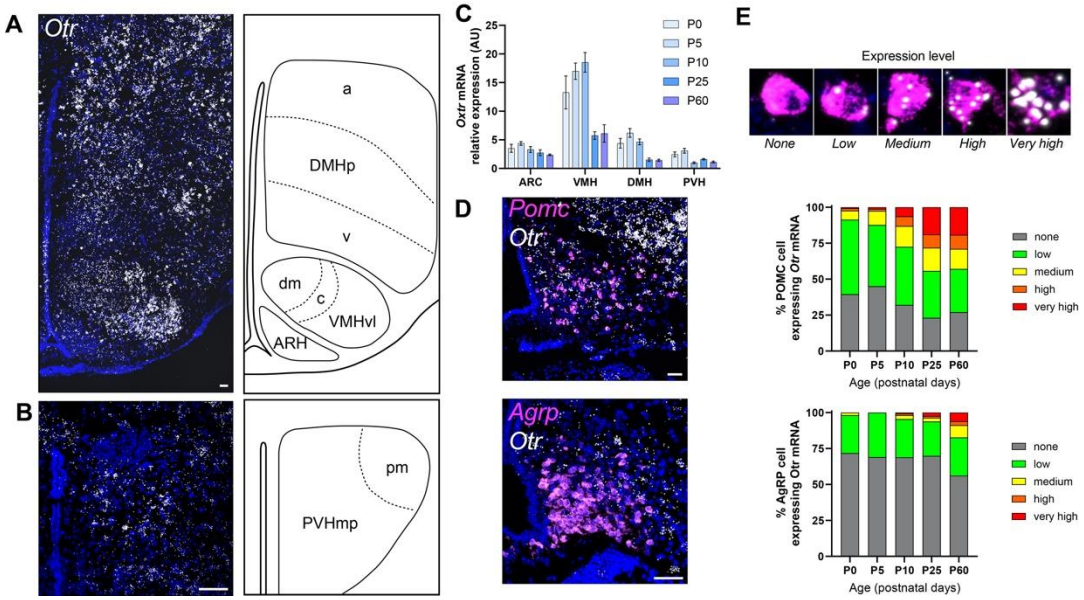


Figure 5. Expression pattern of oxytocin receptor in the developing hypothalamus. (**A,B**) Representative images showing *oxytocin receptor* (*Otr*) mRNA at the level of (**A**) the arcuate/ventromedial/dorsomedial nuclei and (**B**) the paraventricular nucleus of a P10 WT mouse. (**C**) Relative expression of *Otr* mRNA in the ARH, VMH, DMH, and PVH of WT mice at P0, P5, P10, P25, and P60 (n = 3-8 animals per group). (**D**) Representative images and (**E**) quantification of *Otr co-expression in Pomc and Agrp neurons* at P0, P5, P10, P25, and P60 (n = 6-8 animals per group). Data are presented as means ± SEM. Scale bar 50 μm.

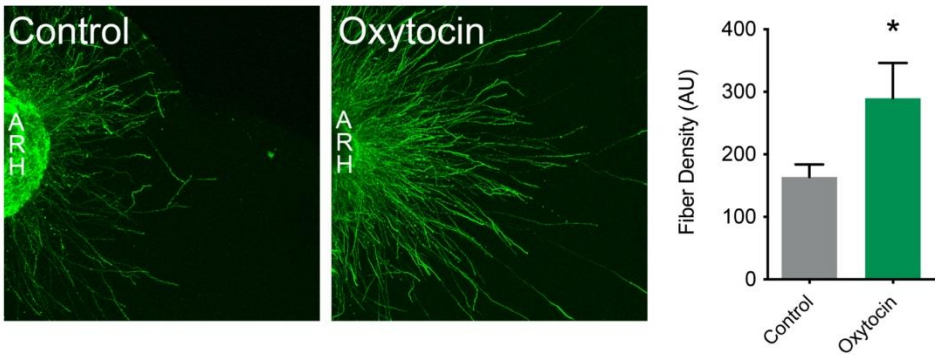


Figure 6. Oxytocin promotes the growth of arcuate nucleus axons. Representative images and quantification of βIII-tubulin–immunopositive fibers from isolated cultures of neonatal ARH incubated for 48 hours with vehicle or oxytocin (n = 4-8 per group). Data are presented as means + SEM.

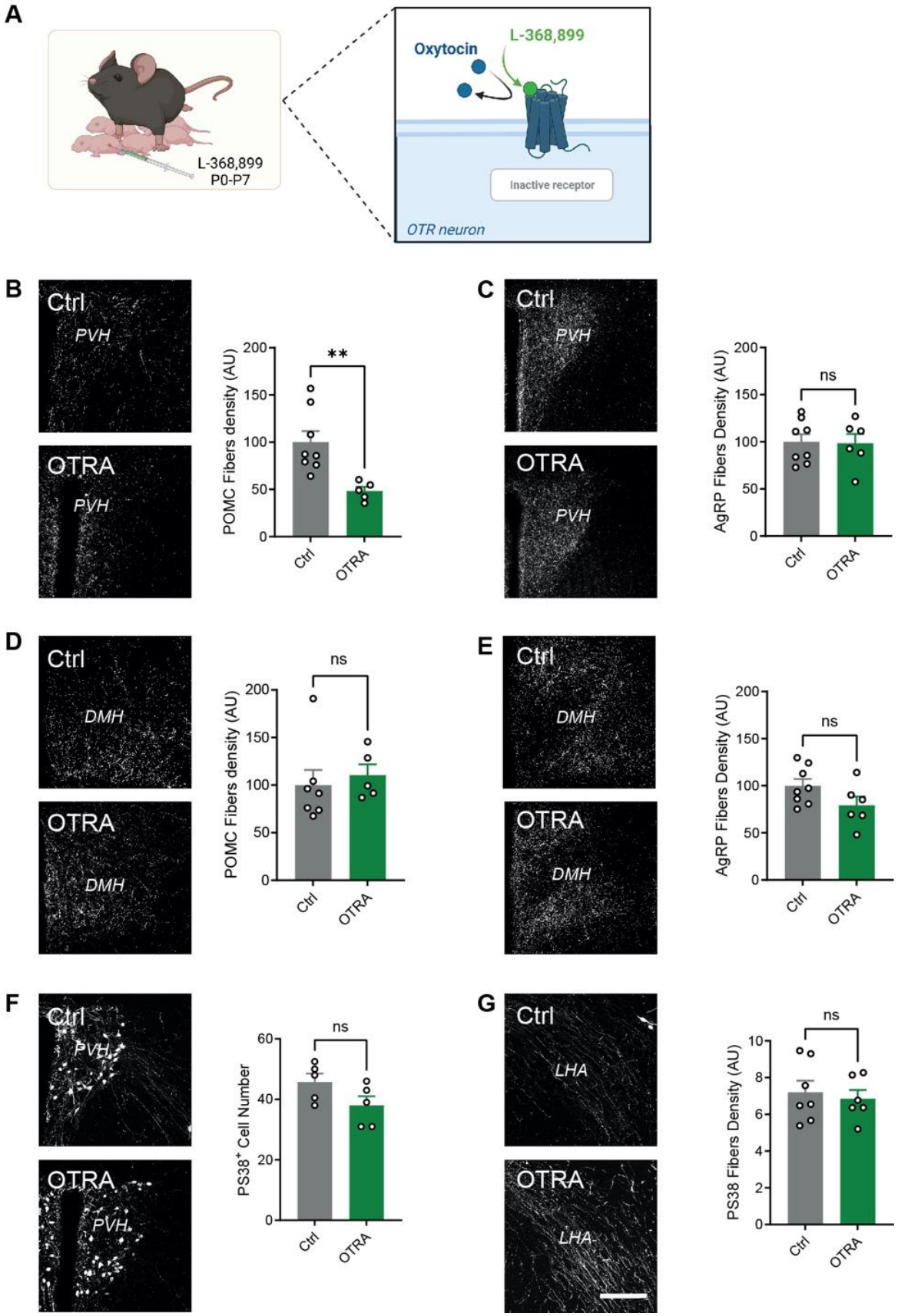

A
L-368,899
P0-P7
Oxytocin
L-368,899
Inactive receptor
OTR neuron
B
Ctrl
PVH
OTRA
PVH
POMC Fibers density (AU)
**
Ctrl
OTRA
C
Ctrl
PVH
OTRA
PVH
AgRP Fibers Density (AU)
ns
Ctrl
OTRA
D
Ctrl
DMH
OTRA
DMH
POMC Fibers density (AU)
ns
Ctrl
OTRA
E
Ctrl
DMH
OTRA
DMH
AgRP Fibers Density (AU)
ns
Ctrl
OTRA
F
Ctrl
PVH
OTRA
PVH
PS38+ Cell Number
ns
Ctrl
OTRA
G
Ctrl
LHA
OTRA
LHA
PS38 Fibers Density (AU)
ns
Ctrl
OTRA

Figure 7. Neonatal blockade of oxytocin signaling disrupts melanocortin circuits. (**A**) Description of the animal model. (**B-E**) Representative images and quantification of (**B, D**) POMC and (**C, E**) AgRP fibers innervating the (**B, C**) paraventricular nucleus (PVH) and (**D, E**) dorsomedial nucleus (DMH) of wild-type (control) and mice injected with saline (control) or an oxytocin receptor antagonist (L-368,899, OTRA) neonatally (n = 8-5 animals per group). (**F, G**) Representative images and quantification of OT (PS38+) neurons and fibers innervating the (**F**) PVH and (**G**) lateral hypothalamic area (LHA), respectively, in mice injected with saline (control) or an oxytocin receptor antagonist (L-368,899, OTRA) neonatally. (n = 7-6 animals per group). Data are presented as means + SEM. $^{**}P < 0.01$. Scale bar 200 μm.

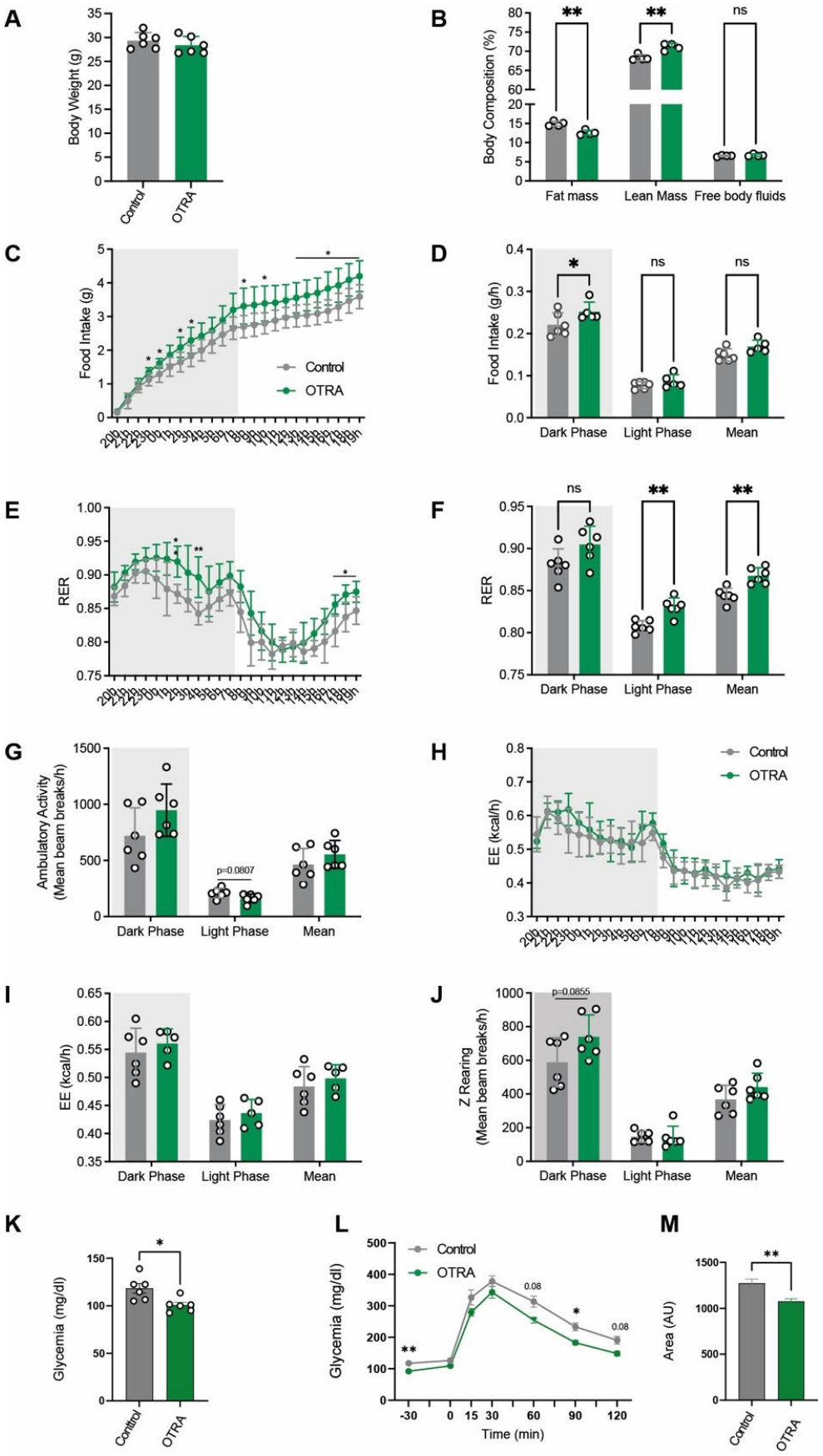
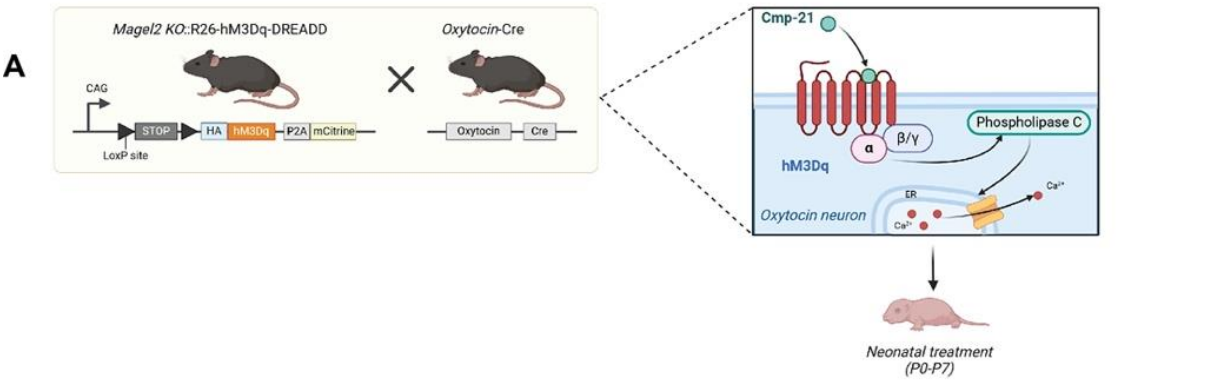

A
Body Weight (g)
Control
OTRA
B
Body Composition (%)
Fat mass
Lean Mass
Free body fluids
ns
C
Food Intake (g)
Control
OTRA
D
Food Intake (g/h)
Dark Phase
Light Phase
Mean
E
RER
F
RER
G
Ambulatory Activity (Mean beam breaks/h)
p=0.0807
H
EE (kcal/h)
I
EE (kcal/h)
J
Z Rearing (Mean beam breaks/h)
p=0.0855
K
Glycemia (mg/dl)
L
Glycemia (mg/dl)
Time (min)
M
Area (AU)

Figure 8. Neonatal blockade of oxytocin signaling causes lifelong metabolic dysregulations. (**A**) Body weight, (**B**) body composition, (**C**) cumulative and (**D**) average food intake, (**E**) 24h and (**F**) average respiratory exchange ratio, (**G**) average ambulatory activity, (**H**) 24h and (**I**) average energy expenditure, (**J**) average Z rearing, (**K**) fasting glycemia, (**L**) glucose tolerance test (GTT) and (**M**) area under the GTT curve in mice injected with saline (control) or an oxytocin receptor antagonist (L-368,899, OTRA) neonatally (n = 6 animals per group). Data are presented as means ± SEM. **P* < 0.05, ***P* < 0.01.


A
Magel2 KO::R26-hM3Dq-DREADD
Oxytocin-Cre
CAG
STOP
HA
hM3Dq
P2A
mCitrine
LoxP site
Oxytocin
Cre
Cmp-21
Phospholipase C
β/γ
α
hM3Dq
ER
Oxytocin neuron
Neonatal treatment
(P0-P7)

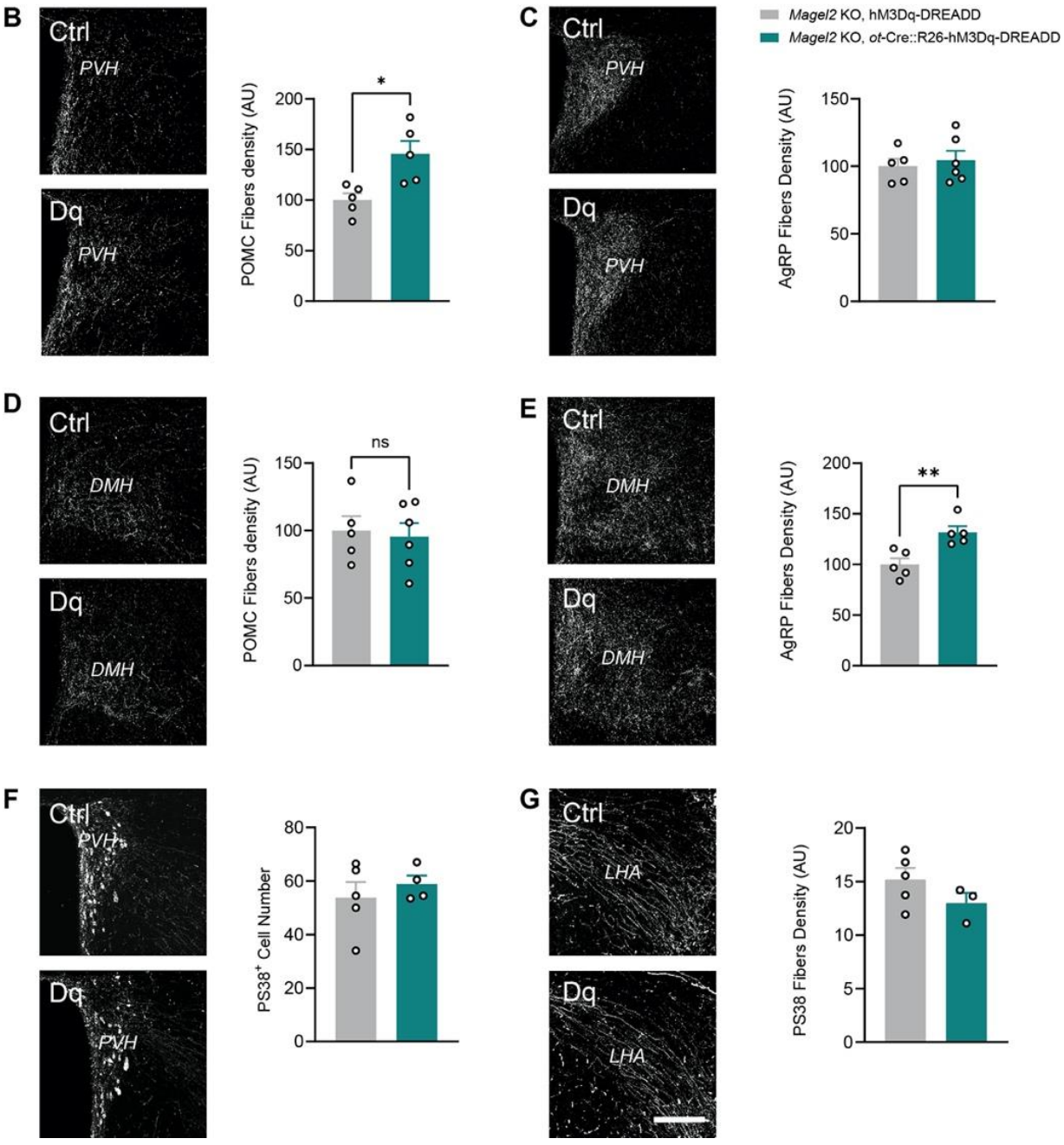
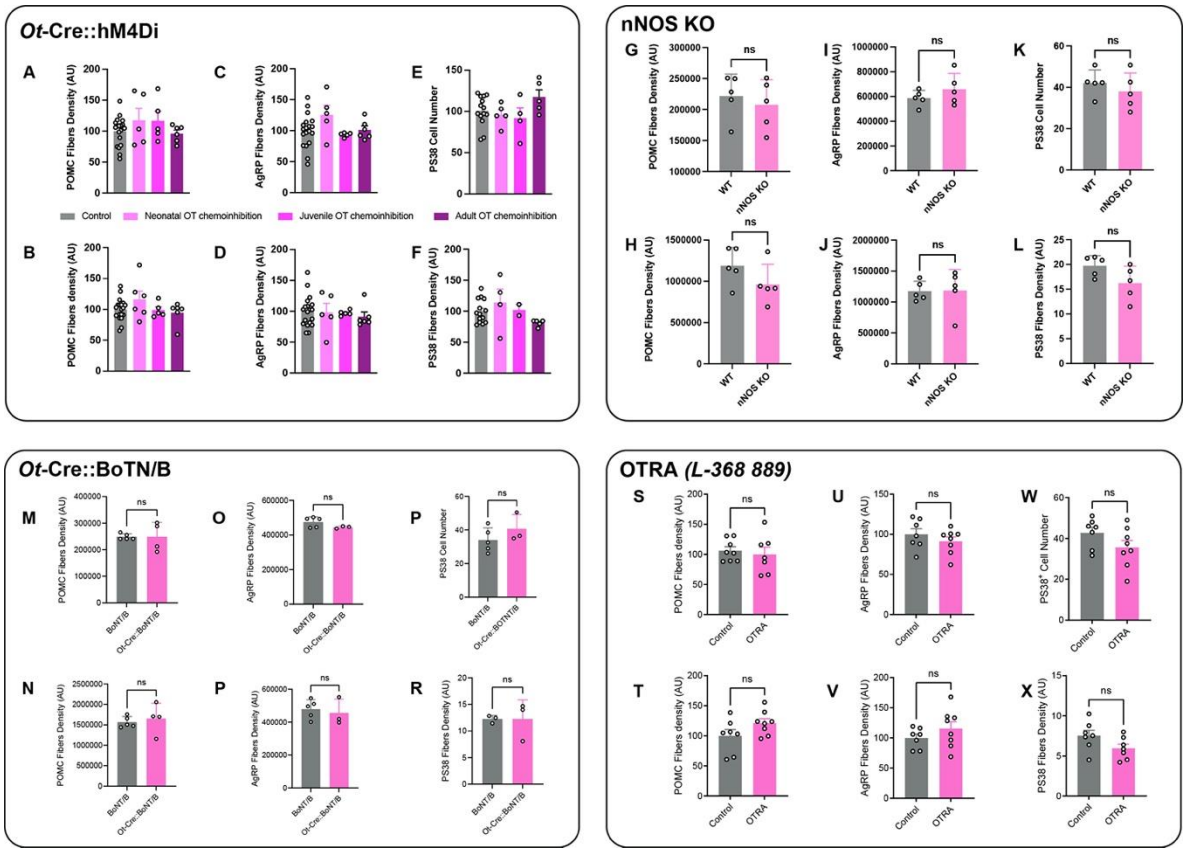

B
Ctrl
PVH
Dq
PVH
POMC Fibers density (AU)
*
C
Ctrl
PVH
Dq
PVH
Magel2 KO, hM3Dq-DREADD
Magel2 KO, ot-Cre::R26-hM3Dq-DREADD
AgRP Fibers Density (AU)
D
Ctrl
DMH
Dq
DMH
POMC Fibers density (AU)
ns
E
Ctrl
DMH
Dq
DMH
AgRP Fibers Density (AU)
**
F
Ctrl
PVH
Dq
PVH
PS38+ Cell Number
G
Ctrl
LHA
Dq
LHA
PS38 Fibers Density (AU)

Figure 9. Neonatal chemogenetic activation of OT neurons rescues POMC circuit deficits in *Magel2* KO mice. (**A**) Description of the animal model. (**B-E**) Representative images and quantification of (**B, D**) POMC and (**C, E**) AgRP fibers innervating the (**B, C**) paraventricular nucleus (PVH) and (**D, E**) dorsomedial nucleus (DMH) of R26-hM3Dq-DREADD (control) and *Ot*-Cre:: R26-hM3Dq-DREADD mice injected with Compound-21 neonatally (n = 5-6 animals per group). (**F, G**) Representative images and quantification of OT (PS38+) neurons and fibers innervating the (**F**) PVH and (**G**) lateral hypothalamic area (LHA), respectively, in R26-hM3Dq-DREADD (control) and *Ot*-Cre:: R26-hM3Dq-DREADD mice injected with Compound-21 neonatally (n = 5-3 animals per group). Data are presented as mean + SEM. **P* < 0.05. Scale bar, 200 μm.



Supplementary Figure 1. Manipulation of oxytocin neurons does not affect melanocortin circuits in female mice. Quantification of the density of (**A, B, G, H, M, N, S, T**) POMC and (**C, D, I, J, O, P, U, V**) AgRP fibers in the (**A, C, G, I, M, O, S, U**) PVH, and (**B, D, H, J, N, P, T, V**) DMH and quantification of (**E, K, P, W**) the number of OT neurons in the PVH and (**F, L, R, X**) the density of OT fibers in the LHA of control and (**A-F**) *Ot*-Cre::R26-LSL-hM4Di-DREADD female mice injected with Compound-21 neonatally, or during juvenile life, or during adulthood (n = 5-7 animals per group), (**G-L**) *nNOS* KO female mice (n = 5 animals per group), (**M-R**) *Ot*-Cre:: *BoNT/B* adult female mice (n = 5-3 animals per group), or (**S-X**) female mice injected with the OTR antagonist L-368,889 neonatally (n = 7-8 animals per group). Data are presented as means + SEM.

Résultats remarquables

Les principaux résultats de notre étude sur le rôle de l'OT dans le développement du système mélanocortinergique peuvent être listés de la façon suivante :

Période critique du développement : L'inhibition chémogénétique de l'activité des neurones à OT induit des défauts dans la mise en place des projections des neurones à POMC et AgRP specifiquement vers le PVH chez les souris mâles et ceci uniquement si la chémoinhibition a lieu pendant une période post-natale précoce, entre P0 et P7.

Rôle du NO : Le NO, un gaz neurotransmetteur diffusible produit par les neurones à OT, ne semble pas jouer un rôle central dans le développement des fibres à POMC et AgRP vers le PVH.

Effet de l'inhibition de l'activité sécrétoire des neurones à OT : L'expression de la toxine botulique, iBOT inhibant l'activité sécrétoire des neurones à OT induit un phénotype neuroanatomique similaire à celui observé dans le modèle chémogénétique, i.e., un défaut d'innervation du PVH par les fibres à POMC et AgRP. Cette observation renforce l'idée que la libération par exocytose par les neurones à OT est responsable de l'établissement des projections à POMC et AgRP vers le PVH.

Expression du récepteur à OTR dans l'hypothalamus durant le développement postnatal : Nous avons démontré que les neurones à AgRP et à POMC expriment le récepteur à OT (OTR) durant le développement postnatal (P0 à P25), une période qui coïncide avec le développement de leurs projections vers le PVH, les rendant potentiellement directement sensibles à l'OT produite par les neurones du PVH.

Effets neurotrophiques *in vitro* de l'OT : L'incubation d'explants de ARH avec de l'OT *in vitro* induit une croissance des projections axonale, suggérant que l'OT exerce un effet neurotrophique direct sur les axones issus du noyau arqué

Conséquences de l'inhibition pharmacologique du récepteur à l'OT : L'inhibition pharmacologique du récepteur à OT durant la période périnatale (P0-P7) induit des défauts dans l'établissement des projections à POMC vers le PVH, suggérant un rôle crucial de la signalisation ocytocinergique dans le développement de ces projections. Le mécanisme d'action expliquant les défauts de projection à AgRP observés dans le modèle d'inhibition chémogénétique reste inexpliqué mais semble indépendant de la signalisation OT et dépendre d'autres facteurs libérés par les neurones à OT, comme le montre notre étude sur le modèle iBOT.

Rétablissement des projections dans le modèle *Magel2*$^{tm1.1Mus}$ de SPW : Suite à nos résultats, l'activation chémogénétique des neurones à OT durant la période périnatale chez le modèle *Magel2*$^{tm1.1Mus}$ permet de rétablir des projections POMC comparables à celles observées chez la souris normale.

En conclusion, notre étude souligne pour la première fois un nouveau rôle des neurones à OT dans le développement du système mélanocortinergique en particulier en influençant les projections des neurones à POMC et AgRP vers le PVH, au cours d'une période post-natale critique. Nous avons également clarifié une partie des mécanismes neurobiologiques complexes par lesquels les neurones à OT influencent les circuits mélanocortinergiques en développement, soulignant le rôle de l'exocytose de l'OT et de la signalisation dépendante des OTR. Dans la mesure ou la destruction génétique des composants du complexe SNARE dans les neurones à OT ou l'inhibition pharmacologique des récepteurs à l'OT altère également le développement des circuits mélanocortinergiques. Enfin, nous démontrons que la chémoactivation des neurones OT chez les souris *Magel2* KO restaure les projections des neurones à POMC, indiquant que les dysfonctionnements de cette signalisation contribuent aux perturbations neurodéveloppementales observées chez ces souris (Figure 15).

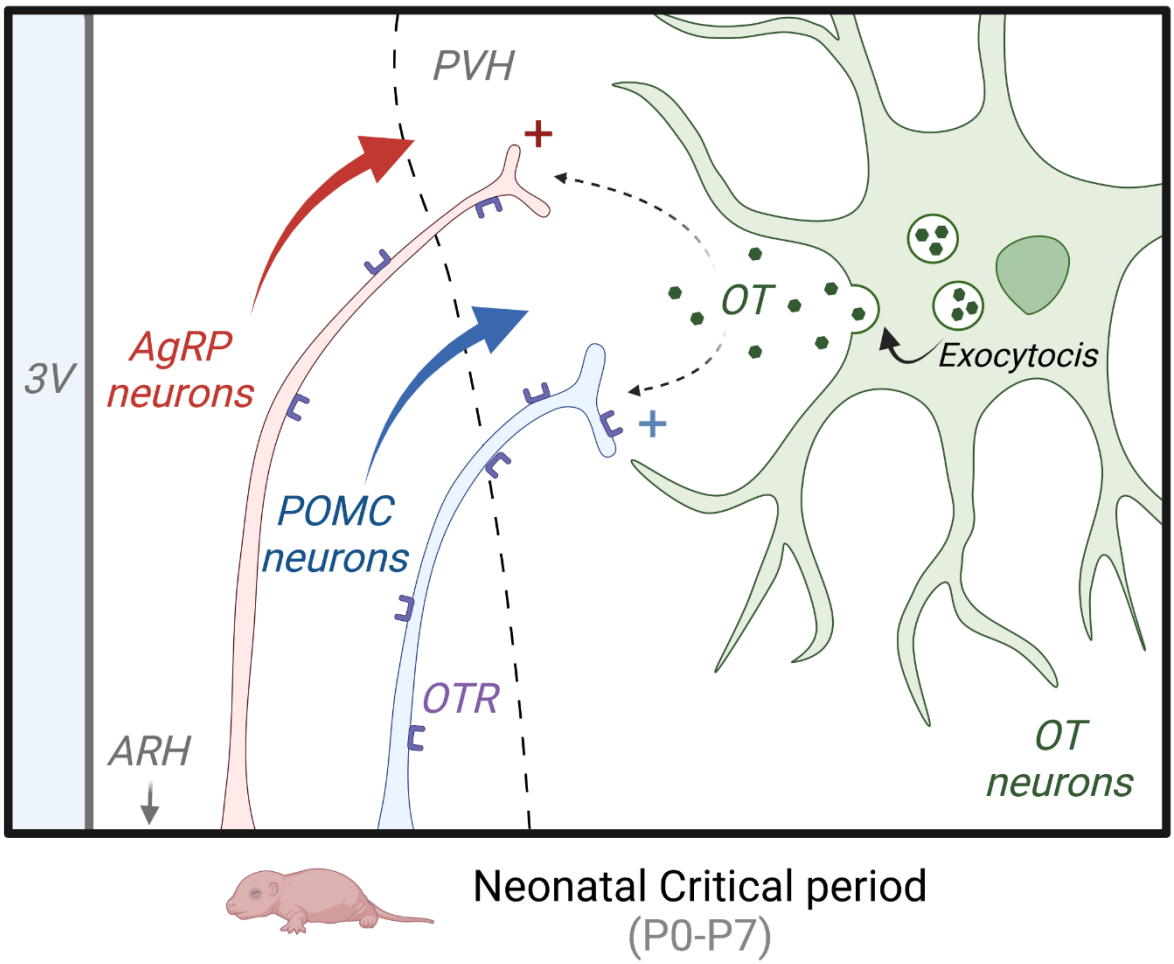


Figure 15 : Représentation graphique des conclusions de l'article 2 : Les neurones à ocytocine influancent le dévleoppement des projections POMC et AgRP vers le PVH durant la période critique néonatal (P0-P7) par un mécanisme dépendant de l'exocytoce et de la signalisation OTR.

DISCUSSION

Redondance fonctionnelle entre *Magel2* et *Necdin*

Nous avons initialement développé le modèle *Madin* KO pour éviter une redondance fonctionnelle potentielle entre les gènes *Magel2* et *Necdin*, qui pourrait masquer certains traits phénotypiques chez les souris KO uniques pour chacun de ces gènes.

Nous avons d'abord confirmé que les deux gènes sont co-exprimés dans le cerveau tout au long de la vie et co-régulés, partageant potentiellement un enhancer commun. Plus important encore, nous avons montré que lorsque *Magel2* est supprimé, l'expression de *Necdin* est multipliée par 1,5 à 2, et vice-versa. Une telle surexpression pourrait induire un mécanisme compensatoire.

En dehors de ces effets compensatoires dans les modèles simples KO, une surexpression de *Necdin* ou de *Magel2* pourrait induire ou exacerber des phénotypes inattendus et indépendants du SPW dans les modèles simples KO pour *Magel2* et *Necdin*. En effet, il a été rapporté qu'une surexpression de *Necdin* induisait des comportements liés aux TSA, probablement dus au déséquilibre cortical excitateur-inhibiteur (Tamada et al., 2021). De même, la surexpression de la région N-terminale de *Magel2* est létale sur le plan embryonnaire ou néonatal, ce qui indique des effets toxiques de la surexpression de la protéine tronquée, bien que la production normale d'une protéine tronquée de Magel2 ne soit pas létale (Ieda et al., 2020).

Ainsi, le modèle de souris *Madin* KO, avec une délétion des deux gènes, est génétiquement et phénotypiquement beaucoup plus fiable et pertinent pour étudier le SPW car il élimine les mécanismes compensatoires et les phénotypes potentiels liés à une surexpression de l'un ou l'autre de ces gènes lorsque l'un d'entre eux est délété.

Pertinence du phénotype *Madin* KO avec la progression clinique des symptômes du Syndrome de Prader-Willi

Parmi les premiers symptômes observés chez les bébés atteints du SPW, on note des difficultés d'alimentation, des déficits respiratoires et un faible poids corporel (Festen et al., 2007). Ces caractéristiques sont également observées chez les souris *Madin* KO. Les nouveau-nés *Madin* KO présentent une absence de lait dans l'estomac, une apparence cyanosée et un faible poids corporel de la naissance au sevrage. Cette absence de lait dans l'estomac a également été observée chez les souris *Magel2*$^{tm1.1Mus}$ KO et a été attribuée à un déficit de succion causé par un défaut de maturation et de libération de l'OT (Meziane et al., 2015; Schaller et al., 2010).

Le même défaut de maturation de l'OT, avec une accumulation de la forme intermédiaire de l'OT, a été observé chez les souriceaux *Madin* KO.

L'aspect cyanosé des bébés atteints du SPW est retrouvé chez les nouveau-nés *Madin* KO. Cette détresse respiratoire a été largement étudiée chez les souris *Necdin*$^{tm1.1Mus}$ KO à différents âges (Muscatelli et al., 2000, p. 200), se manifestant par des apnées fréquentes, des rythmes respiratoires irréguliers en condition basale et une réponse ventilatoire altérée à l'hypercapnie (Zanella et al., 2008). Chez les souris *Madin* KO adultes, des différences dans les paramètres ventilatoires ont également été observées dans des conditions normales, ainsi qu'une réponse atténuée à l'hypercapnie.

Notre modèle *Madin* KO semble donc mimer en partie les principaux phénotypes observés dans la phase précoce du SPW. Cependant, l'une des caractéristiques principales du syndrome est la progression des symptômes au cours du développement (Munné-Miralvés et al., 2020). Les déficits moteurs et, peut-être sensoriels, sous-jacents à l'hypotonicité des nourrissons atteints du SPW tendent à disparaître plus tard dans l'enfance (Burman et al., 2001). Chez les petits *Madin* KO, nous n'observons pas de déficits moteurs significatifs, mais nos résultats suggèrent fortement un retard dans la maturation des modalités sensorielles du toucher et de la proprioception.

Les souris *Madin* KO présentent également des altérations neurodéveloppementales. Nous avons noté une réduction de la densité des fibres immunoréactives pour la POMC dans le PVH et le DMH chez les souris mâles, mais pas chez les souris femelles. Les mêmes altérations neuroanatomiques ont étés décrites dans le modèle *Magel2* KO Une diminution du nombre de neurones à GnRH dans les bulbes olfactifs a aussi été observée. Une diminution qui fait échos, bien que différente, à la diminution globale du nombre de neurones GnRH retrouvée dans le cerveau du modèle *Necdin* KO (N. L. G. Miller, Wevrick, et Mellon 2009).

Les troubles comportementaux, comme l'anxiété, les TSA et les crises, sont présents tout au long de la vie des patients et constituent une composante importante du SPW (Boer et al., 2002; Whittington et al., 2004). L'anxiété, les interactions avec des objets nouveaux ou les interactions sociales sont altérées chez les souris *Necdin* et *Magel2* KO, avec une variabilité dans la sévérité du phénotype (Fountain et al., 2017; Mercer and Wevrick, 2009; Meziane et al., 2015; Schaaf et al., 2013). Les souris *Madin* KO montrent une préférence pour l'objet nouveau par rapport à un objet familier et pour une souris congénère par rapport à une cage vide. Cependant, l'intérêt pour l'objet nouveau ou le temps passé à sociabiliser est réduit par rapport aux souris contrôles, de manière similaire aux souris *Necdin* KO (Muscatelli et al., 2000).

L'hypogonadisme et le retard de la puberté sont souvent signalés chez les patients atteints du SPW (Crinò et al., 2003), mais sont souvent très peu étudiés ou absents dans les modèles *Magel2* KO et *Necdin* KO. Chez nos animaux *Madin* KO, nous rapportons un retard de la mise en place de la puberté, bien que le cycle œstral soit conservé chez les souris *Madin* KO femelles.

Un retard de croissance dû à un déficit en hormone de croissance entraîne, le plus souvent, une petite taille chez les enfants atteints de SPW. Ce phénotype et généralement associé avec un déficit notable de la sécrétion de GH, qui tend à s'aggraver avec l'âge (Burman et al., 2001). Plusieurs modèles simple KO *Magel2* ont rapporté un phénotype de retard de croissance similaire (Ieda et al., 2020; Kozlov et al., 2007). Chez nos animaux *Madin* KO, nous montrons également un retard de croissance caractérisé par un poids corporelle inferieur avant le sevrage associé à une taille plus petite chez les femelles.

Les difficultés d'alimentation observées durant la petite enfance chez les patients atteints du SPW sont remplacées progressivement par une hyperphagie, conduisant au développement de l'obésité. Cependant, les souris *Madin* KO présentent une réduction du poids corporel et de la composition de la masse grasse, avec un dimorphisme sexuel, contrastant avec les caractéristiques d'hyperphagie et d'obésité souvent observées chez les individus atteints du SPW. Bien que décevant, ce résultat n'est pas surprenant, car cette progression est partiellement reproduite dans d'autres modèles murins du SPW. Par exemple, une souche de souris *Necdin* KO (fond ICR) devient obèse avec un régime riche en graisses (Fujiwara et al., 2012), tandis que les autres modèles de souris ont tendance à être plus maigres que les animaux témoins issus des mêmes portées. Les modèles de souris *Magel2* KO ne deviennent pas obèses, mais ont tendance à prendre plus de poids après le sevrage (Bischof et al., 2007). En outre, dans ces modèles, les études ont rapporté des résultats contradictoires, certaines indiquant seulement de légères augmentations ou diminutions de la prise alimentaire chez les souris *Magel2*-KO, et des altérations de l'activité locomotrice spontanée ont été partiellement documentées. Concernant notre modèle *Madin* KO nous n'avons constaté aucune modification dans la prise alimentaire, l'activité locomotrice ou le RER qui pourrait expliquer ce phénotype plus léger. La piste d'une activité thermogénique plus importante a également été écartée, car la température des tissus adipeux bruns des souris *Madin* KO est comparable aux souris WT. De plus, des observations précédentes sur des souris *Magel2* KO n'ont rapporté aucune différence dans la glycémie basale et un test de tolérance au glucose légèrement altérée. Cependant, les souris *Madin* KO mâles et femelles adultes présentent des niveaux de glycémie basale inférieurs à ceux de leurs

compagnons de portée respectifs. De plus, les souris *Madin* KO mâles présentent une tolérance accrue à l'injection de glucose, indépendamment de la sécrétion d'insuline.

Variation phénotypique dans le modèle *Madin* KO : pistes potentielles

La première variabilité observée dans notre modèle de souris *Madin* KO concerne principalement le dimorphisme sexuel. En effet, le phénotype semble être globalement plus léger chez les souris femelles que chez les souris mâles. De plus, chez les souris femelles adultes, le phénotype est moins présent et tend même à disparaître après la puberté, suggérant un rôle potentiellement protecteur des œstrogènes. Cette gradation dans la sévérité des symptômes en fonction du sexe est également retrouvée chez les patients atteints du SPW. Par exemple, concernant l'infertilité et l'hypogonadisme, bien que les hommes atteints du SPW soient généralement infertiles, quelques rares cas de fertilité existent chez les femmes (Akefeldt et al., 1999; Greco et al., 2021; Schulze et al., 2001).

Notre modèle *Madin* KO ne reproduit pas complètement les conditions nécessaires au développement de l'obésité spécifique aux stades avancés du SPW (Proffitt et al., 2019; Schrander-Stumpel et al., 2004). D'autres gènes ou interactions génétiques peuvent expliquer ce phénomène. Par exemple, dans les modèles de simple délétion *Necdin* ou de *Magel2*, une expression stochastique très faible de l'allèle maternel a été détectée pour *Necdin* (Rieusset et al., 2013) et *Magel2* (Matarazzo et al., 2013). Cette faible expression était suffisante pour atténuer le phénotype (Rieusset et al., 2013), ce qui pourrait expliquer la variabilité des phénotypes. Il est également possible que la perte de fonction combinée de *Magel2* et *Necdin* pourrait être compensée par d'autres membres de la famille des MAGE, comme *MageD1*. Il est également probable que les phénotypes d'obésité soient le fruit d'interactions plus complexes des gènes de la région SPW comme les *Snords*.

L'un des aspects les plus intéressants de nos résultats obtenus dans notre modèle murin est que notre phénotype pourrait ne pas apparaître en raison de facteurs strictement associés à l'environnement dans lequel nos animaux sont maintenus. Nous avons produit plusieurs cohortes de souris *Madin* KO dans différentes animaleries, toutes sur le même fond génétique C57Bl6/J, et avons observé une variabilité dans la sévérité du phénotype. Cette variabilité phénotypique pourrait être associée aux différents niveaux de statut sanitaire, en termes de pathogènes et de stérilité de la nourriture et de l'eau. En effet, en l'absence de pathogènes et avec une nourriture stérile (*i.e.*, animaux elevés en zone EOPS), le phénotype est beaucoup moins sévère (0 % de létalité) que dans une animalerie conventionnelle (60 % de létalité des mutants par rapport aux contrôles des mêmes portées). Il est intéressant de noter que les gènes

MAGE, conservés chez tous les eucaryotes, jouent un rôle dans l'adaptation au stress (stress nutritionnel, stress génotoxique, chaleur, etc.) (Florke Gee et al., 2020). Dans les conditions stériles des animaleries EOPS, les animaux sont par définition moins sujets aux stress environnementaux (*e.g.*, bactéries, virus, climat, etc.), ce qui peut masquer les déficits induits par l'absence de ces gènes. Ainsi, le phénotype des souris *Madin* KO pourrait être fortement dépendant de l'environnement (y compris la nourriture et l'eau), et cette question devrait être sérieusement prise en compte dans toutes les animaleries, où l'absence de pathogènes ne reflète pas les conditions réelles de vie.

Chez les patients atteints du SPW, l'environnement constitue également un défi. Par exemple, l'insuffisance respiratoire est la cause la plus fréquente de décès (73 % des nourrissons) (Butler et al., 2017) et survient toujours dans un environnement stressant (infection des voies respiratoires, hypercapnie, hypoxie) qui révèle leur incapacité à adapter une réponse respiratoire. Il est fort possible que l'exposition de ces animaux à un environnement plus stressant et représentatif des conditions normales dans lesquelles évoluent les patients atteints du SPW induise un phénotype plus sévère. Cela pourrait constituer une clé pour comprendre le développement de l'obésité, offrant ainsi une perspective de recherche ultérieure.

Toujours dans le contexte de l'environnement EOPS, une attention particulière devrait également être portée au rôle du microbiote intestinal. De plus en plus de données montrent un lien fort entre le microbiote intestinal, le développement des TSA et les troubles du comportement alimentaire (Buffington et al., 2016). L'évaluation de la flore bactérienne des patients et de nos modèles dans différentes conditions d'hébergement pourrait également être une piste intéressante pour comprendre si elle participe à l'amplification des symptômes du SPW.

Comparaison des modifications transcriptomiques entre le modèle *Madin* KO et les patients atteints du SPW

Notre étude de séquençage ARN transcriptionnel de l'hypothalamus de souris adultes *Madin* KO et leurs homologues sauvages ont révélé des différences significatives dans l'expression des gènes en fonction du cycle nycthéméral (jour/nuit). Plus précisément, 681 des 683 gènes qui présentent normalement une variation jour/nuit perdent cette variation et 78 gènes acquièrent une variation jour/nuit dans l'hypothalamus des souris *Madin* KO, indiquant une perturbation des rythmes circadiens. Durant la journée, 261 gènes montrent une expression modifiée (68 régulés à la baisse et 193 à la hausse), associés à des fonctions telles que le développement et la différenciation. Pendant la nuit, 1295 gènes présentent une régulation (874 à la baisse et 421

à la hausse). Environ 17% des gènes modifiés chez les *Madin* KO pourraient être des gènes à rythme circadien, la majorité (99%) des gènes exprimés différemment selon le moment de la journée, dans les groupes WT et KO, dépendent de l'expression de *Magel2*/*Necdin*. L'analyse fonctionnelle via Panther indique que ces gènes impactés sont liés à des fonctions cruciales comme le développement du système nerveux, la différenciation cellulaire et l'adhésion cellule-cellule (annotations enrichies les plus significatives dans les processus biologiques de Gene Ontology).

Pour approfondir notre analyse, nous avons comparé les variations d'expression géniques observées dans l'hypothalamus de notre modèle *Madin* KO avec celles des patients atteints du SPW rapportées dans l'étude de Bochukova et ses collègues (Bochukova et al., 2018). Parmi les gènes communément dérégulés dans notre modèle *Madin* KO et chez les patients, nous avons identifié 21 gènes surexprimés, 77 présentant une dérégulation inverse et 87 sous-exprimés dans les deux cas. La sous-expression commune de 87 gènes, à la fois dans le modèle *Madin* KO et chez les patients SPW, est particulièrement intéressante. Ces gènes sont impliqués dans des processus biologiques cruciaux tels que l'adhésion cellulaire, l'établissement des projections cellulaires, la synapse glutamatergique, la formation de l'axonème, ainsi que la constitution des complexes de la dynéine et de la caténine (Figure 16). La perturbation de ces processus peut contribuer aux dysfonctionnements neuronaux et comportementaux observés dans le SPW. La perturbation de l'adhésion cellulaire et de l'établissement des projections cellulaires ainsi que la dérégulation des gènes impliqués dans la formation de l'axonème et complexes dynéine/caténine, des structures essentielles pour le transport intracellulaire et la stabilité cellulaire, peut entraîner des problèmes de motilité et de signalisation, affectant divers aspects du développement et la connectivité neuronale. Ces résultats très intéressants pourraient indiquer une participation de ces gènes dans les anomalies des projections mélanocortinergiques observées dans notre modèle *Madin* KO.

De manière générale, ces résultats montrent que la délétion combinée des gènes *Magel2* et *Necdin* affecte de manière marqué les gènes impliqués dans les rythmes circadiens et les fonctions biologiques associées dans l'hypothalamus. La perte de l'expression différentielle jour/nuit pour la majorité des gènes chez les souris *Madin* KO suggère une perturbation des mécanismes de régulation circadienne. Cela pourrait impacter divers processus biologiques essentiels, notamment le développement neurologique et les comportements sociaux, soulignant le rôle crucial de *Magel2* et *Necdin* dans la régulation circadienne et les fonctions hypothalamiques. La correspondance entre les dérégulations observées dans l'hypothalamus des souris *Madin* KO et celui des patients atteint SPW renforce l'utilité de ce modèle pour

étudier les mécanismes de la maladie et pour tester des interventions thérapeutiques potentielles.

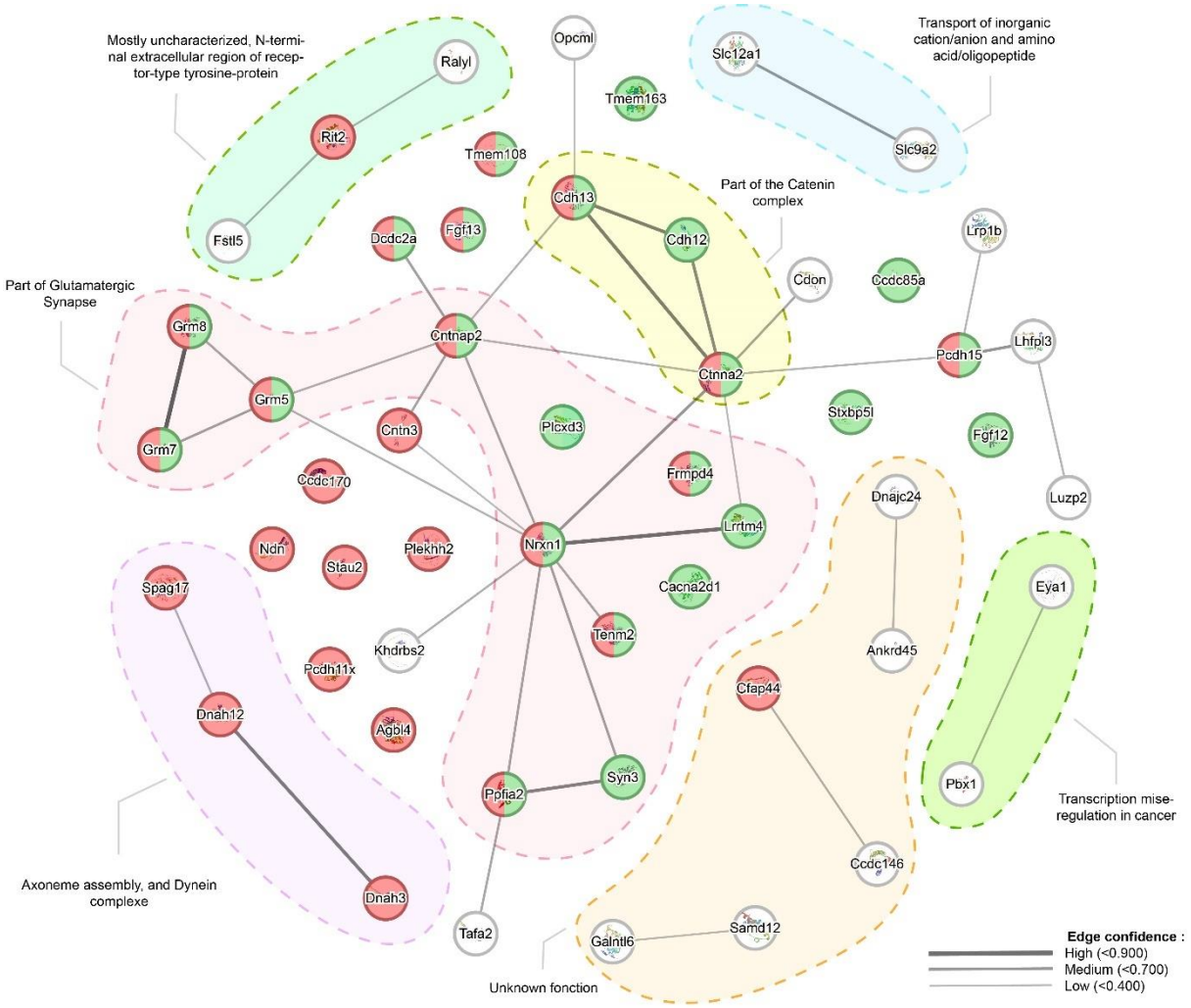


Figure 16 : Gènes communs régulés à la baisse chez les patients atteints du syndrome de Prader-Willi et dans le modèle murin *Madin* KO. Les nœuds verts indiquent les gènes impliqués dans les jonctions cellulaires, tandis que les nœuds rouges représentent les gènes associés aux projections cellulaires. L'épaisseur de la jonction entre les nœuds indique que les gènes contribuent conjointement à une fonction commune ; cela ne signifie pas nécessairement que leurs protéines se lient physiquement l'une à l'autre. DATA from SPW patient obtain from Bochukova EG et al, Cell Rep. 2018. Schéma basé sur des données provenant de la ressource de données de base du consortium © STRING.

Les neurones à ocytocine favorisent par un mécanisme dépendant de l'exocytoce le développement des circuits mélanocortinergiques au cours d'une période critique néonatale

Notre seconde étude a démontré que l'inhibition chémogénétique des neurones exprimant l'OT pendant la période néonatale, et pas durant la période juvénile ni adulte, induit une diminution des projections des neurones à POMC et à AgRP vers le PVH et pas vers d'autres noyaux cibles. Ces résultats coïncident avec la fenêtre de développement des projections des neurones à POMC et à AgRP vers le PVH, *i.e.*, au cours des deux premières semaines de vie postantale. Concernant le mécanisme par lequel les neurones à OT influencent le développement des projections à POMC et à AgRP, notre première attention s'est portée sur le NO, un gaz connu pour jouer un rôle dans la guidance et la dynamique axonale (Castellani et al., 2002; Tojima et al., 2009; Welshhans, 2007). Des études précédentes de notre laboratoire ont pu démontrer que des cellules dans le PVH des souris à P10 expriment le NO, et nous avons pu confirmer qu'une partie de ces cellules co-exprime également l'OT, faisant potentiellement du NO un bon candidat pour expliquer les effets neurodéveloppementaux que nous observons. Cependant et contrairement à nos attentes, aucune altération dans le développement des projections neuronales de la POMC et de l'AgRP vers le PVH n'a pu être constatée dans le modèle *nNOS* KO. Ces résultats suggèrent que la fonction du NO peut être redondante ou compensée par d'autres facteurs dans le contexte spécifique du développement du système mélanocortinergique et il n'est probablement pas le facteur responsable des effets neurodéveloppementaux que nous observons dans le modèle chémogénétique.

Les neurones à OT expriment et sécrètent activement par exocytose une grande variété de neuropeptides et neurotransmetteurs parmi lesquelles l'OT, la vasopressine, le glutamate, facteurs pouvant potentiellement être impliqués dans la croissance axonale des neurones à POMC et AgRP. Notre étude plus approfondie utilisant le modèle iBOT a fourni des preuves supplémentaires que l'inhibition de la sécrétion vésiculaire des neurones OT entraîne une réduction significative des projections de neurones à POMC et à l'AgRP dans le PVH. Ce résultat récapitule efficacement le phénotype précédemment observé dans les modèles chémogénétiques et soutient fortement notre hypothèse selon laquelle les molécules spécifiquement sécrétées exocytose par les neurones exprimant l'OT sont cruciales dans la médiation de ces effets développementaux. Nous devons encore confirmer l'efficacité de l'inhibition de la sécrétion vésiculaire dans notre modèle iBOT pour nous assurer que les effets neurodéveloppementaux que nous observons ne sont pas amoindris par une exocytose inhibée dans un nombre limité de neurone à OT. Pour adresser cette limite dans un premier temps et

dans la mesure où le principal facteur sécrété par ces neurones est l'OT, nous avions envisagé doser les niveaux d'OT sanguin. Toutefois, la méthodologie de dosage de l'OT manquant de consensus et une absence de lien clairement établi entre l'OT présente dans le sang et celle dans le cerveau ne nous ont pas permis d'adresser cette question pour le moment.

Rôle de l'ocytocine dans le développement des circuits mélanocortinergiques au cours d'une période critique néonatale.

En accord avec la littérature existante qui soutient un rôle direct de l'OT dans le développement neuronal (Grinevich et al., 2014; Pekarek et al., 2022; Tyzio et al., 2006), notre étude fournit des preuves supplémentaires de l'implication directe de l'OT parmi tous les facteurs sécrétés par les neurones à OT comme facteur principal à l'origine de ces effets neurodéveloppementaux. Notamment, nous démontrons que l'expression de l'*Otr* dans l'hypothalamus augmente au cours du développement postnatal, atteignant un maximum d'expression autour du 5e jour postnatal, *i.e.*, période critique pour le développement des neurones à POMC et AgRP. Parallèlement, les neurones à *Pomc* et a *Agrp* expriment l'*Otr* au cours du développement postnatal, suggérant que l'OT exerce son rôle neurodeveloppemental sur le système mélanocortinergique directement via son récepteur.

Les résultats de notre modèle d'inhibition pharmacologique des neurones OT pendant cette période postnatale critique, reproduit partiellement les effets observés dans notre modèle chémogénétique et confirme le rôle de la signalisation dépendante de l'OT. Nous avons observé une diminution significative de l'innervation du PVH par les neurones à POMC chez les souriceaux traités avec l'OTRA. Cependant, ce modèle n'a pas reproduit toutes les altérations observées, notamment en ce qui concerne les projections des neurones à AgRP, ce qui suggère que les neurones OT pourraient influencer le développement de ces neurones par une voie indirecte ou via d'autres facteurs produits par les neurones OT.

En résumé, nos résultats soulignent pour la première fois un nouveau rôle significatif des neurones à OT dans le développement du système mélanocortinergique au cours de la période post-natale critique (P0-P7). Nous avons également clarifié une partie des mécanismes neurobiologiques complexes par lesquels les neurones à OT influencent le circuit mélanocortinergique en développement, soulignant le rôle de l'exocytose de l'OT et de la signalisation dépendante des OTR. Nous mettons également en lumière la complexité des mécanismes par lesquels l'OT influence le développement neuronal.

Pertinence des effets neurodéveloppementaux de l'ocytocine dans le contexte du Syndrome de Prader-Willi

Notre étude démontre que dans des conditions pathologiques présentant des altérations des projections des neurones à POMC et une hypoactivité des neurones à OT, comme dans les modèles de souris *Magel2* KO du SPW (Maillard et al., 2016), la stimulation des neurones à OT durant la période post-natal critique P0-P7 peut restaurer des projections POMC normales au sein du PVH. Dans le futur, cette expérience pourrait être reproduite dans notre nouveau modèle *Madin KO*, présentant le même type d'altérations, pour confirmer ces effets dans notre modèle plus représentatif du syndrome. Notre découverte suggère l'existence de périodes postnatales critiques durant laquelle l'activation des neurones à OT est nécessaire au développement normal des projections des neurones à POMC vers le PVH, et renforce la nécessité d'interventions thérapeutiques ciblées sur ces périodes dans le contexte du SPW.

Au-delà du contexte du SPW, des altérations du système mélanocortinergique sont également observées dans d'autres modèles murins d'obésité. Par exemple, dans les modèles de souris nées de mères obèses, les petits sont plus à risque de développer de l'obésité et des troubles comportementaux (Park et al., 2020). Ces petits présentent également des altérations du développement du système mélanocortinergique vers le PVH (Park et al., 2020) et une diminution du nombre de neurones à OT (Buffington et al., 2016). Ainsi, nos résultats obtenus sur le modèle *Magel2* KO pourraient être appliqués et étendus à ces modèles, offrant ainsi une approche thérapeutique plus large à d'autres pathologies d'origines non génétiques.

Rôle potentiel de l'ocytocine après la période périnatale et devenir métabolique des modèles OTRA et d'inhibition chémogénétique.

Le profil métabolique unique des animaux OTRA reste particulièrement intrigant. Bien que la principale altération résultant de l'injection d'OTRA concerne les fibres anorexigènes de la POMC, nos animaux présentent une augmentation de la prise alimentaire et un métabolisme centré sur les hydrates de carbone, mais ont conservé un poids corporel similaire à celui des animaux témoins, sans augmentation de l'activité ambulatoire globale. Ces résultats sont amoindrit par rapport à ce qui a été précédemment reporté dans les modèles présentant des altérations de la voie de signalisation de la POMC, *i.e.* les souris *Pomc* KO ou avec injection d'antagoniste à l'α-MSH, qui présentent généralement une augmentation du poids corporel et de la prise alimentaire (Challis et al., 2004; Yaswen et al., 1999).

L'OT est connue pour agir sur de multiples réseaux neuronaux régulant la composition corporelle et la prise alimentaire, ce qui soulève des questions sur les autres effets potentiels de l'inhibition de l'OT en dehors des neurones du ARH. L'OT, par exemple, est impliquée dans la voie mésolimbique (noyau accumbens et aire tegmentale ventrale) dans le contrôle de la consommation d'aliments appétants, avec des effets supposés être modulés par des interactions avec le système dopaminergique pour moduler les réponses aux stimuli sociaux externes (Shamay-Tsoory and Abu-Akel, 2016).

Au-delà de la période périnatale P0-P7, l'inhibition chémogénétique de l'activité des neurones à OT n'as pas d'effet sur le développement des projections POMC et AgRP dans les autres cohortes juvéniles (P25-P32) et adultes (P63-P70). Cependant, au cours de ma thèse, j'ai constaté que la chemoinhibition des neurones à OT pendant la période juvénile et adulte entraîne une augmentation significative du poids corporel chez les souris mâles à P100 (Figure 17A). Dans la cohorte juvénile, cette augmentation de la masse corporelle est associée à une augmentation de la masse adipeuse péri-gonadique (Figure 17B) et de la taille moyenne des adipocytes (Figure 17C-E). Aucune différence significative n'a été observée chez les souris femelles pour ces paramètres. L'inhibition de l'activité des neurones à OT pendant la période juvénile semble donc affecter le poids corporel en lien avec le développement du tissu adipeux. Cette période correspond au sevrage, caractérisé par un changement alimentaire important, passant du lait maternel à une alimentation solide et à la fin de la maturation du tissu adipeux. En effet, le tissu adipeux blanc est l'organe exprimant les plus haut niveaux d'*Otr* (Sun et al., 2019), et se développe également au cours des premières semaines de vie postnatale (Han et al., 2011). Il est donc possible que l'inhibition des neurones à OT interfère avec le développement du tissu adipeux durant cette période de transition.

En résumé, le phénotype neurodéveloppemental et métabolique des souris OTRA suggère que la manipulation des voies OT au début de la vie peut influencer la programmation d'autres circuits cérébraux qui régulent la prise alimentaire et la composition corporelle. Ces modifications peuvent inclure des changements dans les habitudes alimentaires, l'activité locomotrice, ou une interaction entre les comportements alimentaires et les comportements sociaux ou reproductifs. De plus, l'OT influence également les tissus périphériques, notamment le tissu adipeux, qui joue un rôle crucial dans la régulation du métabolisme et de l'énergie corporelle. Pour mieux comprendre ces phénotypes, il est nécessaire de réaliser des études comportementales et métaboliques plus approfondies. Les résultats préliminaires obtenus lors

de ma thèse seront poursuivis et complétés ultérieurement en collaboration avec les équipes de Françoise Muscatelli, dans le cadre d'une étude plus détaillée incluant le phénotype comportemental et les effets sur les tissus périphériques de des cohortes juvénile et adulte.

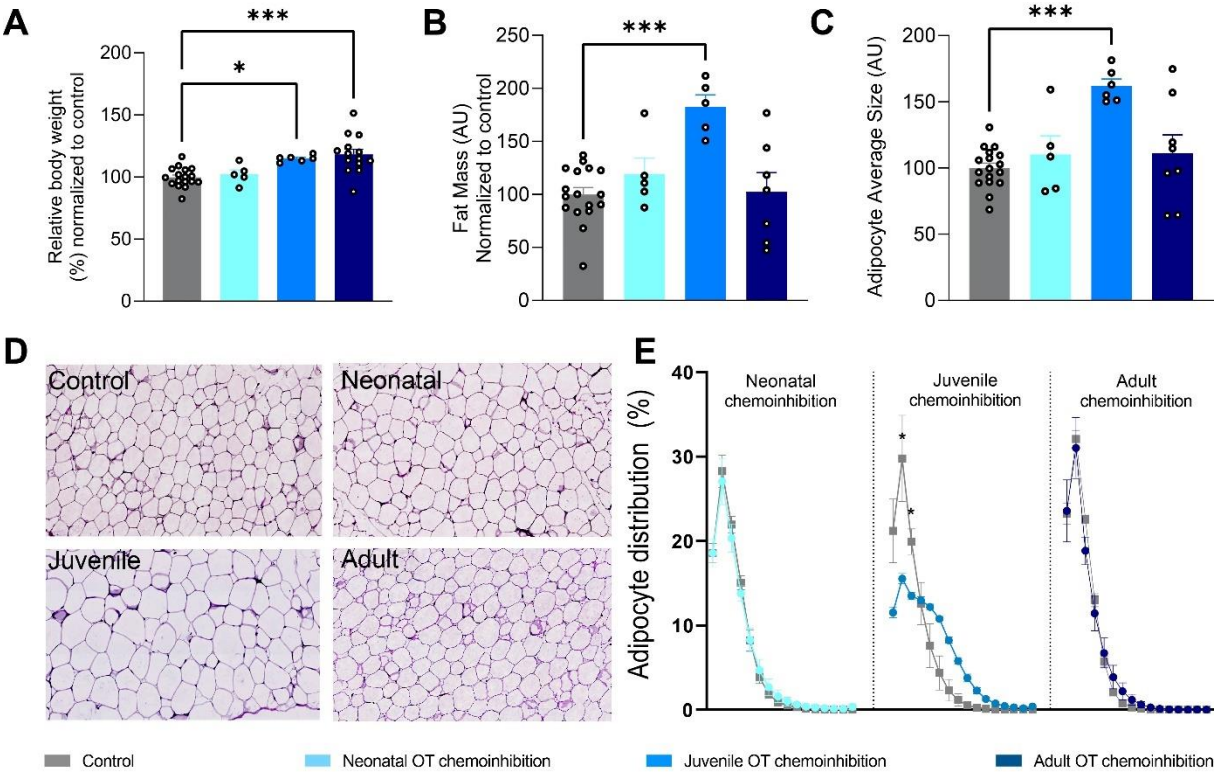


Figure 17 : L'inhibition chimiogénétique des neurones à ocytocine pendant la période juvénile et adulte induit des perturbations métaboliques chez les souris mâles. (**A**) Poids corporel, (**B**) poids du tissu adipeux périgonadique et (**C**) taille moyenne des adipocytes périgonadiques chez des souris hM4Di-DREADD et ot-Cre: : R26-hM4Di-DREADD traitées avec le composé-21 entre P0 et P7 (traitement néonatal), P25 et P32 (traitement juvénile) ou P63 et P70 (traitement adulte), toutes les données normalisées par rapport à hM4Di-DREADD, (**D**) Images représentatives de la coloration à l'hématoxyline-éosine (H&E) du tissu adipeux périgonadique, barre d'échelle 100µm. (**E**) Distribution de la taille des adipocytes chez des souris hM4Di-DREADD et ot-Cre::R26-hM4Di-DREADD âgées de 100 jours et traitées avec le composé-21 en période néonatale ou juvénile, . Les données sont exprimées en moyennes ± SEM. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du test t (*P <0.05, ** P <0.01, ***P<0.001)

Jusqu'à présent, la recherche s'était principalement intéressée aux effets transitoires induits par la perturbation du système ocytocinergique, ne constatant que de faibles effets sur la prise alimentaire immédiatement après l'injection d'antagonistes. Cependant, nos résultats d'inhibition chémogénétique pendant les périodes juvéniles et adultes, montrent que des dérégulations transitoires de l'activité des neurones à OT peuvent avoir des effets à long terme sur le devenir métabolique des animaux, suggérant un rôle plus large et persistant du système ocytocinergique dans la régulation du métabolisme.

Rôle potentiel de l'ocytocine durant la période anté-natale et atteinte placentaire chez les modèles *Magel2* KO

Bien que l'OT ne soit sécrétée sous sa forme mature qu'à la naissance et que les projections ocytocinergiques ne soient pas encore matures avant la naissance, deux points importants méritent d'être soulignés. Premièrement, l'OTR est exprimé dans le cerveau pour à partir de E14 et son expression augmente progressivement au court du développement jusqu'à P14-P19. D'un autre coté, l'expression de la forme immature de l'OT est detectée vers E16 (Grinevich et al., 2014). Bien qu'il n'ait pas encore été clairement démontré de rôle neurodéveloppementale des formes intermédiaires de l'OT, et il est tentant de postuler qu'elles pourraient participer au développement périnatal des neurones à POMC et AgRP.

Deuxièmement, peu avant et à la naissance, la mère produit de grandes quantités d'OT pour favoriser les contractions et l'accouchement. Il est possible que cette OT maternelle contribue également à la maturation et au développement du système mélanocortinergique. Bien que le fœtus soit protégé par la barrière placentaire, qui filtre entre le sang maternel et fœtal, il n'a pas encore été démontré si l'OT pouvait passer ou non la barrière placentaire. De plus, le placenta lui-même exprime l'OT et l'OTR de façons exponentielles en fin de grossesse (Kim et al., 2017). Au cours de cette thèse, j'ai eu l'opportunité d'étudier le placenta de souris *Magel2* KO. Le placenta est un organe très intéressant car il est constitué à la fois de parties d'origine fœtale et maternelle, il participe aux échanges entre le fœtus et la mère ainsi qu'au développement cérébral de l'enfant (Zeltser and Leibel, 2011) (Figure 18A). Le placenta exprime fortement *Magel2* (Boccaccio et al., 1999; Jiang et al., 2014), et nous avons constaté une désorganisation des vaisseaux de la zone d'échange labyrinthique du placenta chez les petits *Magel2* KO, ce qui pourrait indiquer une altération des communications entre la mère et le fœtus (Figure 18B). Étant donné que le SPW présente des caractéristiques phénotypiques intra-utérines (faibles mouvements et petit poids), il serait pertinent de porter notre attention sur l'environnement anténatal comme période impactante pour le développement de ce

syndrome. La désorganisation des vaisseaux labyrinthiques du placenta observée dans les *Magel2* KO soulève également la question du passage de l'OT maternelle et placentaire anténatale, une hypothèse qui mérite une investigation plus approfondie.

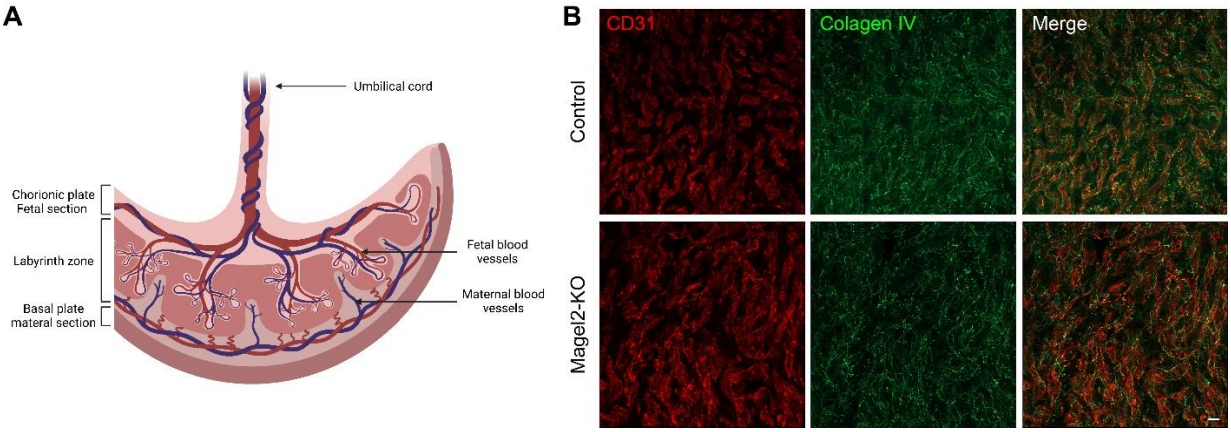


Figure 18 : Comparaison des zones labyrintique des placentas de souris *Magel2* KO et control. (**A**) Représentation schématique du placenta de souris, (**B**) Photo de la zone du labyrinthe, CD31 (rouge) Colagen IV (vert) comarquage spécifique des vaisseaux sanguins fœtaux et maternels. Image en projection 5µm à 40x, barre d'échelle 20µm. Images acquissent avec la collaboration de Thomas Chrétien, schéma réalisé avec BioRender.com.

Ces observations suggèrent que les formes intermédiaires de l'OT et l'OT maternelle anténatale pourraient jouer également des rôles significatifs dans le développement des phénotypes associés au SPW. Ces aspects devraient être explorés dans des recherches futures pour mieux comprendre leur contribution au syndrome.

CONCLUSION

Le premier objectif de ma thèse était de caractériser un nouveau modèle combinant la double délétion des gènes *Magel2* et *Necdin* pour le SPW. Nous avons démontré que le modèle de souris *Madin* KO présente non seulement une fiabilité génétique et phénotypique accrue, mais aussi une pertinence supérieure pour l'étude du SPW par rapport aux modèles simples de KO de *Necdin* ou *Magel2*. Les phénotypes observés chez nos souris *Madin* KO couvrent une large gamme de symptômes précoces du SPW, étroitement alignés avec ceux observés chez les patients. De plus La concordance entre les dérégulations de l'expression génétique observées dans notre modèle *Madin* KO et celles chez les patients atteints de SPW renforce l'utilité de ce modèle pour comprendre les mécanismes de la maladie. Nous alertons également que l'environnement dans lequel les animaux sont maintenus peut jouer un rôle crucial sur le phénotype des souris *Madin* KO et d'autres modèles de SPW. Un environnement sans pathogènes, bien que nécessaire pour maintenir la santé des animaux de laboratoire, pourrait cacher un phénotype plus sévère et plus proche des manifestations cliniques observées chez les patients. Néanmoins notre modèle *Madin* KO représente actuellement le modèle le plus adapté et le plus pertinent pour étudier le SPW et bénéficie d'une caractérisation phénotypique robuste pour explorer les mécanismes sous-jacents du SPW et évaluer de potentielles interventions thérapeutiques, en ouvrant de nouvelles perspectives pour la recherche future.

Le second objectif était d'étudier le rôle de l'OT sur le développement du système mélanocortinergique de l'hypothalamus et s'il existe une période d'action critique pour ces effets neurotrophiques de l'OT. Notre étude souligne pour la première fois un rôle des neurones à OT dans le développement du système mélanocortinergique en particulier en influençant les projections des neurones à POMC et AgRP vers le PVH, au cours d'une période post-natale critique. Nous avons également clarifié une partie des mécanismes neurobiologiques complexes par lesquels les neurones à OT influencent les circuits mélanocortinergiques en développement, soulignant le rôle de l'exocytose de l'OT et de la signalisation dépendante des OTR. Jusqu'à présent, la recherche s'était principalement intéressée aux effets transitoires induits par la perturbation du système ocytocinergique, ne constatant que de faibles effets sur la prise alimentaire immédiatement après l'injection d'antagonistes. Dans cette thèse nous montrons que des dérégulations transitoires de l'activité des neurones à OT peuvent avoir des effets à long terme sur le développement neuronal et le devenir métabolique des animaux, suggérant un rôle plus large et persistant du système ocytocinergique.

Ces travaux confirment non seulement le rôle essentiel des neurones exprimant l'OT dans le développement axonal, mais élargit également notre compréhension de leurs contributions étendues aux fonctions cérébrales et à la régulation métabolique. Notre étude ouvre de nouvelles voies de recherche en neurobiologie du développement et identifie des moments critiques et des cibles potentielles pour les interventions thérapeutiques dans les troubles métaboliques comme le SPW.

VALORISATION DE LA THESE ET ACTIVITES SUPPLEMENTAIRES

1. Publications

1. Soyoung Park, Amine M Belfoul ,Marialetizia Rastelli, Alice Jang, Magali Monnoye, Hosung Bae, Anna Kamitakahara, Patrick Giavalisco, Shan Sun, **Pierre-Yves Barelle**, Jasmine Plows, Cholsoon Jang, Michael I Goran, Sebastien Bouret (2023) Maternal low-calorie sweeteners consumption rewires hypothalamic melanocortin circuits via a gut microbial co-metabolite pathway - JCI Insight. 2023 May 22;8(10):e156397. doi: 10.1172/jci.insight.156397.

   Cette étude montre que la consommation maternelle d'édulcorants hypocaloriques (LCS) pendant la grossesse chez la souris entraîne une augmentation de l'adiposité et de l'intolérance au glucose chez la progéniture mâle adulte, affectant aussi leurs systèmes neuronaux impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. Cette étude a également identifié un métabolite, la phénylacétylglycine (PAG), dans le lait des mères nourries au LCS et dans le sérum de leurs petits, ce qui suggère que la PAG interviendrait dans les conséquences métaboliques et neurodéveloppementales durables observées chez la progéniture.

2. **Pierre-Yves Barelle*,** Alicia Sicardi*, Fabienne Schaller*, Françoise Muscatelli, Sebastien Bouret, Vincent Prévot « Phenotypic Characterization of a New Mouse Model of Prader-Willi Syndrome with Genetic Invalidation of both Magel2 and Necdin» -- JCI Insight (*co-premier auteur). Manuscrit en préparation

   Nous avons développé un nouveau modèle de souris à double knock-out (KO), nommé « Madin KO », en combinant des délétions des gènes Magel2 et Necdin pour mieux comprendre le syndrome de Prader-Willi (PWS). Ce modèle Madin KO, qui est plus pertinent génétiquement pour le SPW, présente un poids corporel inférieur, une masse grasse réduite, une tolérance au glucose améliorée, un retard de puberté et des déficits sensori-moteurs, ainsi qu'une maturation altérée des neurones de l'ocytocine et des circuits de mélanocortine perturbés, fournissant un modèle pré-clinique utile pour étudier les premières phases du syndrome.

3. **Pierre-Yves Barelle,** Fabienne Schaller, Soyoung Park, Emilie Caron, Jessica Klucznik, Phillipe Cioffi, Françoise Muscatelli, Sebastien Bouret Vesicle-mediated Oxytocin Release Promotes the Development of Melanocortin Circuits during a Neonatal Critical Period - Nature Metabolism. Manuscrit en préparation

   Cette étude porte sur les effets de l'ocytocine (OT) pendant les périodes critiques de la vie, sur le développement de l'hypothalamus et la régulation métabolique à long terme à l'aide de différents modèles murins. Cette étude à principalement identifié l'impact neurodéveloppemental des neurones OT pendant la période néonatale, révélant que le blocage de la fusion vésiculaire dans les neurones OT réduit la densité des fibres immunoréactives POMC et AgRP dans les noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus, confortant l'hypothèse d'un effet dépendant de l'OT sur le développement du système mélanocortinergique.

2. Présentations en congrès

2.1 Orales

1. Pierre-Yves Barelle, Alicia Sicardi Fabienne Schaller, Francoise Muscatelli, Sebastien G. Bouret, Vincent Prévot (2023) « Phenotypic Characterization of a New Mouse Model of Prader-Willi Syndrome with Genetic Invalidation of both Magel2 and Necdin » - LiL'N doC Day - Lille, France ET Journée thématique de la Société de Neuroendocrinologie, Rouen, France
2. Pierre-Yves Barelle, Fabienne Schaller, Francoise Muscatelli, Sebastien G. Bouret (2022) «Phenotypic Characterization of a New Mouse Model of Prader-Willi Syndrome with Genetic Invalidation of both Magel2 and Necdin » - LiL'N doC Day - Lille, France

2.3 Affichées

3. Pierre-Yves Barelle, Alicia Sicardi Fabienne Schaller, Francoise Muscatelli, Sebastien G. Bouret, Vincent Prévot (2023) « Phenotypic Characterization of a New Mouse Model of Prader-Willi Syndrome with Genetic Invalidation of both Magel2 and Necdin » - Journée thématique de la Société de Neuroendocrinologie, Rouen, France
4. Pierre-Yves Barelle, Fabienne Schaller, Francoise Muscatelli, Sebastien G. Bouret (2022) « Role of oxytocin in melanocortin system development and adiposity during distinct periods of postnatal life » - Journée thématique de la Société de Neuroendocrinologie, Tour, France
5. Pierre-Yves Barelle, Fabienne Schaller, Francoise Muscatelli, Sebastien G. Bouret (2022) « Oxytocin influences the development of the melanocortin system and adiposity during distinct periods of postnatal life» - FENS Paris, France
6. Pierre-Yves Barelle, Fabienne Schaller, Francoise Muscatelli, Sebastien G. Bouret (2021) « Oxytocin influences the development of the melanocortin system and adiposity during distinct periods of postnatal life» - 4th British Society for Neuroendocrinology - Société de Neuroendocrinologie, Joint meeting, Bordeaux, France
7. Pierre-Yves Barelle, Fabienne Schaller, Francoise Muscatelli, Sebastien G. Bouret (2021) « Role of Oxytocin in Hypothalamic Development and Metabolic Programming » - LiL'N doC Day Lille, France

3. Encadrements techniques d'étudiants

2023 **Encadrement de Stage de 2ème année de Master – 7 mois** « Effet de l'exposition néonatale à l'inositol sur le développement de l'hypothalamus » - Lille Neurosciences et cognition UMR-S 1172 (LilNCog), Lille, France

2022 **Encadrement de Stage de 2ème année de Master – 7 mois** « Rôle des *Slits* dans la mise en place des circuits neuronaux afférents du noyau ventromédian hypothalamique » – Lille Neurosciences et Cognition (UMR-S 1172), Lille, France

Dispositifs Apprentis Chercheurs – 30h – Lycée et collège tout niveau, Arbre des connaissances, Lille, France. *Ce dispositif vise à accompagner collégiens et lycéens dans des laboratoires pour réaliser un projet de recherche sur une année scolaire. A la manière des chercheurs, en fin d'année, ils présentent leurs travaux à l'oral lors des congrès Apprentis Chercheurs.*

2021 **Encadrement de Stage de 2ème année de Master – 7 mois** « Effect of neonatal exposure to artificial sweeteners on hypothalamic development » – Lille Neurosciences et Cognition (UMR-S 1172), Lille, France

Encadrement de Stage de 1ème année de Master – 2 mois « Impact structurel de l'inactivation du gène *Magel2* sur le placenta de souris » – Lille Neurosciences et Cognition (UMR-S 1172), Lille, France

Encadrement de Stage de 1ème année de Master – 2 mois « Obésité Périnatale, Ocytocine et Programmation Métabolique » – Lille Neurosciences et Cognition (UMR-S 1172), Lille, France

4. Enseignements

2024 **Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) – 192h ETD** – Licence 2 et 3 de psychologie, Département de Psychologie, Faculté PsySEF, Université de Lille, France

UE Optionnelle d'histologie, biologie de la reproduction – 7h ETD – Médecine 2ème année, Université de Lille, France – Encadrant : Pr. Ariane Sharif (LilNCog, UMR-S 1172)

2023 **UE Neurosciences Fondamentales et du Comportement – 46h ETD** – Licence 2 et 3 de psychologie, Département de Psychologie, Faculté PsySEF, Université de Lille, France – Encadrants : Pr. Odile Viltart, Dr. Laurent De Doncker, Dr. Lucas Dezorzi (SCALab, UMR CNRS 9193)

UE Optionnelle d'histologie, biologie de la reproduction – 7h ETD – Médecine 2ème année, Université de Lille, France – Encadrant : Dr. Ariane Sharif (LilNCog, UMR-S 1172)

2022 **UE Neurosciences Fondamentales – 18h ETD** – Licence 2 de psychologie, Département de Psychologie, Faculté PsySEF, Université de Lille, France – Encadrant : Pr. Odile Viltart, Dr. Lucas Dezorzi (SCALab, UMR CNRS 9193)

UE Optionnelle d'histologie, biologie de la reproduction – 7h ETD – Médecine 2ème année, Université de Lille, France – Encadrant : Dr. Ariane Sharif (LilNCog, UMR-S 1172)

5. Médiations scientifiques :

Depuis 2021	**Ambassadeur 2021/2022 DECLICS – 3h** – Lycée tout niveau, Cercle FSER, Lycée Louis Pasteur, Lille, France. *Le dispositif DECLICS (Dialogues Entre Chercheurs et Lycéens pour les Intéresser à la Construction des Savoirs) a pour objectifs : promouvoir les métiers de la recherche, les démarches et les enjeux auprès des jeunes via des échanges dans les lycées.*

BIBLIOGRAPHIE

Abbott, C.R., Rossi, M., Wren, A.M., Murphy, K.G., Kennedy, A.R., Stanley, S.A., Zollner, A.N., Morgan, D.G.A., Morgan, I., Ghatei, M.A., Small, C.J., Bloom, S.R., 2001. Evidence of an Orexigenic Role for Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript after Administration into Discrete Hypothalamic Nuclei. Endocrinology 142, 3457–3463. https://doi.org/10.1210/endo.142.8.8304

Abreu, A.P., Dauber, A., Macedo, D.B., Noel, S.D., Brito, V.N., Gill, J.C., Cukier, P., Thompson, I.R., Navarro, V.M., Gagliardi, P.C., Rodrigues, T., Kochi, C., Longui, C.A., Beckers, D., de Zegher, F., Montenegro, L.R., Mendonca, B.B., Carroll, R.S., Hirschhorn, J.N., Latronico, A.C., Kaiser, U.B., 2013. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. N. Engl. J. Med. 368, 2467–2475. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1302160

Abreu, A.P., Kaiser, U.B., 2016. Pubertal development and regulation. Lancet Diabetes Endocrinol. 4, 254–264. https://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00418-0

Abreu, A.P., Toro, C.A., Song, Y.B., Navarro, V.M., Bosch, M.A., Eren, A., Liang, J.N., Carroll, R.S., Latronico, A.C., Rønnekleiv, O.K., Aylwin, C.F., Lomniczi, A., Ojeda, S., Kaiser, U.B., 2020. MKRN3 inhibits the reproductive axis through actions in kisspeptin-expressing neurons. J. Clin. Invest. 130, 4486–4500. https://doi.org/10.1172/JCI136564

Acher, R., Chauvet, J., Chauvet, M.T., 1995. Man and the chimaera. Selective versus neutral oxytocin evolution. Adv. Exp. Med. Biol. 395, 615–627.

Adan, R.A.H., Kas, M.J.H., 2003. Inverse agonism gains weight. Trends Pharmacol. Sci. 24, 315–321. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00130-5

Ahima, R.S., Prabakaran, D., Flier, J.S., 1998. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. J. Clin. Invest. 101, 1020–1027. https://doi.org/10.1172/JCI1176

Akefeldt, A., Törnhage, C.J., Gillberg, C., 1999. “A woman with Prader-Willi syndrome gives birth to a healthy baby girl.” Dev. Med. Child Neurol. 41, 789–790. https://doi.org/10.1017/s0012162299221573

Akiyama, M., Yuasa, T., Hayasaka, N., Horikawa, K., Sakurai, T., Shibata, S., 2004. Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuron-ablated mice. Eur. J. Neurosci. 20, 3054–3062. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03749.x

Althammer, F., Muscatelli, F., Grinevich, V., Schaaf, C.P., 2022a. Oxytocin-based therapies for treatment of Prader-Willi and Schaaf-Yang syndromes: evidence, disappointments, and future research strategies. Transl. Psychiatry 12, 318. https://doi.org/10.1038/s41398-022-02054-1

Althammer, F., Wimmer, M.C., Krabichler, Q., Küppers, S., Schimmer, J., Fröhlich, H., Dötsch, L., Gruber, T., Wunsch, S., Schubert, T., Kirchner, M.K., Stern, J.E., Charlet, A., Grinevich, V., Schaaf, C.P., 2022b. Analysis of the hypothalamic oxytocin system and oxytocin receptor-expressing astrocytes in a mouse model of Prader-Willi syndrome. J. Neuroendocrinol. 34, e13217. https://doi.org/10.1111/jne.13217

Altman, J., Bayer, S.A., 1986. The development of the rat hypothalamus. Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. 100, 1–178.

Amico, J.A., Vollmer, R.R., Cai, H., Miedlar, J.A., Rinaman, L., 2005. Enhanced initial and sustained intake of sucrose solution in mice with an oxytocin gene deletion. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 289, R1798-1806. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00558.2005

Anand, B.K., Brobeck, J.R., 1951. Hypothalamic Control of Food Intake in Rats and Cats. Yale J. Biol. Med. 24, 123–140.

Andari, E., Duhamel, J.-R., Zalla, T., Herbrecht, E., Leboyer, M., Sirigu, A., 2010. Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 4389–4394. https://doi.org/10.1073/pnas.0910249107

Angulo, M.A., Butler, M.G., Cataletto, M.E., 2015. Prader-Willi syndrome: a review of clinical, genetic, and endocrine findings. J. Endocrinol. Invest. 38, 1249–1263. https://doi.org/10.1007/s40618-015-0312-9

Aponte, Y., Atasoy, D., Sternson, S.M., 2011. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. Nat. Neurosci. 14, 351–355. https://doi.org/10.1038/nn.2739

Argiolas, A., Melis, M.R., Vargiu, L., Gessa, G.L., 1987. d(CH2)5Tyr(Me)-[Orn8]vasotocin, a potent oxytocin antagonist, antagonizes penile erection and yawning induced by oxytocin and apomorphine, but not by ACTH-(1-24). Eur. J. Pharmacol. 134, 221–224. https://doi.org/10.1016/0014-2999(87)90168-3

Arletti, R., Bazzani, C., Castelli, M., Bertolini, A., 1985. Oxytocin improves male copulatory performance in rats. Horm. Behav. 19, 14–20. https://doi.org/10.1016/0018-506x(85)90002-9

Arletti, R., Benelli, A., Bertolini, A., 1989. Influence of oxytocin on feeding behavior in the rat. Peptides 10, 89–93. https://doi.org/10.1016/0196-9781(89)90082-X

Atasoy, D., Betley, J.N., Su, H.H., Sternson, S.M., 2012. Deconstruction of a neural circuit for hunger. Nature 488, 172–177. https://doi.org/10.1038/nature11270

Ates, T., Oncul, M., Dilsiz, P., Topcu, I.C., Civas, C.C., Alp, M.I., Aklan, I., Ates Oz, E., Yavuz, Y., Yilmaz, B., Sayar Atasoy, N., Atasoy, D., 2019. Inactivation of *Magel2* suppresses oxytocin neurons through synaptic excitation-inhibition imbalance. Neurobiol. Dis. 121, 58–64. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.09.017

Balazova, L., Krskova, K., Suski, M., Sisovsky, V., Hlavacova, N., Olszanecki, R., Jezova, D., Zorad, S., 2016. Metabolic effects of subchronic peripheral oxytocin administration in lean and obese zucker rats. J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc. 67, 531–541.

Baraghithy, S., Smoum, R., Drori, A., Hadar, R., Gammal, A., Hirsch, S., Attar-Namdar, M., Nemirovski, A., Gabet, Y., Langer, Y., Pollak, Y., Schaaf, C.P., Rech, M.E., Gross-Tsur, V., Bab, I., Mechoulam, R., Tam, J., 2019. Magel2 Modulates Bone Remodeling and Mass in Prader-Willi Syndrome by Affecting Oleoyl Serine Levels and Activity. J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res. 34, 93–105. https://doi.org/10.1002/jbmr.3591

Barroso, A., Roa, J., Tena-Sempere, M., 2019. Neuropeptide Control of Puberty: Beyond Kisspeptins. Semin. Reprod. Med. 37, 155–165. https://doi.org/10.1055/s-0039-3400967

Bartels, A., Zeki, S., 2004. The neural correlates of maternal and romantic love. NeuroImage 21, 1155–1166. https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.11.003

Baumgartner, T., Heinrichs, M., Vonlanthen, A., Fischbacher, U., Fehr, E., 2008. Oxytocin shapes the neural circuitry of trust and trust adaptation in humans. Neuron 58, 639–650. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.009

Begriche, K., Levasseur, P.R., Zhang, J., Rossi, J., Skorupa, D., Solt, L.A., Young, B., Burris, T.P., Marks, D.L., Mynatt, R.L., Butler, A.A., 2011. Genetic Dissection of the Functions of the Melanocortin-3 Receptor, a Seven-transmembrane G-protein-coupled Receptor, Suggests Roles for Central and Peripheral Receptors in Energy Homeostasis *. J. Biol. Chem. 286, 40771–40781. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.278374

Berthoud, H.-R., 2002. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. Neurosci. Biobehav. Rev. 26, 393–428. https://doi.org/10.1016/S0149-7634(02)00014-3

Berthoud, H.R., Jeanrenaud, B., 1979. Acute hyperinsulinemia and its reversal by vagotomy after lesions of the ventromedial hypothalamus in anesthetized rats. Endocrinology 105, 146–151. https://doi.org/10.1210/endo-105-1-146

Bertoni, A., Schaller, F., Tyzio, R., Gaillard, S., Santini, F., Xolin, M., Diabira, D., Vaidyanathan, R., Matarazzo, V., Medina, I., Hammock, E., Zhang, J., Chini, B., Gaiarsa, J.-L., Muscatelli, F., 2021. Oxytocin administration in neonates shapes hippocampal circuitry and restores social behavior in a mouse model of autism. Mol. Psychiatry 26, 7582–7595. https://doi.org/10.1038/s41380-021-01227-6

Bervini, S., Herzog, H., 2013. Mouse models of Prader–Willi Syndrome: A systematic review. Front. Neuroendocrinol. 34, 107–119. https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2013.01.002
Billings, L.B., Spero, J.A., Vollmer, R.R., Amico, J.A., 2006. Oxytocin null mice ingest enhanced amounts of sweet solutions during light and dark cycles and during repeated shaker stress. Behav. Brain Res. 171, 134–141. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.03.028
Bischof, J.M., Stewart, C.L., Wevrick, R., 2007. Inactivation of the mouse Magel2 gene results in growth abnormalities similar to Prader-Willi syndrome. Hum. Mol. Genet. 16, 2713–2719. https://doi.org/10.1093/hmg/ddm225
Bischof, J.M., Van Der Ploeg, L.H.T., Colmers, W.F., Wevrick, R., 2016. Magel2-null mice are hyper-responsive to setmelanotide, a melanocortin 4 receptor agonist. Br. J. Pharmacol. 173, 2614–2621. https://doi.org/10.1111/bph.13540
Bittel, D.C., Kibiryeva, N., McNulty, S.G., Driscoll, D.J., Butler, M.G., White, R.A., 2007. Whole genome microarray analysis of gene expression in an imprinting center deletion mouse model of Prader-Willi syndrome. Am. J. Med. Genet. A. 143A, 422–429. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31504
Blaicher, W., Gruber, D., Bieglmayer, C., Blaicher, A.M., Knogler, W., Huber, J.C., 1999. The role of oxytocin in relation to female sexual arousal. Gynecol. Obstet. Invest. 47, 125–126. https://doi.org/10.1159/000010075
Blevins, J.E., Eakin, T.J., Murphy, J.A., Schwartz, M.W., Baskin, D.G., 2003. Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. Brain Res. 993, 30–41. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.08.036
Blevins, J.E., Schwartz, M.W., Baskin, D.G., 2004. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 287, R87-96. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00604.2003
Boccaccio, I., H, G.-D., F, W., N, R., M, L., F, M., 1999. The human MAGEL2 gene and its mouse homologue are paternally expressed and mapped to the Prader-Willi region. Hum. Mol. Genet. 8. https://doi.org/10.1093/hmg/8.13.2497
Bochukova, E.G., Lawler, K., Croizier, S., Keogh, J.M., Patel, N., Strohbehn, G., Lo, K.K., Humphrey, J., Hokken-Koelega, A., Damen, L., Donze, S., Bouret, S.G., Plagnol, V., Farooqi, I.S., 2018. A Transcriptomic Signature of the Hypothalamic Response to Fasting and BDNF Deficiency in Prader-Willi Syndrome. Cell Rep. 22, 3401–3408. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.018
Boer, H., Holland, A., Whittington, J., Butler, J., Webb, T., Clarke, D., 2002. Psychotic illness in people with Prader Willi syndrome due to chromosome 15 maternal uniparental disomy. Lancet Lond. Engl. 359, 135–136. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07340-3
Bouret, S.G., 2022. Developmental programming of hypothalamic melanocortin circuits. Exp. Mol. Med. 54, 403–413. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00625-8
Bouret, S.G., Bates, S.H., Chen, S., Myers, M.G., Simerly, R.B., 2012. Distinct roles for specific leptin receptor signals in the development of hypothalamic feeding circuits. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 32, 1244–1252. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2277-11.2012
Bouret, S.G., Draper, S.J., Simerly, R.B., 2004a. Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice. J. Neurosci. 24, 2797–2805. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004
Bouret, S.G., Draper, S.J., Simerly, R.B., 2004b. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. Science 304, 108–110. https://doi.org/10.1126/science.1095004
Bouret, S.G., Muscatelli, F., 2021. Ontogenesis of Hypothalamic Neurons in Mammals, in: Grinevich, V., Dobolyi, Á. (Eds.), Neuroanatomy of Neuroendocrine Systems. Springer International Publishing, Cham, pp. 3–40. https://doi.org/10.1007/978-3-030-86630-3_1
Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J. g., Hökfelt, T., 1998a. Hypocretin/Orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral

hypothalamus: Relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. J. Comp. Neurol. 402, 460–474. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19981228)402:4<460::AID-CNE3>3.0.CO;2-S

Broberger, Christian, Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., Hökfelt, T., 1998. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 15043–15048.

Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., Hökfelt, T., 1998b. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 15043–15048. https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.15043

Brown, C.H., Grattan, D.R., 2007. Does maternal oxytocin protect the fetal brain? Trends Endocrinol. Metab. TEM 18, 225–226. https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.04.003

Brown, S.S.G., Manning, K.E., Fletcher, P., Holland, A., 2022. In vivo neuroimaging evidence of hypothalamic alteration in Prader–Willi syndrome. Brain Commun. 4, fcac229. https://doi.org/10.1093/braincomms/fcac229

Brownstein, M.J., Russell, J.T., Gainer, H., 1980. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. Science 207, 373–378. https://doi.org/10.1126/science.6153132

Bruins, J., Hijman, R., Van Ree, J.M., 1992. Effect of a single dose of des-glycinamide-[Arg8]vasopressin or oxytocin on cognitive processes in young healthy subjects. Peptides 13, 461–468. https://doi.org/10.1016/0196-9781(92)90075-e

Brüning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Müller-Wieland, D., Kahn, C.R., 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. Science 289, 2122–2125. https://doi.org/10.1126/science.289.5487.2122

Buffington, S.A., Prisco, G.V.D., Auchtung, T.A., Ajami, N.J., Petrosino, J.F., Costa-Mattioli, M., 2016. Microbial reconstitution reverses maternal diet-induced social and synaptic deficits in offspring. Cell 165, 1762. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.001

Burman, P., Ritzén, E.M., Lindgren, A.C., 2001. Endocrine dysfunction in Prader-Willi syndrome: a review with special reference to GH. Endocr. Rev. 22, 787–799. https://doi.org/10.1210/edrv.22.6.0447

Burnett, L.C., Hubner, G., LeDuc, C.A., Morabito, M.V., Carli, J.F.M., Leibel, R.L., 2017. Loss of the imprinted, non-coding Snord116 gene cluster in the interval deleted in the Prader Willi syndrome results in murine neuronal and endocrine pancreatic developmental phenotypes. Hum. Mol. Genet. 26, 4606–4616. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx342

Butler, M.G., Lee, J., Cox, D.M., Manzardo, A.M., Gold, J.-A., Miller, J.L., Roof, E., Dykens, E., Kimonis, V., Driscoll, D.J., 2016. Growth Charts for Prader-Willi Syndrome During Growth Hormone Treatment. Clin. Pediatr. (Phila.) 55, 957–974. https://doi.org/10.1177/0009922815617973

Butler, M.G., Manzardo, A.M., Heinemann, J., Loker, C., Loker, J., 2017. Causes of death in Prader-Willi syndrome: Prader-Willi Syndrome Association (USA) 40-year mortality survey. Genet. Med. 19, 635–642. https://doi.org/10.1038/gim.2016.178

Caldwell, J.D., Prange, A.J., Pedersen, C.A., 1986. Oxytocin facilitates the sexual receptivity of estrogen-treated female rats. Neuropeptides 7, 175–189. https://doi.org/10.1016/0143-4179(86)90093-4

Caquineau, C., Leng, G., Guan, X.M.M., Jiang, M., Van der Ploeg, L., Douglas, A.J., 2006. Effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone on magnocellular oxytocin neurones and their activation at intromission in male rats. J. Neuroendocrinol. 18, 685–691. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01465.x

Carmichael, M.S., Humbert, R., Dixen, J., Palmisano, G., Greenleaf, W., Davidson, J.M., 1987. Plasma oxytocin increases in the human sexual response. J. Clin. Endocrinol. Metab. 64, 27–31. https://doi.org/10.1210/jcem-64-1-27

Caron, E., Sachot, C., Prevot, V., Bouret, S.G., 2010. Distribution of leptin-sensitive cells in the postnatal and adult mouse brain. J. Comp. Neurol. 518, 459–476. https://doi.org/10.1002/cne.22219

Cassidy, S.B., 2012. Prader-Willi syndrome. Genet. Med. 14.
Castellani, V., De Angelis, E., Kenwrick, S., Rougon, G., 2002. Cis and trans interactions of L1 with neuropilin-1 control axonal responses to semaphorin 3A. EMBO J. 21, 6348–6357. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf645
Cattanach, B.M., Barr, J.A., Evans, E.P., Burtenshaw, M., Beechey, C.V., Leff, S.E., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Jones, J., 1992. A candidate mouse model for Prader–Willi syndrome which shows an absence of Snrpn expression. Nat. Genet. 2, 270–274. https://doi.org/10.1038/ng1292-270
Cavaillé, J., 2017. Box C/D small nucleolar RNA genes and the Prader-Willi syndrome: a complex interplay. Wiley Interdiscip. Rev. RNA 8. https://doi.org/10.1002/wrna.1417
Challis, B.G., Coll, A.P., Yeo, G.S.H., Pinnock, S.B., Dickson, S.L., Thresher, R.R., Dixon, J., Zahn, D., Rochford, J.J., White, A., Oliver, R.L., Millington, G., Aparicio, S.A., Colledge, W.H., Russ, A.P., Carlton, M.B., O'Rahilly, S., 2004. Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 4695–4700. https://doi.org/10.1073/pnas.0306931101
Champagne, F., Diorio, J., Sharma, S., Meaney, M.J., 2001. Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 12736–12741. https://doi.org/10.1073/pnas.221224598
Chao, P.-T., Yang, L., Aja, S., Moran, T.H., Bi, S., 2011. Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. Cell Metab. 13, 573–583. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.02.019
Chen, A.S., Marsh, D.J., Trumbauer, M.E., Frazier, E.G., Guan, X.-M., Yu, H., Rosenblum, C.I., Vongs, A., Feng, Y., Cao, L., Metzger, J.M., Strack, A.M., Camacho, R.E., Mellin, T.N., Nunes, C.N., Min, W., Fisher, J., Gopal-Truter, S., MacIntyre, D.E., Chen, H.Y., Van der Ploeg, L.H.T., 2000. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. Nat. Genet. 26, 97–102. https://doi.org/10.1038/79254
Chen, P., Williams, S.M., Grove, K.L., Smith, M.S., 2004. Melanocortin 4 receptor-mediated hyperphagia and activation of neuropeptide Y expression in the dorsomedial hypothalamus during lactation. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 24, 5091–5100. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0588-04.2004
Chibbar, R., Miller, F.D., Mitchell, B.F., 1993. Synthesis of oxytocin in amnion, chorion, and decidua may influence the timing of human parturition. J. Clin. Invest. 91, 185–192. https://doi.org/10.1172/JCI116169
Cho, M.M., DeVries, A.C., Williams, J.R., Carter, C.S., 1999. The effects of oxytocin and vasopressin on partner preferences in male and female prairie voles (Microtus ochrogaster). Behav. Neurosci. 113, 1071–1079. https://doi.org/10.1037//0735-7044.113.5.1071
Clarkson, J., Herbison, A.E., 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. Endocrinology 147, 5817–5825. https://doi.org/10.1210/en.2006-0787
Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., Low, M.J., 2001. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. Nature 411, 480–484. https://doi.org/10.1038/35078085
Crinò, A., Schiaffini, R., Ciampalini, P., Spera, S., Beccaria, L., Benzi, F., Bosio, L., Corrias, A., Gargantini, L., Salvatoni, A., Tonini, G., Trifirò, G., Livieri, C., Genetic Obesity Study Group of Italian Society of Pediatric endocrinology and diabetology (SIEDP), 2003. Hypogonadism and pubertal development in Prader-Willi syndrome. Eur. J. Pediatr. 162, 327–333. https://doi.org/10.1007/s00431-002-1132-4
Croizier, S., Franchi-Bernard, G., Colard, C., Poncet, F., La Roche, A., Risold, P.-Y., 2010. A comparative analysis shows morphofunctional differences between the rat and mouse melanin-concentrating hormone systems. PloS One 5, e15471. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015471

Cushing, B.S., Carter, C.S., 2000. Peripheral pulses of oxytocin increase partner preferences in female, but not male, prairie voles. Horm. Behav. 37, 49–56. https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1558
Cushing, B.S., Carter, C.S., 1999. Prior exposure To oxytocin mimics the effects Of social contact and facilitates sexual behaviour In females. J. Neuroendocrinol. 11, 765–769. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1999.00382.x
Dale, H.H., 1906. On some physiological actions of ergot. J. Physiol. 34, 163. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1906.sp001148
d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Dixon, J.P.C., Day, K., Leitch, H.G., Hendrick, A.G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M.B.L., Aparicio, S.A.J.R., Colledge, W.H., 2007. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 10714–10719. https://doi.org/10.1073/pnas.0704114104
De Dreu, C.K.W., Greer, L.L., Handgraaf, M.J.J., Shalvi, S., Van Kleef, G.A., Baas, M., Ten Velden, F.S., Van Dijk, E., Feith, S.W.W., 2010. The neuropeptide oxytocin regulates parochial altruism in intergroup conflict among humans. Science 328, 1408–1411. https://doi.org/10.1126/science.1189047
De Dreu, C.K.W., Kret, M.E., 2016. Oxytocin Conditions Intergroup Relations Through Upregulated In-Group Empathy, Cooperation, Conformity, and Defense. Biol. Psychiatry 79, 165–173. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.03.020
de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100, 10972–10976. https://doi.org/10.1073/pnas.1834399100
Debons, A.F., Silver, L., Cronkite, E.P., Johnson, H.A., Brecher, G., Tenzer, D., Schwartz, I.L., 1962. Localization of gold in mouse brain in relation to gold thioglucose obesity. Am. J. Physiol.-Leg. Content 202, 743–750. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1962.202.4.743
DeFalco, J., Tomishima, M., Liu, H., Zhao, C., Cai, X., Marth, J.D., Enquist, L., Friedman, J.M., 2001. Virus-Assisted Mapping of Neural Inputs to a Feeding Center in the Hypothalamus. Science 291, 2608–2613. https://doi.org/10.1126/science.1056602
DEMİRCİ, E., ÖZMEN, S., ÖZTOP, D.B., 2016. Relationship between Impulsivity and Serum Oxytocin in Male Children and Adolescents with Attention-Deficit and Hyperactivity Disorder: A Preliminary Study. Nöro Psikiyatri Arş. 53, 291–295. https://doi.org/10.5152/npa.2015.10284
Devaskar, S.U., Ollesch, C., Rajakumar, R.A., Rajakumar, P.A., 1997. Developmental changes in ob gene expression and circulating leptin peptide concentrations. Biochem. Biophys. Res. Commun. 238, 44–47. https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7237
Di Simplicio, M., Massey-Chase, R., Cowen, P.J., Harmer, C.J., 2009. Oxytocin enhances processing of positive versus negative emotional information in healthy male volunteers. J. Psychopharmacol. Oxf. Engl. 23, 241–248. https://doi.org/10.1177/0269881108095705
Ding, F., Li, H.H., Zhang, S., Solomon, N.M., Camper, S.A., Cohen, P., Francke, U., 2008. SnoRNA Snord116 (Pwcr1/MBII-85) Deletion Causes Growth Deficiency and Hyperphagia in Mice. PLoS ONE 3, e1709. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001709
Ditzen, B., Schaer, M., Gabriel, B., Bodenmann, G., Ehlert, U., Heinrichs, M., 2009. Intranasal oxytocin increases positive communication and reduces cortisol levels during couple conflict. Biol. Psychiatry 65, 728–731. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.10.011
Dluzen, D.E., Muraoka, S., Engelmann, M., Landgraf, R., 1998. The effects of infusion of arginine vasopressin, oxytocin, or their antagonists into the olfactory bulb upon social recognition responses in male rats. Peptides 19, 999–1005. https://doi.org/10.1016/s0196-9781(98)00047-3
Douglas, A.J., Johnstone, L.E., Leng, G., 2007. Neuroendocrine mechanisms of change in food intake during pregnancy: a potential role for brain oxytocin. Physiol. Behav. 91, 352–365. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.04.012

Doyle, J.M., Gao, J., Wang, J., Yang, M., Potts, P.R., 2010. MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. Mol. Cell 39, 963–974. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.029

Du Vigneaud, V., Ressler, C., Trippett, S., 1953. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. J. Biol. Chem. 205, 949–957.

Dulka, E.A., Moenter, S.M., 2017. Prepubertal Development of Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activity Is Altered by Sex, Age, and Prenatal Androgen Exposure. Endocrinology 158, 3943–3953. https://doi.org/10.1210/en.2017-00768

Ebitz, R.B., Platt, M.L., 2013. An evolutionary perspective on the behavioral consequences of exogenous oxytocin application. Front. Behav. Neurosci. 7, 225. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2013.00225

Egan, J.J., Saltis, J., Wek, S.A., Simpson, I.A., Londos, C., 1990. Insulin, oxytocin, and vasopressin stimulate protein kinase C activity in adipocyte plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 1052–1056. https://doi.org/10.1073/pnas.87.3.1052

Eiholzer, U., l'Allemand, D., 2000. Growth hormone normalises height, prediction of final height and hand length in children with Prader-Willi syndrome after 4 years of therapy. Horm. Res. 53, 185–192. https://doi.org/10.1159/000023565

Eiholzer, U., l'Allemand, D., Rousson, V., Schlumpf, M., Gasser, T., Girard, J., Grüters, A., Simoni, M., 2006. Hypothalamic and gonadal components of hypogonadism in boys with Prader-Labhart-Willi syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 91, 892–898. https://doi.org/10.1210/jc.2005-0902

Einfeld, S.L., Smith, E., McGregor, I.S., Steinbeck, K., Taffe, J., Rice, L.J., Horstead, S.K., Rogers, N., Hodge, M.A., Guastella, A.J., 2014. A double-blind randomized controlled trial of oxytocin nasal spray in Prader Willi syndrome. Am. J. Med. Genet. A. 164A, 2232–2239. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36653

Elabd, C., Basillais, A., Beaupied, H., Breuil, V., Wagner, N., Scheideler, M., Zaragosi, L.-E., Massiéra, F., Lemichez, E., Trajanoski, Z., Carle, G., Euller-Ziegler, L., Ailhaud, G., Benhamou, C.-L., Dani, C., Amri, E.-Z., 2008. Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis. Stem Cells Dayt. Ohio 26, 2399–2407. https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0127

Elias, C.F., Saper, C.B., Maratos-Flier, E., Tritos, N.A., Lee, C., Kelly, J., Tatro, J.B., Hoffman, G.E., Ollmann, M.M., Barsh, G.S., Sakurai, T., Yanagisawa, M., Elmquist, J.K., 1998. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. J. Comp. Neurol. 402, 442–459. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19981228)402:4<442::AID-CNE2>3.0.CO;2-R

Engelmann, M., Ebner, K., Landgraf, R., Holsboer, F., Wotjak1, C.T., 1999. Emotional stress triggers intrahypothalamic but not peripheral release of oxytocin in male rats. J. Neuroendocrinol. 11, 867–872. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1999.00403.x

Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., Cone, R.D., 1997. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. Nature 385, 165–168. https://doi.org/10.1038/385165a0

Fekete, C., Mihály, E., Luo, L.G., Kelly, J., Clausen, J.T., Mao, Q., Rand, W.M., Moss, L.G., Kuhar, M., Emerson, C.H., Jackson, I.M., Lechan, R.M., 2000. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 20, 9224–9234. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-24-09224.2000

Fenselau, H., Campbell, J.N., Verstegen, A.M.J., Madara, J.C., Xu, J., Shah, B.P., Resch, J.M., Yang, Z., Mandelblat-Cerf, Y., Livneh, Y., Lowell, B.B., 2017. A rapidly-acting glutamatergic ARC→PVH satiety circuit postsynaptically regulated by α-MSH. Nat. Neurosci. 20, 42–51. https://doi.org/10.1038/nn.4442

Ferguson, J.N., Aldag, J.M., Insel, T.R., Young, L.J., 2001. Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse. J. Neurosci. 21, 8278–8285. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-08278.2001

Ferguson, J.N., Young, L.J., Hearn, E.F., Matzuk, M.M., Insel, T.R., Winslow, J.T., 2000. Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. Nat. Genet. 25, 284–288. https://doi.org/10.1038/77040

Ferris, C.F., Foote, K.B., Meltser, H.M., Plenby, M.G., Smith, K.L., Insel, T.R., 1992. Oxytocin in the amygdala facilitates maternal aggression. Ann. N. Y. Acad. Sci. 652, 456–457. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb34382.x

Festen, D.A.M., Wevers, M., de Weerd, A.W., van den Bossche, R.A.S., Duivenvoorden, H.J., Otten, B.J., Wit, J.M., Hokken-Koelega, A.C.S., 2007. Psychomotor Development in Infants with Prader-Willi Syndrome and Associations with Sleep-Related Breathing Disorders. Pediatr. Res. 62, 221–224. https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31809871dd

Filippi, S., Vignozzi, L., Vannelli, G.B., Ledda, F., Forti, G., Maggi, M., 2003. Role of oxytocin in the ejaculatory process. J. Endocrinol. Invest. 26, 82–86.

Fillion, M., Deal, C.L., Van Vliet, G., 2006. Normal minipuberty of infancy in boys with Prader-Willi syndrome. J. Pediatr. 149, 874–876. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2006.08.077

Fisher, D.A., Hoath, S., Lakshmanan, J., 1982. The thyroid hormone effects on growth and development may be mediated by growth factors. Endocrinol. Exp. 16, 259–271.

Fisher, H., Aron, A., Brown, L.L., 2005. Romantic love: an fMRI study of a neural mechanism for mate choice. J. Comp. Neurol. 493, 58–62. https://doi.org/10.1002/cne.20772

Fisher, H.E., Aron, A., Brown, L.L., 2006. Romantic love: a mammalian brain system for mate choice. Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 361, 2173–2186. https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1938

Florke Gee, R.R., Chen, H., Lee, A.K., Daly, C.A., Wilander, B.A., Fon Tacer, K., Potts, P.R., 2020. Emerging roles of the MAGE protein family in stress response pathways. J. Biol. Chem. 295, 16121–16155. https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.008029

Fong, T.M., Mao, C., MacNeil, T., Kalyani, R., Smith, T., Weinberg, D., Tota, M.R., Van der Ploeg, L.H.T., 1997. ART (Protein Product of Agouti-Related Transcript) as an Antagonist of MC-3 and MC-4 Receptors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 237, 629–631. https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7200

Fountain, M.D., Tao, H., Chen, C.-A., Yin, J., Schaaf, C.P., 2017. Magel2 knockout mice manifest altered social phenotypes and a deficit in preference for social novelty. Genes Brain Behav. 16, 592–600. https://doi.org/10.1111/gbb.12378

Francis, D.D., Champagne, F.C., Meaney, M.J., 2000. Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. J. Neuroendocrinol. 12, 1145–1148. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00599.x

Frijling, J.L., van Zuiden, M., Koch, S.B., Nawijn, L., Goslings, J.C., Luitse, J.S., Biesheuvel, T.H., Honig, A., Bakker, F.C., Denys, D., Veltman, D.J., Olff, M., 2014. Efficacy of oxytocin administration early after psychotrauma in preventing the development of PTSD: study protocol of a randomized controlled trial. BMC Psychiatry 14, 92. https://doi.org/10.1186/1471-244X-14-92

Fu, L.-Y., van den Pol, A.N., 2008. Agouti-Related Peptide and MC3/4 Receptor Agonists Both Inhibit Excitatory Hypothalamic Ventromedial Nucleus Neurons. J. Neurosci. 28, 5433–5449. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0749-08.2008

Fuchs, A.R., Fields, M.J., Freidman, S., Shemesh, M., Ivell, R., 1995. Oxytocin and the timing of parturition. Influence of oxytocin receptor gene expression, oxytocin secretion, and oxytocin-induced prostaglandin F2 alpha and E2 release. Adv. Exp. Med. Biol. 395, 405–420.

Fujiwara, K., Hasegawa, K., Ohkumo, T., Miyoshi, H., Tseng, Y.-H., Yoshikawa, K., 2012. Necdin Controls Proliferation of White Adipocyte Progenitor Cells. PLOS ONE 7, e30948. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030948

Gabriel, J.M., Merchant, M., Ohta, T., Ji, Y., Caldwell, R.G., Ramsey, M.J., Tucker, J.D., Longnecker, R., Nicholls, R.D., 1999. A transgene insertion creating a heritable chromosome deletion mouse model of Prader-Willi and Angelman syndromes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96, 9258–9263.

Galiveti, C.R., Raabe, C.A., Konthur, Z., Rozhdestvensky, T.S., 2014. Differential regulation of non-protein coding RNAs from Prader-Willi Syndrome locus. Sci. Rep. 4, 6445. https://doi.org/10.1038/srep06445

Gao, Z.Y., Drews, G., Henquin, J.C., 1991. Mechanisms of the stimulation of insulin release by oxytocin in normal mouse islets. Biochem. J. 276 (Pt 1), 169–174. https://doi.org/10.1042/bj2760169

Ge, Y.-L., Ohta, T., Driscoll, D.J., Nicholls, R.D., Kalra, S.P., 2002. Anorexigenic melanocortin signaling in the hypothalamus is augmented in association with failure-to-thrive in a transgenic mouse model for Prader-Willi syndrome. Brain Res. 957, 42–45. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03583-7

Gérard, M., Hernandez, L., Wevrick, R., Stewart, C.L., 1999. Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. Nat. Genet. 23, 199–202. https://doi.org/10.1038/13828

Gimpl, G., Fahrenholz, F., 2001. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. Physiol. Rev. 81, 629–683. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.629

Giovenardi, M., Padoin, M.J., Cadore, L.P., Lucion, A.B., 1998. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. Physiol. Behav. 63, 351–359. https://doi.org/10.1016/s0031-9384(97)00434-4

Glenn, C.C., Saitoh, S., Jong, M.T., Filbrandt, M.M., Surti, U., Driscoll, D.J., Nicholls, R.D., 1996. Gene structure, DNA methylation, and imprinted expression of the human SNRPN gene. Am. J. Hum. Genet. 58, 335–346.

Gold, R., 1970. Hypothalamic hyperphagia produced by parasagittal knife cuts☆. Physiol. Behav. 5, 23–25. https://doi.org/10.1016/0031-9384(70)90007-7

Gold, R.M., 1973. Hypothalamic Obesity: The Myth of the Ventromedial Nucleus. Science 182, 488–490. https://doi.org/10.1126/science.182.4111.488

Gold, R.M., Jones, A.P., Sawchenko, P.E., Kapatos, G., 1977. Paraventricular area: Critical focus of a longitudinal neurocircuitry mediating food intake. Physiol. Behav. 18, 1111–1119. https://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90019-1

Goldstone, A.P., Holland, A.J., Hauffa, B.P., Hokken-Koelega, A.C., Tauber, M., speakers contributors at the Second Expert Meeting of the Comprehensive Care of Patients with PWS, 2008. Recommendations for the diagnosis and management of Prader-Willi syndrome. J. Clin. Endocrinol. Metab. 93, 4183–4197. https://doi.org/10.1210/jc.2008-0649

Goldstone, A.P., Unmehopa, U.A., Bloom, S.R., Swaab, D.F., 2002. Hypothalamic NPY and agouti-related protein are increased in human illness but not in Prader-Willi syndrome and other obese subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 87, 927–937. https://doi.org/10.1210/jcem.87.2.8230

Gorzalka, B.B., Lester, G.L., 1987. Oxytocin-induced facilitation of lordosis behaviour in rats is progesterone-dependent. Neuropeptides 10, 55–65. https://doi.org/10.1016/0143-4179(87)90089-8

Gray, T.A., Saitoh, S., Nicholls, R.D., 1999. An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, 5616–5621. https://doi.org/10.1073/pnas.96.10.5616

Grayson, B.E., Allen, S.E., Billes, S.K., Williams, S.M., Smith, M.S., Grove, K.L., 2006. Prenatal development of hypothalamic neuropeptide systems in the nonhuman primate. Neuroscience 143, 975–986. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.055

Greco, D., Vetri, L., Ragusa, L., Vinci, M., Gloria, A., Occhipinti, P., Costanzo, A.A., Quatrosi, G., Roccella, M., Buono, S., Romano, C., 2021. Prader-Willi Syndrome with Angelman Syndrome in the Offspring. Med. Kaunas Lith. 57, 460. https://doi.org/10.3390/medicina57050460

Grill, H.J., Hayes, M.R., 2012. Hindbrain Neurons as an Essential Hub in the Neuroanatomically Distributed Control of Energy Balance. Cell Metab. 16, 296–309. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.015

Grinevich, V., Desarménien, M.G., Chini, B., Tauber, M., Muscatelli, F., 2014. Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain: late maturation and psychosocial disorders. Front. Neuroanat. 8, 164. https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00164
Guastella, A.J., Carson, D.S., Dadds, M.R., Mitchell, P.B., Cox, R.E., 2009. Does oxytocin influence the early detection of angry and happy faces? Psychoneuroendocrinology 34, 220–225. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.09.001
Guastella, A.J., Einfeld, S.L., Gray, K.M., Rinehart, N.J., Tonge, B.J., Lambert, T.J., Hickie, I.B., 2010. Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders. Biol. Psychiatry 67, 692–694. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.020
Guastella, A.J., Mitchell, P.B., Dadds, M.R., 2008a. Oxytocin increases gaze to the eye region of human faces. Biol. Psychiatry 63, 3–5. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.06.026
Guastella, A.J., Mitchell, P.B., Mathews, F., 2008b. Oxytocin enhances the encoding of positive social memories in humans. Biol. Psychiatry 64, 256–258. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.02.008
Han, J., Lee, J.-E., Jin, J., Lim, J.S., Oh, N., Kim, K., Chang, S.-I., Shibuya, M., Kim, H., Koh, G.Y., 2011. The spatiotemporal development of adipose tissue. Development 138, 5027–5037. https://doi.org/10.1242/dev.067686
Han, P., Feng, L., Kuo, P., 1972. Insulin sensitivity of pair-fed, hyperlipemic, hyperinsulinemic, obese-hypothalamic rats. Am. J. Physiol.-Leg. Content 223, 1206–1209. https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1972.223.5.1206
Han, S.-K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Herbison, A.E., 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 25, 11349–11356. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3328-05.2005
Hanada, R., Nakazato, M., Matsukura, S., Murakami, N., Yoshimatsu, H., Sakata, T., 2000. Differential Regulation of Melanin-Concentrating Hormone and Orexin Genes in the Agouti-Related Protein/Melanocortin-4 Receptor System. Biochem. Biophys. Res. Commun. 268, 88–91. https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.2081
Hanif, K., Lederis, K., Hollenberg, M.D., Goren, H.J., 1982. Inability of oxytocin to activate pyruvate dehydrogenase in the Brattleboro rat. Science 216, 1010–1012. https://doi.org/10.1126/science.7079746
Hara, J., Beuckmann, C.T., Nambu, T., Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., Sugiyama, F., Yagami, K., Goto, K., Yanagisawa, M., Sakurai, T., 2001. Genetic ablation of orexin neurons in mice results in narcolepsy, hypophagia, and obesity. Neuron 30, 345–354. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)00293-8
Hara, Y., Battey, J., Gainer, H., 1990. Structure of mouse vasopressin and oxytocin genes. Brain Res. Mol. Brain Res. 8, 319–324. https://doi.org/10.1016/0169-328x(90)90045-f
Harno, E., Gali Ramamoorthy, T., Coll, A.P., White, A., 2018. POMC: The Physiological Power of Hormone Processing. Physiol. Rev. 98, 2381–2430. https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2017
Haskell-Luevano, C., Monck, E.K., 2001. Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. Regul. Pept. 99, 1–7. https://doi.org/10.1016/S0167-0115(01)00234-8
Häussler, H.U., Jirikowski, G.F., Caldwell, J.D., 1990. Sex differences among oxytocin-immunoreactive neuronal systems in the mouse hypothalamus. J. Chem. Neuroanat. 3, 271–276.
Hayes, E.J., Weinstein, L., 2008. Improving patient safety and uniformity of care by a standardized regimen for the use of oxytocin. Am. J. Obstet. Gynecol. 198, 622.e1–7. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.01.039
Heinrichs, M., Baumgartner, T., Kirschbaum, C., Ehlert, U., 2003. Social support and oxytocin interact to suppress cortisol and subjective responses to psychosocial stress. Biol. Psychiatry 54, 1389–1398. https://doi.org/10.1016/s0006-3223(03)00465-7

Herbison, A.E., 2016. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. Nat. Rev. Endocrinol. 12, 452–466. https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.70
Herbison, A.E., de Tassigny, X. d'Anglemont, Doran, J., Colledge, W.H., 2010. Distribution and postnatal development of Gpr54 gene expression in mouse brain and gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology 151, 312–321. https://doi.org/10.1210/en.2009-0552
Herisson, F.M., Waas, J.R., Fredriksson, R., Schiöth, H.B., Levine, A.S., Olszewski, P.K., 2016. Oxytocin Acting in the Nucleus Accumbens Core Decreases Food Intake. J. Neuroendocrinol. 28. https://doi.org/10.1111/jne.12381
Hetherington, A.W., Ranson, S.W., 1940. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. Anat. Rec. 78, 149–172. https://doi.org/10.1002/ar.1090780203
Higgs, M.J., Hill, M.J., John, R.M., Isles, A.R., 2022. Systematic investigation of imprinted gene expression and enrichment in the mouse brain explored at single-cell resolution. BMC Genomics 23, 754. https://doi.org/10.1186/s12864-022-08986-8
Hollander, E., Bartz, J., Chaplin, W., Phillips, A., Sumner, J., Soorya, L., Anagnostou, E., Wasserman, S., 2007. Oxytocin increases retention of social cognition in autism. Biol. Psychiatry 61, 498–503. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.05.030
Holm, V.A., Cassidy, S.B., Butler, M.G., Hanchett, J.M., Greenswag, L.R., Whitman, B.Y., Greenberg, F., 1993. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. Pediatrics 91, 398–402.
Hulbert, A.J., 2000. Thyroid hormones and their effects: a new perspective. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 75, 519–631. https://doi.org/10.1017/s146479310000556x
Hurren, B.J., Flack, N.A.M.S., 2016. Prader–Willi Syndrome: A spectrum of anatomical and clinical features. Clin. Anat. 29, 590–605. https://doi.org/10.1002/ca.22686
Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, F.J., Campfield, L.A., Burn, P., Lee, F., 1997. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. Cell 88, 131–141. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81865-6
Ieda, D., Negishi, Y., Miyamoto, T., Johmura, Y., Kumamoto, N., Kato, K., Miyoshi, I., Nakanishi, M., Ugawa, S., Oishi, H., Saitoh, S., 2020. Two mouse models carrying truncating mutations in Magel2 show distinct phenotypes. PLOS ONE 15, e0237814. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237814
Ifft, J.D., 1972. An autoradiographic study of the time of final division of neurons in rat hypothalamic nuclei. J. Comp. Neurol. 144, 193–204. https://doi.org/10.1002/cne.901440204
Igarashi, M., Narayanaswami, V., Kimonis, V., Galassetti, P.M., Oveisi, F., Jung, K.-M., Piomelli, D., 2017. Dysfunctional oleoylethanolamide signaling in a mouse model of Prader-Willi syndrome. Pharmacol. Res. 117, 75–81. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.12.024
Insel, T.R., Gelhard, R., Shapiro, L.E., 1991. The comparative distribution of forebrain receptors for neurohypophyseal peptides in monogamous and polygamous mice. Neuroscience 43, 623–630. https://doi.org/10.1016/0306-4522(91)90321-e
Ishii, Y., Bouret, S.G., 2012. Embryonic birthdate of hypothalamic leptin-activated neurons in mice. Endocrinology 153, 3657–3667. https://doi.org/10.1210/en.2012-1328
Israel, J.-M., Cabelguen, J.-M., Le Masson, G., Oliet, S.H., Ciofi, P., 2014. Neonatal testosterone suppresses a neuroendocrine pulse generator required for reproduction. Nat. Commun. 5, 3285. https://doi.org/10.1038/ncomms4285
Iughetti, L., Bosio, L., Corrias, A., Gargantini, L., Ragusa, L., Livieri, C., Predieri, B., Bruzzi, P., Caselli, G., Grugni, G., 2008. Pituitary height and neuroradiological alterations in patients with Prader-Labhart-Willi syndrome. Eur. J. Pediatr. 167, 701–702. https://doi.org/10.1007/s00431-007-0555-3
Ivell, R., Balvers, M., Rust, W., Bathgate, R., Einspanier, A., 1997. Oxytocin and male reproductive function. Adv. Exp. Med. Biol. 424, 253–264. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5913-9_47
Ivell, R., Richter, D., 1984. The gene for the hypothalamic peptide hormone oxytocin is highly expressed in the bovine corpus luteum: biosynthesis, structure and sequence analysis. EMBO J. 3, 2351–2354. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02139.x

Iwasaki, Y., Maejima, Y., Suyama, S., Yoshida, M., Arai, T., Katsurada, K., Kumari, P., Nakabayashi, H., Kakei, M., Yada, T., 2015. Peripheral oxytocin activates vagal afferent neurons to suppress feeding in normal and leptin-resistant mice: a route for ameliorating hyperphagia and obesity. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 308, R360-369. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00344.2014

Jacobowitz, D.M., O'Donohue, T.L., 1978. alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 6300–6304. https://doi.org/10.1073/pnas.75.12.6300

Jezova, D., Skultetyova, I., Tokarev, D.I., Bakos, P., Vigas, M., 1995. Vasopressin and oxytocin in stress. Ann. N. Y. Acad. Sci. 771, 192–203. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb44681.x

Jiang, C., Y, Y., C, H., B, W., 2014. Promoter characterization and functional association with placenta of porcine MAGEL2. Gene 547. https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.022

Johnson, L., Manzardo, A.M., Miller, J.L., Driscoll, D.J., Butler, M.G., 2016. Elevated plasma oxytocin levels in children with Prader-Willi syndrome compared with healthy unrelated siblings. Am. J. Med. Genet. A. 170, 594–601. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37488

Kamm, O., 1928. THE DIALYSIS OF PITUITARY EXTRACTS. Science 67, 199–200. https://doi.org/10.1126/science.67.1729.199

Kanber, D., Giltay, J., Wieczorek, D., Zogel, C., Hochstenbach, R., Caliebe, A., Kuechler, A., Horsthemke, B., Buiting, K., 2009. A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome. Eur. J. Hum. Genet. EJHG 17, 582–590. https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.232

Keck, M.E., 2006. Corticotropin-releasing factor, vasopressin and receptor systems in depression and anxiety. Amino Acids 31, 241–250. https://doi.org/10.1007/s00726-006-0333-y

Kim, S., Je, L., Ss, Kang, Hs, Y., Ss, Kim, Bs, A., 2017. The regulation of oxytocin and oxytocin receptor in human placenta according to gestational age. J. Mol. Endocrinol. 59. https://doi.org/10.1530/JME-16-0223

Kimura, T., Tanizawa, O., Mori, K., Brownstein, M.J., Okayama, H., 1992. Structure and expression of a human oxytocin receptor. Nature 356, 526–529. https://doi.org/10.1038/356526a0

Kirsch, P., Esslinger, C., Chen, Q., Mier, D., Lis, S., Siddhanti, S., Gruppe, H., Mattay, V.S., Gallhofer, B., Meyer-Lindenberg, A., 2005. Oxytocin Modulates Neural Circuitry for Social Cognition and Fear in Humans. J. Neurosci. 25, 11489–11493. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3984-05.2005

Klockars, O.A., Waas, J.R., Klockars, A., Levine, A.S., Olszewski, P.K., 2017. Neural Basis of Ventromedial Hypothalamic Oxytocin-Driven Decrease in Appetite. Neuroscience 366, 54–61. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.10.008

Korner, J., Savontaus, E., Chua Jr, S.C., Leibel, R.L., Wardlaw, S.L., 2001. Leptin Regulation of Agrp and Npy mRNA in the Rat Hypothalamus. J. Neuroendocrinol. 13, 959–966. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2001.00716.x

Kosfeld, M., Heinrichs, M., Zak, P.J., Fischbacher, U., Fehr, E., 2005. Oxytocin increases trust in humans. Nature 435, 673–676. https://doi.org/10.1038/nature03701

Koutcherov, Y., Mai, J.K., Paxinos, G., 2003. Hypothalamus of the human fetus. J. Chem. Neuroanat. 26, 253–270. https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2003.07.002

Kozlov, S.V., Bogenpohl, J.W., Howell, M.P., Wevrick, R., Panda, S., Hogenesch, J.B., Muglia, L.J., Van Gelder, R.N., Herzog, E.D., Stewart, C.L., 2007. The imprinted gene Magel2 regulates normal circadian output. Nat. Genet. 39, 1266–1272. https://doi.org/10.1038/ng2114

Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., Larsen, P.J., Hastrup, S., 1998. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. Nature 393, 72–76. https://doi.org/10.1038/29993

Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., Grüters, A., 1998. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. Nat. Genet. 19, 155–157. https://doi.org/10.1038/509

Kummerfeld, D.-M., Raabe, C.A., Brosius, J., Mo, D., Skryabin, B.V., Rozhdestvensky, T.S., 2021. A Comprehensive Review of Genetically Engineered Mouse Models for Prader-Willi Syndrome Research. Int. J. Mol. Sci. 22, 3613. https://doi.org/10.3390/ijms22073613

Kuppens, R.J., Donze, S.H., Hokken-Koelega, A.C.S., 2016. Promising effects of oxytocin on social and food-related behaviour in young children with Prader-Willi syndrome: a randomized, double-blind, controlled crossover trial. Clin. Endocrinol. (Oxf.) 85, 979–987. https://doi.org/10.1111/cen.13169

Kuwako, K., Hosokawa, A., Nishimura, I., Uetsuki, T., Yamada, M., Nada, S., Okada, M., Yoshikawa, K., 2005. Disruption of the Paternal Necdin Gene Diminishes TrkA Signaling for Sensory Neuron Survival. J. Neurosci. 25, 7090–7099. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2083-05.2005

Lambert, P.D., Couceyro, P.R., McGirr, K.M., Dall Vechia, S.E., Smith, Y., Kuhar, M.J., 1998. CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. Synapse 29, 293–298. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199808)29:4<293::AID-SYN1>3.0.CO;2-0

Lang, R.E., Heil, J.W., Ganten, D., Hermann, K., Unger, T., Rascher, W., 1983. Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. Neuroendocrinology 37, 314–316. https://doi.org/10.1159/000123566

Lee, H.-J., Caldwell, H.K., Macbeth, A.H., Tolu, S.G., Young, W.S., 2008. A Conditional Knockout Mouse Line of the Oxytocin Receptor. Endocrinology 149, 3256–3263. https://doi.org/10.1210/en.2007-1710

Lee, H.-J., Macbeth, A.H., Pagani, J.H., Young, W.S., 2009. Oxytocin: the great facilitator of life. Prog. Neurobiol. 88, 127–151. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.001

Lee, M.-S., Lin, Y.-S., Deng, Y.-F., Hsu, W.-T., Shen, C.-C., Cheng, Y.-H., Huang, Y.-T., Li, C., 2014. Modulation of alternative splicing by expression of small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N. FEBS J. 281, 5194–5207. https://doi.org/10.1111/febs.13059

Lee, S., Kozlov, S., Hernandez, L., Chamberlain, S.J., Brannan, C.I., Stewart, C.L., Wevrick, R., 2000. Expression and imprinting of MAGEL2 suggest a role in Prader-willi syndrome and the homologous murine imprinting phenotype. Hum. Mol. Genet. 9, 1813–1819. https://doi.org/10.1093/hmg/9.12.1813

Lefebvre, D.L., Giaid, A., Bennett, H., Larivière, R., Zingg, H.H., 1992. Oxytocin gene expression in rat uterus. Science 256, 1553–1555. https://doi.org/10.1126/science.1598587

Legros, J.J., 2001. Inhibitory effect of oxytocin on corticotrope function in humans: are vasopressin and oxytocin ying-yang neurohormones? Psychoneuroendocrinology 26, 649–655. https://doi.org/10.1016/s0306-4530(01)00018-x

Leng, G., Ludwig, M., 2016. Intranasal Oxytocin: Myths and Delusions. Biol. Psychiatry 79, 243–250. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.05.003

Leng, G., Meddle, S.L., Douglas, A.J., 2008a. Oxytocin and the maternal brain. Curr. Opin. Pharmacol. 8, 731–734. https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.07.001

Leng, G., Onaka, T., Caquineau, C., Sabatier, N., Tobin, V.A., Takayanagi, Y., 2008b. Oxytocin and appetite. Prog. Brain Res. 170, 137–151. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00413-5

Leppanen, J., Ng, K.W., Tchanturia, K., Treasure, J., 2017. Meta-analysis of the effects of intranasal oxytocin on interpretation and expression of emotions. Neurosci. Biobehav. Rev. 78, 125–144. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.04.010

Li, C., Lu, W., Yang, L., Li, Z., Zhou, X., Guo, R., Wang, J., Wu, Z., Dong, Z., Ning, G., Shi, Y., Gu, Y., Chen, P., Hao, Z., Han, T., Yang, M., Wang, W., Huang, X., Li, Y., Gao, S., Hu, R., 2020. MKRN3 regulates the epigenetic switch of mammalian puberty via ubiquitination of MBD3. Natl. Sci. Rev. 7, 671–685. https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa023

Li, H., Jiang, T., An, S., Xu, M., Gou, L., Ren, B., Shi, X., Wang, X., Yan, J., Yuan, J., Xu, X., Wu, Q.-F., Luo, Q., Gong, H., Bian, W.-J., Li, A., Yu, X., 2024. Single-neuron projectomes of mouse paraventricular hypothalamic nucleus oxytocin neurons reveal mutually exclusive projection patterns. Neuron 112, 1081-1099.e7. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.12.022

Li, H., Zhao, P., Xu, Q., Shan, S., Hu, C., Qiu, Z., Xu, X., 2016. The autism-related gene SNRPN regulates cortical and spine development via controlling nuclear receptor Nr4a1. Sci. Rep. 6, 29878. https://doi.org/10.1038/srep29878

Lonstein, J.S., Gammie, S.C., 2002. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. Neurosci. Biobehav. Rev. 26, 869–888. https://doi.org/10.1016/s0149-7634(02)00087-8

López, M., Lage, R., Tung, Y.C.L., Challis, B.G., Varela, L., Virtue, S., O'Rahilly, S., Vidal-Puig, A., Diéguez, C., Coll, A.P., 2007. Orexin Expression is Regulated by α-Melanocyte-Stimulating Hormone. J. Neuroendocrinol. 19, 703–707. https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01577.x

Loup, F., Tribollet, E., Dubois-Dauphin, M., Dreifuss, J.J., 1991. Localization of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study. Brain Res. 555, 220–232. https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)90345-v

Loup, F., Tribollet, E., Dubois-Dauphin, M., Pizzolato, G., Dreifuss, J.J., 1989. Localization of oxytocin binding sites in the human brainstem and upper spinal cord: an autoradiographic study. Brain Res. 500, 223–230. https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90317-x

Lu, R., Dong, Y., Li, J.-D., 2020. Necdin regulates BMAL1 stability and circadian clock through SGT1-HSP90 chaperone machinery. Nucleic Acids Res. 48, 7944–7957. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa601

Lubin, D.A., Elliott, J.C., Black, M.C., Johns, J.M., 2003. An Oxytocin Antagonist Infused Into the Central Nucleus of the Amygdala Increases Maternal Aggressive Behavior. Behav. Neurosci. 117, 195–201.

Luck, C., Vitaterna, M.H., Wevrick, R., 2016. Dopamine pathway imbalance in mice lacking Magel2, a Prader-Willi syndrome candidate gene. Behav. Neurosci. 130, 448–459. https://doi.org/10.1037/bne0000150

Ludwig, M., Leng, G., 2006. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. Nat. Rev. Neurosci. 7, 126–136. https://doi.org/10.1038/nrn1845

Lukoshe, A., van Dijk, S.E., van den Bosch, G.E., van der Lugt, A., White, T., Hokken-Koelega, A.C., 2017. Altered functional resting-state hypothalamic connectivity and abnormal pituitary morphology in children with Prader-Willi syndrome. J. Neurodev. Disord. 9, 12. https://doi.org/10.1186/s11689-017-9188-7

Macedo, D.B., Abreu, A.P., Reis, A.C.S., Montenegro, L.R., Dauber, A., Beneduzzi, D., Cukier, P., Silveira, L.F.G., Teles, M.G., Carroll, R.S., Junior, G.G., Filho, G.G., Gucev, Z., Arnhold, I.J.P., de Castro, M., Moreira, A.C., Martinelli, C.E., Hirschhorn, J.N., Mendonca, B.B., Brito, V.N., Antonini, S.R., Kaiser, U.B., Latronico, A.C., 2014. Central Precocious Puberty That Appears to Be Sporadic Caused by Paternally Inherited Mutations in the Imprinted Gene Makorin Ring Finger 3. J. Clin. Endocrinol. Metab. 99, E1097–E1103. https://doi.org/10.1210/jc.2013-3126

MacLean, E.L., Wilson, S.R., Martin, W.L., Davis, J.M., Nazarloo, H.P., Carter, C.S., 2019. Challenges for measuring oxytocin: The blind men and the elephant? Psychoneuroendocrinology 107, 225–231. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.05.018

Maejima, Y., Sakuma, K., Santoso, P., Gantulga, D., Katsurada, K., Ueta, Y., Hiraoka, Y., Nishimori, K., Tanaka, S., Shimomura, K., Yada, T., 2014. Oxytocinergic circuit from paraventricular and supraoptic nuclei to arcuate POMC neurons in hypothalamus. FEBS Lett. 588, 4404–4412. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.10.010

Mahalati, K., Okanoya, K., Witt, D.M., Carter, C.S., 1991. Oxytocin inhibits male sexual behavior in prairie voles. Pharmacol. Biochem. Behav. 39, 219–222. https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90426-3

Maillard, J., Park, S., Croizier, S., Vanacker, C., Cook, J.H., Prevot, V., Tauber, M., Bouret, S.G., 2016. Loss of Magel2 impairs the development of hypothalamic Anorexigenic circuits. Hum. Mol. Genet. 25, 3208–3215. https://doi.org/10.1093/hmg/ddw169

Markakis, E.A., 2002. Development of the neuroendocrine hypothalamus. Front. Neuroendocrinol. 23, 257–291. https://doi.org/10.1016/S0091-3022(02)00003-1

Martin, A., State, M., Anderson, G.M., Kaye, W.M., Hanchett, J.M., McConaha, C.W., North, W.G., Leckman, J.F., 1998. Cerebrospinal fluid levels of oxytocin in Prader-Willi syndrome: a preliminary report. Biol. Psychiatry 44, 1349–1352. https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00190-5

Matarazzo, V., Caccialupi, L., Schaller, F., Shvarev, Y., Kourdougli, N., Bertoni, A., Menuet, C., Voituron, N., Deneris, E., Gaspar, P., Bezin, L., Durbec, P., Hilaire, G., Muscatelli, F., 2013. Necdin shapes serotonergic development and SERT activity modulating breathing in a mouse model for Prader-Willi syndrome. eLife 6, e32640. https://doi.org/10.7554/eLife.32640

Matsumoto, A., Arai, Y., 1976. Developmental changes in synaptic formation in the hypothalamic arcuate nucleus of female rats. Cell Tissue Res. 169, 143–156. https://doi.org/10.1007/BF00214204

McAllister, C.J., Whittington, J.E., Holland, A.J., 2011. Development of the eating behaviour in Prader-Willi Syndrome: advances in our understanding. Int. J. Obes. 2005 35, 188–197. https://doi.org/10.1038/ijo.2010.139

McCann, S.M., Kimura, M., Walczewska, A., Karanth, S., Rettori, V., Yu, W.H., 1998. Hypothalamic control of gonadotropin secretion by LHRH, FSHRF, NO, cytokines, and leptin. Domest. Anim. Endocrinol. 15, 333–344. https://doi.org/10.1016/s0739-7240(98)00029-0

McCarthy, J., Lupo, P.J., Kovar, E., Rech, M., Bostwick, B., Scott, D., Kraft, K., Roscioli, T., Charrow, J., Schrier Vergano, S.A., Lose, E., Smiegel, R., Lacassie, Y., Schaaf, C.P., 2018. Schaaf-Yang syndrome overview: Report of 78 individuals. Am. J. Med. Genet. A. 176, 2564–2574. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.40650

McNeilly, A.S., Robinson, I.C., Houston, M.J., Howie, P.W., 1983. Release of oxytocin and prolactin in response to suckling. Br. Med. J. Clin. Res. Ed 286, 257–259. https://doi.org/10.1136/bmj.286.6361.257

Melin, P., Kihlstroem, J.E., 1963. INFLUENCE OF OXYTOCIN ON SEXUAL BEHAVIOR IN MALE RABBITS. Endocrinology 73, 433–435. https://doi.org/10.1210/endo-73-4-433

Melis, M.R., Mauri, A., Argiolas, A., 1994. Apomorphine-and oxytocin-induced penile erection and yawning in intact and castrated male rats: effect of sexual steroids. Neuroendocrinology 59, 349–354. https://doi.org/10.1159/000126677

Mercer, R.E., Michaelson, S.D., Chee, M.J.S., Atallah, T.A., Wevrick, R., Colmers, W.F., 2013. Magel2 Is Required for Leptin-Mediated Depolarization of POMC Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus in Mice. PLoS Genet. 9, e1003207. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003207

Mercer, R.E., Wevrick, R., 2009. Loss of Magel2, a Candidate Gene for Features of Prader-Willi Syndrome, Impairs Reproductive Function in Mice. PLoS ONE 4, e4291. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004291

Meyer-Lindenberg, A., 2008. Impact of prosocial neuropeptides on human brain function. Prog. Brain Res. 170, 463–470. https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00436-6

Meziane, H., Schaller, F., Bauer, S., Villard, C., Matarazzo, V., Riet, F., Guillon, G., Lafitte, D., Desarmenien, M.G., Tauber, M., Muscatelli, F., 2015. An Early Postnatal Oxytocin Treatment Prevents Social and Learning Deficits in Adult Mice Deficient for Magel2, a Gene Involved in Prader-Willi Syndrome and Autism. Biol. Psychiatry 78, 85–94. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.11.010

Mieda, M., Williams, S.C., Sinton, C.M., Richardson, J.A., Sakurai, T., Yanagisawa, M., 2004. Orexin neurons function in an efferent pathway of a food-entrainable circadian oscillator in eliciting food-anticipatory activity and wakefulness. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 24, 10493–10501. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3171-04.2004

Miller, J.L., Goldstone, A.P., Couch, J.A., Shuster, J., He, G., Driscoll, D.J., Liu, Y., Schmalfuss, I.M., 2008. Pituitary abnormalities in Prader-Willi syndrome and early onset morbid obesity. Am. J. Med. Genet. A. 146A, 570–577. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31677

Miller, J.L., Tamura, R., Butler, M.G., Kimonis, V., Sulsona, C., Gold, J.-A., Driscoll, D.J., 2017. Oxytocin treatment in children with Prader–Willi syndrome: A double-blind, placebo-controlled,

crossover study. Am. J. Med. Genet. A. 173, 1243–1250. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38160
Miller, N.L.G., Wevrick, R., Mellon, P.L., 2009. Necdin, a Prader-Willi syndrome candidate gene, regulates gonadotropin-releasing hormone neurons during development. Hum. Mol. Genet. 18, 248–260. https://doi.org/10.1093/hmg/ddn344
Mohr, E., Schmitz, E., 1991. Functional characterization of estrogen and glucocorticoid responsive elements in the rat oxytocin gene. Brain Res. Mol. Brain Res. 9, 293–298. https://doi.org/10.1016/0169-328x(91)90075-9
Morreale de Escobar, G., Obregon, M., Escobar del Rey, F., 2004. Role of thyroid hormone during early brain development. Eur. J. Endocrinol. 151, U25–U37. https://doi.org/10.1530/eje.0.151u025
Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., Cone, R.D., 1994. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. Mol. Endocrinol. 8, 1298–1308. https://doi.org/10.1210/mend.8.10.7854347
Mullis, K., Kay, K., Williams, D.L., 2013. Oxytocin action in the ventral tegmental area affects sucrose intake. Brain Res. 1513, 85–91. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.03.026
Munné-Miralvés, C., Brunet-Llobet, L., Cahuana-Cárdenas, A., Torné-Durán, S., Miranda-Rius, J., Rivera-Baró, A., 2020. Oral disorders in children with Prader-Willi syndrome: a case control study. Orphanet J. Rare Dis. 15, 43. https://doi.org/10.1186/s13023-020-1326-8
Murphy, K.G., 2005. Dissecting the role of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the control of appetite. Brief. Funct. Genomic. Proteomic. 4, 95–111. https://doi.org/10.1093/bfgp/4.2.95
Muscatelli, F., Abrous, D.N., Massacrier, A., Boccaccio, I., Le Moal, M., Cau, P., Cremer, H., 2000. Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. Hum. Mol. Genet. 9, 3101–3110. https://doi.org/10.1093/hmg/9.20.3101
Myers, M.G., Olson, D.P., 2012. Central nervous system control of metabolism. Nature 491, 357–363. https://doi.org/10.1038/nature11705
Nagasawa, M., Kikusui, T., Onaka, T., Ohta, M., 2009. Dog's gaze at its owner increases owner's urinary oxytocin during social interaction. Horm. Behav. 55, 434–441. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.12.002
Narita, K., Murata, T., Matsuoka, S., 2016. The ventromedial hypothalamus oxytocin induces locomotor behavior regulated by estrogen. Physiol. Behav. 164, 107–112. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.05.047
Naulé, L., Maione, L., Kaiser, U.B., 2020. Puberty, A Sensitive Window of Hypothalamic Development and Plasticity. Endocrinology 162, bqaa209. https://doi.org/10.1210/endocr/bqaa209
Neumann, I.D., 2002. Involvement of the brain oxytocin system in stress coping: interactions with the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Prog. Brain Res. 139, 147–162. https://doi.org/10.1016/s0079-6123(02)39014-9
Neumann, I.D., Landgraf, R., 2012. Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. Trends Neurosci. 35, 649–659. https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.08.004
Nijenhuis, W.A.J., Oosterom, J., Adan, R.A.H., 2001. AgRP(83–132) Acts as an Inverse Agonist on the Human-Melanocortin-4 Receptor. Mol. Endocrinol. 15, 164–171. https://doi.org/10.1210/mend.15.1.0578
Nishimori, K., Young, L.J., Guo, Q., Wang, Z., Insel, T.R., Matzuk, M.M., 1996. Oxytocin is required for nursing but is not essential for parturition or reproductive behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 11699–11704.
Noble, E.E., Billington, C.J., Kotz, C.M., Wang, C., 2014. Oxytocin in the ventromedial hypothalamic nucleus reduces feeding and acutely increases energy expenditure. Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. 307, R737–R745. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00118.2014

Noordam, C., Höybye, C., Eiholzer, U., 2021. Prader–Willi Syndrome and Hypogonadism: A Review Article. Int. J. Mol. Sci. 22, 2705. https://doi.org/10.3390/ijms22052705
Olazábal, D.E., Young, L.J., 2006. Oxytocin receptors in the nucleus accumbens facilitate "spontaneous" maternal behavior in adult female prairie voles. Neuroscience 141, 559–568. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.04.017
Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.-K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., Barsh, G.S., 1997. Antagonism of Central Melanocortin Receptors in Vitro and in Vivo by Agouti-Related Protein. Science 278, 135–138. https://doi.org/10.1126/science.278.5335.135
Olney, J.W., 1969. Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. Science 164, 719–721. https://doi.org/10.1126/science.164.3880.719
Olson, B.R., Drutarosky, M.D., Chow, M.S., Hruby, V.J., Stricker, E.M., Verbalis, J.G., 1991. Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. Peptides 12, 113–118. https://doi.org/10.1016/0196-9781(91)90176-p
Olszewski, P.K., Allen, K., Levine, A.S., 2015. Effect of oxytocin receptor blockade on appetite for sugar is modified by social context. Appetite 86, 81–87. https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.10.007
Olszewski, P.K., Klockars, A., Levine, A.S., 2016. Oxytocin: A Conditional Anorexigen whose Effects on Appetite Depend on the Physiological, Behavioural and Social Contexts. J. Neuroendocrinol. 28. https://doi.org/10.1111/jne.12376
Olszewski, P.K., Waas, J.R., Brooks, L.L., Herisson, F., Levine, A.S., 2013. Oxytocin receptor blockade reduces acquisition but not retrieval of taste aversion and blunts responsiveness of amygdala neurons to an aversive stimulus. Peptides 50, 36–41. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.09.008
Olszewski, P.K., Wirth, M.M., Shaw, T.J., Grace, M.K., Billington, C.J., Giraudo, S.Q., Levine, A.S., 2001. Role of alpha-MSH in the regulation of consummatory behavior: immunohistochemical evidence. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 281, R673-680. https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.281.2.R673
Oncul, M., Dilsiz, P., Ates Oz, E., Ates, T., Aklan, I., Celik, E., Sayar Atasoy, N., Atasoy, D., 2018. Impaired melanocortin pathway function in Prader-Willi syndrome gene-Magel2 deficient mice. Hum. Mol. Genet. 27, 3129–3136. https://doi.org/10.1093/hmg/ddy216
Ong, Z.Y., Alhadeff, A.L., Grill, H.J., 2015. Medial nucleus tractus solitarius oxytocin receptor signaling and food intake control: the role of gastrointestinal satiation signal processing. Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. 308, R800–R806. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00534.2014
Ooi, Y.P., Weng, S.-J., Kossowsky, J., Gerger, H., Sung, M., 2017. Oxytocin and Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Pharmacopsychiatry 50, 5–13. https://doi.org/10.1055/s-0042-109400
Ott, I., Scott, J.C., 1910. The action of infundibulin upon the mammary secretion. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 8, 48–49. https://doi.org/10.3181/00379727-8-27
Pace, M., Falappa, M., Freschi, A., Balzani, E., Berteotti, C., Lo Martire, V., Kaveh, F., Hovig, E., Zoccoli, G., Amici, R., Cerri, M., Urbanucci, A., Tucci, V., 2020. Loss of Snord116 impacts lateral hypothalamus, sleep, and food-related behaviors. JCI Insight 5, e137495, 137495. https://doi.org/10.1172/jci.insight.137495
Padilla, S.L., Carmody, J.S., Zeltser, L.M., 2010. Pomc-expressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. Nat. Med. 16, 403–405. https://doi.org/10.1038/nm.2126
Palmert, M.R., Boepple, P.A., 2001. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 2364–2368. https://doi.org/10.1210/jcem.86.6.7603
Palou, M., Sánchez, J., Rodríguez, A.M., Priego, T., Picó, C., Palou, A., 2009. Induction of NPY/AgRP Orexigenic Peptide Expression in Rat Hypothalamus is an early Event in Fasting: Relationship with Circulating Leptin, Insulin and Glucose. Cell. Physiol. Biochem. 23, 115–124. https://doi.org/10.1159/000204100

Parent, A.-S., Rasier, G., Matagne, V., Lomniczi, A., Lebrethon, M.-C., Gérard, A., Ojeda, S.R., Bourguignon, J.-P., 2008. Oxytocin Facilitates Female Sexual Maturation through a Glia-to-Neuron Signaling Pathway. Endocrinology 149, 1358–1365. https://doi.org/10.1210/en.2007-1054

Park, S., Jang, A., Bouret, S.G., 2020. Maternal obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes metabolic alterations and abnormal hypothalamic development in the offspring. PLOS Biol. 18, e3000296. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000296

Parker, J.A., Bloom, S.R., 2012. Hypothalamic neuropeptides and the regulation of appetite. Neuropharmacology, Central Regulation of Food Intake and Energy Expenditure 63, 18–30. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.02.004

Parton, L.E., Ye, C.P., Coppari, R., Enriori, P.J., Choi, B., Zhang, C.-Y., Xu, C., Vianna, C.R., Balthasar, N., Lee, C.E., Elmquist, J.K., Cowley, M.A., Lowell, B.B., 2007. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. Nature 449, 228–232. https://doi.org/10.1038/nature06098

Pedersen, C.A., Ascher, J.A., Monroe, Y.L., Prange, A.J., 1982. Oxytocin induces maternal behavior in virgin female rats. Science 216, 648–650. https://doi.org/10.1126/science.7071605

Pedersen, C.A., Prange, A.J., 1979. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 6661–6665.

Pekarek, B.T., Kochukov, M., Lozzi, B., Wu, T., Hunt, P.J., Tepe, B., Hanson Moss, E., Tantry, E.K., Swanson, J.L., Dooling, S.W., Patel, M., Belfort, B.D.W., Romero, J.M., Bao, S., Hill, M.C., Arenkiel, B.R., 2022. Oxytocin signaling is necessary for synaptic maturation of adult-born neurons. Genes Dev. 36, 1100–1118. https://doi.org/10.1101/gad.349930.122

Perello, M., Raingo, J., 2013. Leptin Activates Oxytocin Neurons of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus in Both Control and Diet-Induced Obese Rodents. PLoS ONE 8, e59625. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059625

Peris, J., MacFadyen, K., Smith, J.A., de Kloet, A.D., Wang, L., Krause, E.G., 2017. Oxytocin Receptors Are Expressed on Dopamine and Glutamate Neurons in the Mouse Ventral Tegmental Area That Project to Nucleus Accumbens and Other Mesolimbic Targets. J. Comp. Neurol. 525, 1094–1108. https://doi.org/10.1002/cne.24116

Peters, J.H., McDougall, S.J., Kellett, D.O., Jordan, D., Llewellyn-Smith, I.J., Andresen, M.C., 2008. Oxytocin Enhances Cranial Visceral Afferent Synaptic Transmission to the Solitary Tract Nucleus. J. Neurosci. 28, 11731–11740. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3419-08.2008

Petrovic, P., Kalisch, R., Singer, T., Dolan, R.J., 2008. Oxytocin Attenuates Affective Evaluations of Conditioned Faces and Amygdala Activity. J. Neurosci. 28, 6607–6615. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4572-07.2008

Polex-Wolf, J., Lam, B.Y.H., Larder, R., Tadross, J., Rimmington, D., Bosch, F., Cenzano, V.J., Ayuso, E., Ma, M.K.L., Rainbow, K., Coll, A.P., O'Rahilly, S., Yeo, G.S.H., n.d. Hypothalamic loss of Snord116 recapitulates the hyperphagia of Prader-Willi syndrome. J. Clin. Invest. 128, 960–969. https://doi.org/10.1172/JCI97007

Poljak, A., Sachdev, P., 2021. The need for a reliable oxytocin assay. Mol. Psychiatry 26, 6107–6108. https://doi.org/10.1038/s41380-021-01114-0

Popik, P., van Ree, J.M., 1991. Oxytocin but not vasopressin facilitates social recognition following injection into the medial preoptic area of the rat brain. Eur. Neuropsychopharmacol. J. Eur. Coll. Neuropsychopharmacol. 1, 555–560. https://doi.org/10.1016/0924-977x(91)90010-r

Powell, W.T., Coulson, R.L., Crary, F.K., Wong, S.S., Ach, R.A., Tsang, P., Alice Yamada, N., Yasui, D.H., LaSalle, J.M., 2013. A Prader–Willi locus lncRNA cloud modulates diurnal genes and energy expenditure. Hum. Mol. Genet. 22, 4318–4328. https://doi.org/10.1093/hmg/ddt281

Prader, A., 1956. Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach myatonieartigem Zustand im Neugeborenenalter. Schweiz. Med. Wochenschr.

Prader-Willi France, n.d. Prader-Willi France. Prader-Willi Fr. URL https://www.prader-willi.fr/conseils_pratiques/questions-frequentes/ (accessed 5.30.24).

Proffitt, J., Osann, K., McManus, B., Kimonis, V.E., Heinemann, J., Butler, M.G., Stevenson, D.A., Gold, J.-A., 2019. Contributing factors of mortality in Prader–Willi syndrome. Am. J. Med. Genet. A. 179, 196–205. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.60688

Qi, Y., Purtell, L., Fu, M., Lee, N.J., Aepler, J., Zhang, L., Loh, K., Enriquez, R.F., Baldock, P.A., Zolotukhin, S., Campbell, L.V., Herzog, H., 2016. Snord116 is critical in the regulation of food intake and body weight. Sci. Rep. 6, 18614. https://doi.org/10.1038/srep18614

Rayner, D.V., Dalgliesh, G.D., Duncan, J.S., Hardie, L.J., Hoggard, N., Trayhurn, P., 1997. Postnatal development of the ob gene system: elevated leptin levels in suckling fa/fa rats. Am. J. Physiol. 273, R446-450. https://doi.org/10.1152/ajpregu.1997.273.1.R446

Reichova, A., Schaller, F., Bukatova, S., Bacova, Z., Muscatelli, F., Bakos, J., 2021. The impact of oxytocin on neurite outgrowth and synaptic proteins in Magel2-deficient mice. Dev. Neurobiol. 81, 366–388. https://doi.org/10.1002/dneu.22815

Ren, J., Lee, S., Pagliardini, S., Gérard, M., Stewart, C.L., Greer, J.J., Wevrick, R., 2003. Absence of Ndn, Encoding the Prader-Willi Syndrome-Deleted Gene necdin, Results in Congenital Deficiency of Central Respiratory Drive in Neonatal Mice. J. Neurosci. 23, 1569–1573. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-05-01569.2003

Renaud, L.P., Bourque, C.W., 1991. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. Prog. Neurobiol. 36, 131–169. https://doi.org/10.1016/0301-0082(91)90020-2

Rice, L.J., Einfeld, S.L., Hu, N., Carter, C.S., 2018. A review of clinical trials of oxytocin in Prader-Willi syndrome. Curr. Opin. Psychiatry 31, 123–127. https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000391

Richard, S., Zingg, H.H., 1990. The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. J. Biol. Chem. 265, 6098–6103.

Richter, O.N., Kübler, K., Schmolling, J., Kupka, M., Reinsberg, J., Ulrich, U., van der Ven, H., Wardelmann, E., van der Ven, K., 2004. Oxytocin receptor gene expression of estrogen-stimulated human myometrium in extracorporeally perfused non-pregnant uteri. Mol. Hum. Reprod. 10, 339–346. https://doi.org/10.1093/molehr/gah039

Rieusset, A., Schaller, F., Unmehopa, U., Matarazzo, V., Watrin, F., Linke, M., Georges, B., Bischof, J., Dijkstra, F., Bloemsma, M., Corby, S., Michel, F.J., Wevrick, R., Zechner, U., Swaab, D., Dudley, K., Bezin, L., Muscatelli, F., 2013. Stochastic Loss of Silencing of the Imprinted Ndn/NDN Allele, in a Mouse Model and Humans with Prader-Willi Syndrome, Has Functional Consequences. PLoS Genet. 9, e1003752. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003752

Rimmele, U., Hediger, K., Heinrichs, M., Klaver, P., 2009. Oxytocin Makes a Face in Memory Familiar. J. Neurosci. 29, 38–42. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4260-08.2009

Rinaman, L., Rothe, E.E., 2002. GLP-1 receptor signaling contributes to anorexigenic effect of centrally administered oxytocin in rats. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 283, R99-106. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00008.2002

Roof, E., Deal, C.L., McCandless, S.E., Cowan, R.L., Miller, J.L., Hamilton, J.K., Roeder, E.R., McCormack, S.E., Roshan Lal, T.R., Abdul-Latif, H.D., Haqq, A.M., Obrynba, K.S., Torchen, L.C., Vidmar, A.P., Viskochil, D.H., Chanoine, J.-P., Lam, C.K.L., Pierce, M.J., Williams, L.L., Bird, L.M., Butler, M.G., Jensen, D.E., Myers, S.E., Oatman, O.J., Baskaran, C., Chalmers, L.J., Fu, C., Alos, N., McLean, S.D., Shah, A., Whitman, B.Y., Blumenstein, B.A., Leonard, S.F., Ernest, J.P., Cormier, J.W., Cotter, S.P., Ryman, D.C., 2023. Intranasal Carbetocin Reduces Hyperphagia, Anxiousness, and Distress in Prader-Willi Syndrome: CARE-PWS Phase 3 Trial. J. Clin. Endocrinol. Metab. 108, 1696–1708. https://doi.org/10.1210/clinem/dgad015

Rossi, M., Kim, M.S., Morgan, D.G.A., Small, C.J., Edwards, C.M.B., Sunter, D., Abusnana, S., Goldstone, A.P., Russell, S.H., Stanley, S.A., Smith, D.M., Yagaloff, K., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 1998. A C-Terminal Fragment of Agouti-Related Protein Increases Feeding and Antagonizes the Effect of Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone in Vivo. Endocrinology 139, 4428–4431. https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6332

Routh, V.H., 2010. Glucose Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamus. Sensors 10, 9002–9025. https://doi.org/10.3390/s101009002
Ruohonen, S.T., Vähätalo, L.H., Savontaus, E., 2012. Diet-induced obesity in mice overexpressing neuropeptide y in noradrenergic neurons. Int. J. Pept. 2012, 452524. https://doi.org/10.1155/2012/452524
Sabatier, N., Rowe, I., Leng, G., 2007. Central release of oxytocin and the ventromedial hypothalamus. Biochem. Soc. Trans. 35, 1247–1251. https://doi.org/10.1042/BST0351247
Sauer, C., 1935. THE INTERNAL BOUNDARY O F THE NEURAL TUBE.
Sausville, E., Carney, D., Battey, J., 1985. The human vasopressin gene is linked to the oxytocin gene and is selectively expressed in a cultured lung cancer cell line. J. Biol. Chem. 260, 10236–10241.
Savaskan, E., Ehrhardt, R., Schulz, A., Walter, M., Schächinger, H., 2008. Post-learning intranasal oxytocin modulates human memory for facial identity. Psychoneuroendocrinology 33, 368–374. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.12.004
Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., 1982. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. J. Comp. Neurol. 205, 260–272. https://doi.org/10.1002/cne.902050306
Schaaf, C.P., Gonzalez-Garay, M.L., Xia, F., Potocki, L., Gripp, K.W., Zhang, B., Peters, B.A., McElwain, M.A., Drmanac, R., Beaudet, A.L., Caskey, C.T., Yang, Y., 2013. Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. Nat. Genet. 45, 1405–1408. https://doi.org/10.1038/ng.2776
Schaller, F., Watrin, F., Sturny, R., Massacrier, A., Szepetowski, P., Muscatelli, F., 2010. A single postnatal injection of oxytocin rescues the lethal feeding behaviour in mouse newborns deficient for the imprinted Magel2 gene. Hum. Mol. Genet. 19, 4895–4905. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq424
Schechter, R., Abboud, M., Johnson, G., 1999. Brain endogenous insulin effects on neurite growth within fetal rat neuron cell cultures. Brain Res. Dev. Brain Res. 116, 159–167. https://doi.org/10.1016/s0165-3806(99)00089-9
Schrander-Stumpel, C.T.R.M., Curfs, L.M.G., Sastrowijoto, P., Cassidy, S.B., Schrander, J.J.P., Fryns, J.-P., 2004. Prader-Willi syndrome: causes of death in an international series of 27 cases. Am. J. Med. Genet. A. 124A, 333–338. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.20371
Schreiner, F., Gohlke, B., Hamm, M., Korsch, E., Woelfle, J., 2014. MKRN3 mutations in familial central precocious puberty. Horm. Res. Paediatr. 82, 122–126. https://doi.org/10.1159/000362815
Schulze, A., Mogensen, H., Hamborg-Petersen, B., Graem, N., Ostergaard, J.R., Brøndum-Nielsen, K., 2001. Fertility in Prader-Willi syndrome: a case report with Angelman syndrome in the offspring. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 90, 455–459.
Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., Baskin, D.G., 2000. Central nervous system control of food intake. Nature 404, 661–671. https://doi.org/10.1038/35007534
Schwartz, Y., Goodman, H.M., Yamaguchi, H., 1991. Refractoriness to growth hormone is associated with increased intracellular calcium in rat adipocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 6790–6794. https://doi.org/10.1073/pnas.88.15.6790
Sclafani, A., Rinaman, L., Vollmer, R.R., Amico, J.A., 2007. Oxytocin Knockout Mice Demonstrate Enhanced Intake of Sweet and Non-Sweet Carbohydrate Solutions. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 292, R1828–R1833. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00826.2006
Shamay-Tsoory, S.G., Abu-Akel, A., 2016. The Social Salience Hypothesis of Oxytocin. Biol. Psychiatry 79, 194–202. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.07.020
Shen, W., Yao, T., Kong, X., Williams, K.W., Liu, T., 2017. Melanocortin neurons: Multiple routes to regulation of metabolism. Biochim. Biophys. Acta 1863, 2477–2485. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.05.007
Shimada, M., Nakamura, T., 1973. Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei. Exp. Neurol. 41, 163–173. https://doi.org/10.1016/0014-4886(73)90187-8

Shimada, M., Tritos, N.A., Lowell, B.B., Flier, J.S., Maratos-Flier, E., 1998. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. Nature 396, 670–674. https://doi.org/10.1038/25341

Shutter, J.R., Graham, M., Kinsey, A.C., Scully, S., Lüthy, R., Stark, K.L., 1997. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is up-regulated in obese and diabetic mutant mice. Genes Dev. 11, 593–602. https://doi.org/10.1101/gad.11.5.593

Simerly, R.B., 2015. Chapter 13 - Organization of the Hypothalamus, in: Paxinos, G. (Ed.), The Rat Nervous System (Fourth Edition). Academic Press, San Diego, pp. 267–294. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374245-2.00013-9

Sindelar, D.K., Palmiter, R.D., Woods, S.C., Schwartz, M.W., 2005. Attenuated feeding responses to circadian and palatability cues in mice lacking neuropeptide Y. Peptides 26, 2597–2602. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.04.018

Skryabin, B.V., Gubar, L.V., Seeger, B., Pfeiffer, J., Handel, S., Robeck, T., Karpova, E., Rozhdestvensky, T.S., Brosius, J., 2007. Deletion of the MBII-85 snoRNA Gene Cluster in Mice Results in Postnatal Growth Retardation. PLoS Genet. 3, e235. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030235

Son, S., Manjila, S.B., Newmaster, K.T., Wu, Y.-T., Vanselow, D.J., Ciarletta, M., Anthony, T.E., Cheng, K.C., Kim, Y., 2022. Whole-Brain Wiring Diagram of Oxytocin System in Adult Mice. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 42, 5021–5033. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0307-22.2022

Stachowiak, A., Macchi, C., Nussdorfer, G.G., Malendowicz, L.K., 1995. Effects of oxytocin on the function and morphology of the rat adrenal cortex: in vitro and in vivo investigations. Res. Exp. Med. Z. Gesamte Exp. Med. Einschl. Exp. Chir. 195, 265–274. https://doi.org/10.1007/BF02576797

Stanley, B.G., Leibowitz, S.F., 1985. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. Proc. Natl. Acad. Sci. 82, 3940–3943. https://doi.org/10.1073/pnas.82.11.3940

Stanley, B.G., Magdalin, W., Seirafi, A., Thomas, W.J., Leibowitz, S.F., 1993. The perifornical area: the major focus of (a) patchily distributed hypothalamic neuropeptide Y-sensitive feeding system(s). Brain Res. 604, 304–317. https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90382-w

Steculorum, S.M., Collden, G., Coupe, B., Croizier, S., Lockie, S., Andrews, Z.B., Jarosch, F., Klussmann, S., Bouret, S.G., 2015. Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits. J. Clin. Invest. 125, 846–858. https://doi.org/10.1172/JCI73688

Stock, S., Fastbom, J., Björkstrand, E., Ungerstedt, U., Uvnäs-Moberg, K., 1990. Effects of oxytocin on in vivo release of insulin and glucagon studied by microdialysis in the rat pancreas and autoradiographic evidence for [3H]oxytocin binding sites within the islets of Langerhans. Regul. Pept. 30, 1–13. https://doi.org/10.1016/0167-0115(90)90130-o

Stoneham, M.D., Everitt, B.J., Hansen, S., Lightman, S.L., Todd, K., 1985. Oxytocin and sexual behaviour in the male rat and rabbit. J. Endocrinol. 107, 97–106. https://doi.org/10.1677/joe.0.1070097

Sun, L., Lizneva, D., Ji, Y., Colaianni, G., Hadelia, E., Gumerova, A., Ievleva, K., Kuo, T.-C., Korkmaz, F., Ryu, V., Rahimova, A., Gera, S., Taneja, C., Khan, A., Ahmad, N., Tamma, R., Bian, Z., Zallone, A., Kim, S.-M., New, M.I., Iqbal, J., Yuen, T., Zaidi, M., 2019. Oxytocin regulates body composition. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 116, 26808–26815. https://doi.org/10.1073/pnas.1913611116

Swaab, D.F., 1997. Prader-Willi syndrome and the hypothalamus. Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992 Suppl. 423, 50–54. https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1997.tb18369.x

Swaab, D.F., Purba, J.S., Hofman, M.A., 1995. Alterations in the hypothalamic paraventricular nucleus and its oxytocin neurons (putative satiety cells) in Prader-Willi syndrome: a study of five cases. J. Clin. Endocrinol. Metab. 80, 573–579. https://doi.org/10.1210/jcem.80.2.7852523

Swart, I., Jahng, J.W., Overton, J.M., Houpt, T.A., 2002. Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 283, R1020-1026. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00501.2001

Takayanagi, Y., Kasahara, Y., Onaka, T., Takahashi, N., Kawada, T., Nishimori, K., 2008. Oxytocin receptor-deficient mice developed late-onset obesity. NeuroReport 19, 951–955. https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e3283021ca9

Takayanagi, Y., Yoshida, M., Bielsky, I.F., Ross, H.E., Kawamata, M., Onaka, T., Yanagisawa, T., Kimura, T., Matzuk, M.M., Young, L.J., Nishimori, K., 2005. Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 16096–16101. https://doi.org/10.1073/pnas.0505312102

Tamada, K., Fukumoto, K., Toya, T., Nakai, N., Awasthi, J.R., Tanaka, S., Okabe, S., Spitz, F., Saitow, F., Suzuki, H., Takumi, T., 2021. Genetic dissection identifies Necdin as a driver gene in a mouse model of paternal 15q duplications. Nat. Commun. 12, 4056. https://doi.org/10.1038/s41467-021-24359-3

Tamma, R., Colaianni, G., Zhu, L., DiBenedetto, A., Greco, G., Montemurro, G., Patano, N., Strippoli, M., Vergari, R., Mancini, L., Colucci, S., Grano, M., Faccio, R., Liu, X., Li, J., Usmani, S., Bachar, M., Bab, I., Nishimori, K., Young, L.J., Buettner, C., Iqbal, J., Sun, L., Zaidi, M., Zallone, A., 2009. Oxytocin is an anabolic bone hormone. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106, 7149–7154. https://doi.org/10.1073/pnas.0901890106

Tauber, M., Boulanouar, K., Diene, G., Çabal-Berthoumieu, S., Ehlinger, V., Fichaux-Bourin, P., Molinas, C., Faye, S., Valette, M., Pourrinet, J., Cessans, C., Viaux-Sauvelon, S., Bascoul, C., Guedeney, A., Delhanty, P., Geenen, V., Martens, H., Muscatelli, F., Cohen, D., Consoli, A., Payoux, P., Arnaud, C., Salles, J.-P., 2017. The Use of Oxytocin to Improve Feeding and Social Skills in Infants With Prader-Willi Syndrome. Pediatrics 139, e20162976. https://doi.org/10.1542/peds.2016-2976

Tauber, M., Mantoulan, C., Copet, P., Jauregui, J., Demeer, G., Diene, G., Rogé, B., Laurier, V., Ehlinger, V., Arnaud, C., Molinas, C., Thuilleaux, D., 2011. Oxytocin may be useful to increase trust in others and decrease disruptive behaviours in patients with Prader-Willi syndrome: a randomised placebo-controlled trial in 24 patients. Orphanet J. Rare Dis. 6, 47. https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-47

Tennese, A.A., Gee, C.B., Wevrick, R., 2008. Loss of the Prader-Willi syndrome protein necdin causes defective migration, axonal outgrowth, and survival of embryonic sympathetic neurons. Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat. 237, 1935–1943. https://doi.org/10.1002/dvdy.21615

Terasawa, E., Garcia, J.P., Seminara, S.B., Keen, K.L., 2018. Role of Kisspeptin and Neurokinin B in Puberty in Female Non-Human Primates. Front. Endocrinol. 9, 148. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00148

Tiesjema, B., la Fleur, S.E., Luijendijk, M.C.M., Adan, R.A.H., 2009. Sustained NPY Overexpression in the PVN Results in Obesity via Temporarily Increasing Food Intake. Obesity 17, 1448–1450. https://doi.org/10.1038/oby.2008.670

Tojima, T., Itofusa, R., Kamiguchi, H., 2009. The Nitric Oxide–cGMP Pathway Controls the Directional Polarity of Growth Cone Guidance via Modulating Cytosolic Ca2+ Signals. J. Neurosci. 29, 7886–7897. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0087-09.2009

Tomizawa, K., Iga, N., Lu, Y.-F., Moriwaki, A., Matsushita, M., Li, S.-T., Miyamoto, O., Itano, T., Matsui, H., 2003. Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade. Nat. Neurosci. 6, 384–390. https://doi.org/10.1038/nn1023

Tops, M., van Peer, J.M., Korf, J., Wijers, A.A., Tucker, D.M., 2007. Anxiety, cortisol, and attachment predict plasma oxytocin. Psychophysiology 44, 444–449. https://doi.org/10.1111/j.1469-8986.2007.00510.x

Tsai, T.F., Armstrong, D., Beaudet, A.L., 1999a. Necdin-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome. Nat. Genet. 22, 15–16. https://doi.org/10.1038/8722

Tsai, T.F., Jiang, Y.H., Bressler, J., Armstrong, D., Beaudet, A.L., 1999b. Paternal deletion from Snrpn to Ube3a in the mouse causes hypotonia, growth retardation and partial lethality and provides evidence for a gene contributing to Prader-Willi syndrome. Hum. Mol. Genet. 8, 1357–1364. https://doi.org/10.1093/hmg/8.8.1357

Turkkahraman, D., Sirazi, E.C., Aykal, G., 2022. Serum alpha-melanocyte-stimulating hormone (a-MSH), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and agouti-related protein (AGRP) levels in children with Prader-Willi or Bardet-Biedl syndromes. J. Endocrinol. Invest. 45, 1031–1037. https://doi.org/10.1007/s40618-021-01737-8

Tyzio, R., Cossart, R., Khalilov, I., Minlebaev, M., Hübner, C.A., Represa, A., Ben-Ari, Y., Khazipov, R., 2006. Maternal oxytocin triggers a transient inhibitory switch in GABA signaling in the fetal brain during delivery. Science 314, 1788–1792. https://doi.org/10.1126/science.1133212

Uhl-Bronner, S., Waltisperger, E., Martínez-Lorenzana, G., Condes Lara, M., Freund-Mercier, M.J., 2005. Sexually dimorphic expression of oxytocin binding sites in forebrain and spinal cord of the rat. Neuroscience 135, 147–154. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.025

Valassi, E., Scacchi, M., Cavagnini, F., 2008. Neuroendocrine control of food intake. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 18, 158–168. https://doi.org/10.1016/j.numecd.2007.06.004

van der Klaauw, A.A., Croizier, S., Mendes de Oliveira, E., Stadler, L.K.J., Park, S., Kong, Y., Banton, M.C., Tandon, P., Hendricks, A.E., Keogh, J.M., Riley, S.E., Papadia, S., Henning, E., Bounds, R., Bochukova, E.G., Mistry, V., O'Rahilly, S., Simerly, R.B., Minchin, J.E.N., Barroso, I., Jones, E.Y., Bouret, S.G., Farooqi, I.S., 2019. Human Semaphorin 3 Variants Link Melanocortin Circuit Development and Energy Balance. Cell 176, 729-742.e18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.009

Velmurugan, S., Russell, J.A., Leng, G., 2013. Systemic leptin increases the electrical activity of supraoptic nucleus oxytocin neurones in virgin and late pregnant rats. J. Neuroendocrinol. 25, 383–390. https://doi.org/10.1111/jne.12016

Vigneaud, V. du, Ressler, C., Swan, J.M., Roberts, C.W., Katsoyannis, P.G., 2002. The Synthesis of Oxytocin1 [WWW Document]. ACS Publ. https://doi.org/10.1021/ja01641a004

Vignozzi, L., Filippi, S., Luconi, M., Morelli, A., Mancina, R., Marini, M., Vannelli, G.B., Granchi, S., Orlando, C., Gelmini, S., Ledda, F., Forti, G., Maggi, M., 2004. Oxytocin receptor is expressed in the penis and mediates an estrogen-dependent smooth muscle contractility. Endocrinology 145, 1823–1834. https://doi.org/10.1210/en.2003-0962

Wald, H.S., Chandra, A., Kalluri, A., Ong, Z.Y., Hayes, M.R., Grill, H.J., 2020. NTS and VTA oxytocin reduces food motivation and food seeking. Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. 319, R673–R683. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00201.2020

Waldherr, M., Neumann, I.D., 2007. Centrally released oxytocin mediates mating-induced anxiolysis in male rats. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 16681–16684. https://doi.org/10.1073/pnas.0705860104

Welshhans, 2007. Nitric oxide regulates growth cone filopodial dynamics via ryanodine receptor-mediated calcium release - Welshhans - 2007 - European Journal of Neuroscience - Wiley Online Library [WWW Document]. URL https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1460-9568.2007.05768.x (accessed 6.15.24).

Whittington, J., Holland, A., Webb, T., Butler, J., Clarke, D., Boer, H., 2004. Academic underachievement by people with Prader-Willi syndrome. J. Intellect. Disabil. Res. JIDR 48, 188–200. https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2004.00473.x

Whittington, J.E., Butler, J.V., Holland, A.J., 2008. Pre-, peri- and postnatal complications in Prader-Willi syndrome in a UK sample. Early Hum. Dev. 84, 331–336. https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2007.08.007

Wijesuriya, T.M., De Ceuninck, L., Masschaele, D., Sanderson, M.R., Carias, K.V., Tavernier, J., Wevrick, R., 2017. The Prader-Willi syndrome proteins MAGEL2 and necdin regulate leptin receptor cell surface abundance through ubiquitination pathways. Hum. Mol. Genet. 26, 4215–4230. https://doi.org/10.1093/hmg/ddx311

Williams, J.R., Catania, K.C., Carter, C.S., 1992. Development of partner preferences in female prairie voles (Microtus ochrogaster): the role of social and sexual experience. Horm. Behav. 26, 339–349. https://doi.org/10.1016/0018-506x(92)90004-f
Williams, K.W., Elmquist, J.K., 2011. Lighting up the hypothalamus: coordinated control of feeding behavior. Nat. Neurosci. 14, 277–278. https://doi.org/10.1038/nn0311-277
Winslow, J.T., Hastings, N., Carter, C.S., Harbaugh, C.R., Insel, T.R., 1993. A role for central vasopressin in pair bonding in monogamous prairie voles. Nature 365, 545–548. https://doi.org/10.1038/365545a0
Winslow, J.T., Hearn, E.F., Ferguson, J., Young, L.J., Matzuk, M.M., Insel, T.R., 2000. Infant vocalization, adult aggression, and fear behavior of an oxytocin null mutant mouse. Horm. Behav. 37, 145–155. https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1566
Witt, D.M., 1995. Oxytocin and rodent sociosexual responses: from behavior to gene expression. Neurosci. Biobehav. Rev. 19, 315–324. https://doi.org/10.1016/0149-7634(95)00006-z
Witt, D.M., Winslow, J.T., Insel, T.R., 1992. Enhanced social interactions in rats following chronic, centrally infused oxytocin. Pharmacol. Biochem. Behav. 43, 855–861. https://doi.org/10.1016/0091-3057(92)90418-f
Woods, S.C., Seeley, R.J., Porte, D., Schwartz, M.W., 1998. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. Science 280, 1378–1383. https://doi.org/10.1126/science.280.5368.1378
Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillo, W.S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2001. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. J. Clin. Endocrinol. Metab. 86, 5992. https://doi.org/10.1210/jcem.86.12.8111
Wu, R.-N., Hung, W.-C., Chen, C.-T., Tsai, L.-P., Lai, W.-S., Min, M.-Y., Wong, S.-B., 2020. Firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons decreases in necdin-deficient mice, an animal model of Prader–Willi syndrome. J. Neurodev. Disord. 12, 21. https://doi.org/10.1186/s11689-020-09323-4
Xiao, L., Priest, M.F., Kozorovitskiy, Y., n.d. Oxytocin functions as a spatiotemporal filter for excitatory synaptic inputs to VTA dopamine neurons. eLife 7, e33892. https://doi.org/10.7554/eLife.33892
Yang, L., Scott, K.A., Hyun, J., Tamashiro, K.L., Tray, N., Moran, T.H., Bi, S., 2009. Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 29, 179–190. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4379-08.2009
Yang, T., Adamson, T.E., Resnick, J.L., Leff, S., Wevrick, R., Francke, U., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Brannan, C.I., 1998. A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-centre mutations. Nat. Genet. 19, 25–31. https://doi.org/10.1038/ng0598-25
Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., Hochgeschwender, U., 1999. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. Nat. Med. 5, 1066–1070. https://doi.org/10.1038/12506
Young, W.S., Gainer, H., 2003. Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors. Neuroendocrinology 78, 185–203. https://doi.org/10.1159/000073702
Young, W.S., Shepard, E., Amico, J., Hennighausen, L., Wagner, K.U., LaMarca, M.E., McKinney, C., Ginns, E.I., 1996. Deficiency in mouse oxytocin prevents milk ejection, but not fertility or parturition. J. Neuroendocrinol. 8, 847–853. https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1996.05266.x
Zanella, S., Watrin, F., Mebarek, S., Marly, F., Roussel, M., Gire, C., Diene, G., Tauber, M., Muscatelli, F., Hilaire, G., 2008. Necdin Plays a Role in the Serotonergic Modulation of the Mouse Respiratory Network: Implication for Prader-Willi Syndrome. J. Neurosci. 28, 1745–1755. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4334-07.2008
Zarjevski, N., Cusin, I., Vettor, R., Rohner-Jeanrenaud, F., Jeanrenaud, B., 1993. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and

metabolic changes of obesity. Endocrinology 133, 1753–1758. https://doi.org/10.1210/en.133.4.1753
Zeltser, L.M., Leibel, R.L., 2011. Roles of the placenta in fetal brain development. Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 15667–15668. https://doi.org/10.1073/pnas.1112239108
Zingg, H.H., Laporte, S.A., 2003. The oxytocin receptor. Trends Endocrinol. Metab. TEM 14, 222–227. https://doi.org/10.1016/s1043-2760(03)00080-8
Zingg, H.H., Rozen, F., Breton, C., Larcher, A., Neculcea, J., Chu, K., Russo, C., Arslan, A., 1995. Gonadal steroid regulation of oxytocin and oxytocin receptor gene expression. Adv. Exp. Med. Biol. 395, 395–404.

ABSTRACT

Title: Role of oxytocin neurons in the development of the melanocortinergic system and new perspectives on mouse models of prader-willi syndrome

Prader-Willi syndrome (PWS) is a disorder resulting from the absence of seven paternally inherited genes, resulting in a spectrum of phenotypic traits throughout life. Despite numerous clinical trials, there are no effective treatments for PWS, mainly due to a limited understanding of its pathophysiological mechanisms and the lack of suitable models. Among the genes inactivated in PWS, *NECDIN* and *MAGEL2* are of particular interest. KO mouse models for either of these genes show distinct phenotypes, but fail to reproduce the full PWS phenotype. *NECDIN* and *MAGEL2* belong to the MAGE family, and their molecular functions and expression profiles suggest compensation of one by the other. The overall goal of this thesis is to explore the genetic and neurodevelopmental mechanisms of PWS. The first objective is to characterize the phenotype of a new mouse model of PWS, called *Madin* KO, presenting a deletion of both *MAGEL2* and *NECDIN* genes. Through this double deletion, we aimed at abolishing the compensatory mechanisms between these two genes to better mimic the phenotype and genetic interactions involved in PWS. *Madin* KO mice display delayed growth and puberty, as well as respiratory and sucking difficulties, resembling the early stage of PWS. They also combine the metabolic and behavioral phenotypes found in single KO models and show impaired oxytocin (OT) maturation associated with disrupted development of the melanocortinergic system, two neuronal systems known to play a critical role in regulating food intake. OT plays an essential role in the regulation of eating behavior and social interactions, each of which impacting life of individuals with PWS. OT has emerged as a promising avenue for PWS research, with work reporting a beneficial effect of OT treatment on appetite regulation, particularly when administered during early in life. It is well known that abnormal programming of neurobiological systems during critical periods of life could lead to metabolic and behavioral disorders in adulthood. Furthermore, *Magel2* and *Madin* KO mice show alterations in the development of the melanocortinergic system. These observations suggest that OT may play a role in the development of proopiomelanocortin (POMC) and agouti-related peptide (AgRP) circuits. Therefore, the second aim of this thesis is to study the influence of OT neurons on the development of the melanocortinergic system and to determine whether there is a critical period for these effects. Our results show that the chemoinhibition of OT neurons during the first postnatal week, but not during adolescence or adulthood, alters the development of neural projections from POMC and AgRP neurons specifically to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. This effect is dependent on exocytosis release and mediated by OT signaling: genetic destruction of the SNARE complex in OT neurons or pharmacological inhibition of OTR alters the development of melanocortinergic circuits. Finally, chemoactivation of OT neurons in the Magel2-KO model restores projections from POMC neurons, indicating that dysfunctions in OT signaling contribute to the neurodevelopmental disturbances observed in PWS models. Collectively, our work helped characterize an animal model more relevant to PWS and revealed a novel role for OT in influencing the development of hypothalamic circuits controlling food intake during a neonatal critical period.

RESUME

Titre : Role des neurones a ocytocine dans le developpement du systeme melanocortinergique et nouvelles perspectives sur les modeles murins du syndrome de prader-willi

Le syndrome de Prader-Willi (SPW) est une maladie résultante de l'absence de sept gènes d'origine paternelle qui se manifeste par un développement complexe marqué par un spectre de traits phénotypiques tout au long de la vie. Malgré de nombreux essais cliniques, il n'existe pas de traitements efficaces pour le SPW, principalement en raison d'une compréhension limitée de ses mécanismes physiopathologiques et du manque de modèles adaptés. Parmi les gènes inactivés dans le SPW, *NECDIN* et *MAGEL2* sont particulièrement intéressants. Les modèles murin KO pour ces gènes présentent des phénotypes distincts mais ne parviennent pas à reproduire l'ensemble du phénotype du SPW. *NECDIN* et *MAGEL2* appartiennent à la famille MAGE. Leurs fonctions moléculaires et leurs profils d'expression suggèrent une compensation de l'un par l'autre. L'objectif général de cette thèse est d'explorer les mécanismes génétiques et neurodéveloppementaux du SPW. Le premier objectif est de caractériser le phénotype d'un nouveau modèle murin, appelé *Madin* KO, présentant une délétion des gènes *MAGEL2* et *NECDIN*. À travers cette double délétion, nous souhaitions abolir les mécanismes compensatoires entre ces deux gènes pour mieux reproduire le phénotype et les interactions génétiques impliquées dans le SPW. Les souris *Madin* KO présentent un retard de croissance et de puberté ainsi que des difficultés respiratoires et de succion, ressemblant au stade précoce du SPW. Elles combinent également les phénotypes métaboliques et comportementaux retrouvés dans les modèles simples KO et présentent une altération de la maturation de l'ocytocine (OT) associée à un développement perturbé du système mélanocortinergique, deux systèmes neuronaux connus pour jouer un rôle critique dans la régulation de la prise alimentaire. L'OT joue un rôle essentiel dans la régulation du comportement alimentaire et des interactions sociales, des éléments impactant les personnes atteintes du SPW. L'OT est devenue une voie thérapeutique prometteuse, grâce à des travaux rapportant un effet bénéfique de l'OT sur la régulation de l'appétit, en particulier lorsqu'elle est administrée tôt chez les patients atteints du SPW. Il est reconnu qu'une mauvaise programmation des systèmes neurobiologiques au cours de périodes critiques peut entraîner des troubles métaboliques et comportementaux à l'âge adulte. De plus, les souris *Magel2* et *Madin* KO présentent des altérations dans le développement du système mélanocortinergique. Ces observations suggèrent que l'OT pourrait jouer un rôle dans le développement des circuits issus de neurones à proopiomélanocortine (POMC) et agouti-related peptide (AgRP). Par conséquent, le second objectif de cette thèse est d'étudier l'influence des neurones à OT sur le développement du système mélanocortinergique et de déterminer s'il existe une période critique pour ces effets. Nos résultats montrent que la chémoinhibition des neurones à OT durant la première semaine post-natale, mais pas à l'adolescence ni à l'âge adulte, altère la mise en place des projections des neurones à POMC et d'AgRP spécifiquement vers le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Cet effet est dépendant de la libération par exocytose et médié par la signalisation de l'OT : la destruction génétique des composants du complexe SNARE dans les neurones à OT ou l'inhibition pharmacologique des récepteurs à l'OT altère également le développement des circuits mélanocortinergiques. Enfin, la chémoactivation des neurones OT chez les souris *Magel2*-KO restaure les projections des neurones à POMC, indiquant que les dysfonctionnements de cette signalisation contribuent aux perturbations neurodéveloppementales observées chez ces souris. Collectivement, nos travaux ont permis de caractériser un nouveau modèle plus représentatif du SPW et de souligner un rôle nouveau de l'OT dans le développement des réseaux hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire durant la première semaine de vie postnatale.