



La leptine : rôle physiologique dans la fonction somatotrope, transduction du signal et mécanismes d'internalisation

Sébastien Smallwood

► To cite this version:

Sébastien Smallwood. La leptine : rôle physiologique dans la fonction somatotrope, transduction du signal et mécanismes d'internalisation. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2007. Français. NNT : . tel-00143545

HAL Id: tel-00143545

<https://theses.hal.science/tel-00143545>

Submitted on 25 Apr 2007

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

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

THESE
présentée
devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1
pour l'obtention
du DIPLOME DE DOCTORAT
(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 20 avril 2007

par
Sébastien SMALLWOOD

**La leptine : rôle physiologique dans la fonction somatotrope,
transduction du signal et mécanismes d'internalisation.**

Directeur de thèse : M. Gérard MOREL, Directeur de recherche

JURY :	M. Jean-Marc PEQUIGNOT, Professeur	Président
	Mme. Lynda WILLIAMS, Directeur de recherche	Rapporteur
	M. Tomas GARCIA-CABALLERO, Professeur	Rapporteur
	Mme. Martine BEGEOT, Directeur de recherche	Examineur
	M. Jean MAZELLA, Directeur de recherche	Examineur
	M. Gérard MOREL, Directeur de recherche	Examineur

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE INTEGRATIVE, CELLULAIRE ET MOLECULAIRE
UMR CNRS 5123
UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

Président de l'Université

Vice-Président du Conseil Scientifique

Vice-Président du Conseil d'Administration

Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie

Universitaire

Secrétaire Général

M. le Professeur L. COLLET

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

SECTEUR SANTE

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur D. VITAL-DURAND

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur F. MAUGUIERE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en
Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

SECTEUR SCIENCES

Composantes

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur
de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur A. HOAREAU

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur A. BRIGUET

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur M. CHAMARIE

Directeur : M. le Professeur M. EGEA

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. le Professeur R. MASSARELLI

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

A mes grands-parents,
qui ont su me communiquer leur passion du savoir.

un travail de thèse est à la fois solitaire et dépendant des autres. De nombreuses personnes ont été indispensables à sa réalisation...

Je remercie tout d'abord le Dr Gérard Morel de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir dirigé ce travail. En tant que directeur de thèse, il a su me laisser une grande liberté dans la gestion de mon travail. J'ai ainsi acquis l'autonomie et l'expérience nécessaires pour envisager l'avenir avec confiance.

Je remercie sincèrement le Pr Jean-Marc Péquignot d'accepter de présider le jury de ma thèse, ainsi que pour sa disponibilité et son aide en tant que directeur d'unité.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Dr Lynda Williams de m'avoir accueilli quelques mois dans son équipe, de m'avoir beaucoup appris sur la gestion d'un projet scientifique et de me faire l'honneur de participer en tant que rapporteur à mon jury de thèse. Mon séjour écossais restera une grande expérience professionnelle et humaine.

Je remercie le Pr Tomas García Caballero d'avoir accepté la charge de rapporteur et le travail qui en découle. Sa lecture attentive de ce manuscrit et ses conseils avisés ont permis indéniablement d'améliorer la qualité de cette thèse.

Je remercie également le Dr Martine Bégeot et le Dr Jean Mazella d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie le Dr Mireille Raccurt pour son aide dans les expériences de quantification de fluorescence et dans la gestion du laboratoire. J'ai également, à son contact, beaucoup appris sur les relations politiques et humaines dans le monde de la recherche scientifique. Je remercie sincèrement Khédidja pour son aide dans la réalisation des expériences, ainsi que pour sa gentillesse et son sourire ; travailler avec une telle personne est un plaisir quotidien. Un grand merci également à Cécile, Sahra et Jérémie pour les petits coups de mains et pour m'avoir supporté, surtout le matin, durant ces dernières années. Je suis sûr que tout se passera bien pour vous dans la fin de vos études, et en tant qu'ancien et

« thésard expérimenté » vous pourrez toujours compter sur mon aide. Merci au Dr Sharon Mitchell pour son aide lors de mon séjour écossais et son amitié. Un grand merci au Dr Christine Bertier pour sa bonne humeur contagieuse lors de nos « kebab breacks ».

Je remercie le Pr Robert Bonvallet, le Dr Christophe Chouabe et le Dr Estelle Ricci de m'avoir impliqué dans leurs projets de recherche et de m'avoir fait confiance. Merci aussi pour les bons moments partagés au cours des réunions européennes.

Merci également à toutes les autres personnes qui ont pu m'aider, m'offrir des cigarettes ou un café...

Merci à ma famille pour son soutien, et plus particulièrement à ma mère pour m'avoir supporté et m'avoir laissé libre de mes choix au cours de mes études, et à mes grands-parents à qui je dédie cette thèse. Un salut à Olivier, futur docteur également, et à Xavier qui le sera peut être un jour...

Enfin un grand merci au Dr Hichem Mertani pour son aide indispensable aussi bien sur le plan scientifique que moral. Sans lui ce travail n'aurait jamais vu le jour. Plus qu'un collègue, j'ai rencontré un ami et c'est certainement le plus important.

Et pour finir merci à Véronique sans qui rien ne serait possible...

Sommaire

Table des figures	14
Liste des abréviations	17
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	19
CHAPITRE 1 : La leptine et son récepteur.	20
I. La leptine.	20
I.1. La découverte de la leptine.	20
I.2. Le clonage du gène <i>obese</i> .	21
I.3. Les caractéristiques du gène <i>obese</i> .	22
I.3.a. Caractéristiques de la séquence codante.	22
I.3.b. Caractéristiques du promoteur et de la région 3'.	22
I.3.c. De la séquence génique et protéique à la fonction.	23
II. Régulation de la synthèse de leptine.	25
II.1. Niveaux plasmatiques de leptine et nutrition.	25
II.2. Sécrétion de leptine et rythmes biologiques.	26
II.2.a. Rythme circadien.	26
II.2.b. Rythme ultradien	27
II.3. Facteurs régulant la sécrétion de leptine.	28
II.3.a. Effets de l'insuline et du glucose.	28
II.3.b. Autres facteurs.	29
III. Le récepteur de la leptine.	31
III.1. La découverte du récepteur de la leptine.	31
III.2. Les différentes isoformes du récepteur de la leptine.	32
III.2.a. L'isoforme longue ObRb.	33
III.2.b. Les isoformes courtes.	33
III.2.c. L'isoforme circulante ObRe.	34
III.3. Expression tissulaire du récepteur de la leptine.	34
IV. Les voies de signalisation activées par le récepteur de la leptine.	35
IV.1. La dimérisation du récepteur.	36
IV.2. Les Janus Kinases (JAK).	36
IV.3. La voie STAT.	37
IV.4. La voie des MAPK.	38
IV.5. La voie IRS/PI3K.	40
IV.5.a. La relation entre leptine et insuline.	40
IV.5.b. L'activation des IRS et de la PI3K.	40

IV.5.c. Les protéines Akt et PKC.	42
IV.5.d. La voie IRS/PI3K au niveau central.	42
IV.6. Les régulateurs négatifs des voies de signalisation.	42
IV.6.a. SOCS-3.	42
IV.6.b. PTP1B.	43
IV.7. Autres voies de signalisation induites par la leptine.	44
CHAPITRE 2 : Internalisation de la leptine et de son récepteur.	46
I. Internalisation par la voie dépendante de la clathrine.	47
I.1. Les composants des vésicules à clathrine.	47
I.1.a. La clathrine.	47
I.1.b. Le complexe AP-2.	48
I.1.c. Les dynamines.	49
I.1.d. Les protéines auxiliaires.	50
I.2. La formation des vésicules à clathrine et leur devenir.	50
I.2.a. La formation des CCP et des CCV.	50
I.2.b. Devenir des CCV et des récepteurs internalisés.	51
I.2.c. Le rôle des protéines Rab.	53
II. Internalisation via la voie des cavéoles.	54
II.1. La cavéoline et la formation des cavéoles.	55
II.2. Devenir des cavéoles.	56
II.3. Rôles du système cavéolaire d'endocytose.	56
III. Internalisation du récepteur de la leptine.	57
III.1. La cinétique d'internalisation et d'adressage à la membrane plasmique de ObR.	58
III.2. Les signaux d'internalisation.	58
III.3. Le mode d'internalisation de ObR.	59
III.4. Recyclage et dégradation.	59
III.5. Localisation intracellulaire de ObR.	60
IV. Internalisation et signalisation.	61
IV.1. Relation entre les composants des voies de signalisation et des vésicules à clathrine.	62
IV.2. Signalisation au niveau des « sorting endosomes ».	62
IV.3. Internalisation et activation spécifique des voies de signalisation.	64
CHAPITRE 3 : Les fonctions physiologiques de la leptine.	67
I. La régulation de la balance énergétique.	67
I.1. Les signaux périphériques.	68
I.1.a. La leptine et l'insuline.	68
I.1.b. Autres signaux périphériques.	68
L'Adiponectine :	69
Le Peptide YY ₃₋₃₆ » (PYY ₃₋₃₆) :	69
La ghréline :	69

I.2. La leptine et le passage de la barrière hémato-encéphalique.	69
I.3. La leptine et le système des neuropeptides hypothalamiques.	70
I.3.a. Les neuropeptides orexigènes de premier ordre.	71
Le neuropeptide Y (NPY).	71
Le « Agouti Related Peptide » (AgRP).	72
I.3.b. Les neuropeptides orexigènes de second ordre.	72
Les orexines ou hypocretines.	72
La « Melanin-Concentrating Hormone » (MCH).	73
La Galanine.	73
Le « Galanine-like Peptide » (GALP) :	73
I.3.c. Les neuropeptides anorexigènes de premier ordre.	74
POMC et les Mélanocortines.	74
Les « Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript » (CART).	74
I.3.d. Les neuropeptides anorexigènes de second ordre.	75
La « Corticotropin-Releasing Hormone » (CRH) et les Urocortines (UCN).	75
La «Thyrotropin-Releasing Hormone» (TRH).	75
L'ocytocine.	75
I.4 Mode d'action de la leptine sur le système des neurones orexigéniques / anorexigéniques.	76
I.4.a. Les neurones de premier ordre.	76
I.4.b Les neurones de deuxième ordre.	77
I.4c. Modérations et perspectives.	77
II. Leptine et obésité.	79
II.1. Le syndrome métabolique et l'obésité.	79
II.1.a. Définition du syndrome métabolique.	79
II.1.b. Impacts de l'obésité et du syndrome métabolique sur la société.	79
II.2. Obésité et hyperlipidémie.	81
II.2.a. Métabolisme lipidique suite à une prise alimentaire.	81
II.2.b. Métabolisme lipidique chez les individus obèses.	82
II.2.c. Les effets anaboliques de la leptine.	82
II.3. La résistance à la leptine.	84
II.3.a. Résistance centrale à la leptine et barrière hémato-encéphalique.	84
II.3.b. Résistance à la leptine et expression de ObR.	85
II.3.c. SOCS-3, PTP1B et résistance à la leptine.	85
SOCS-3 :	86
PTP1B :	86
III. Leptine et fonction cardiaque	87
CHAPITRE 4 : Leptine, ghréline et fonction somatotrope.	89
I. Hypophyse et cellules somatotropes.	89
I.1. L'hypophyse.	90
I.1.a. La neurohypophyse.	90

I.1.b. Le lobe intermédiaire.	90
I.1.c. L'adénohypophyse.	91
I.2. Les cellules somatotropes.	92
II. Régulation de la sécrétion de GH.	93
II.1. Caractéristiques de la sécrétion de GH.	93
II.2. Les sécrétagogues hypothalamiques GHRH et SRIF.	94
II.2.a. GHRH.	94
II.2.b. SRIF (ou somatostatine).	94
II.2.c. Intégration des signaux GHRH et SRIF par les cellules somatotropes.	95
II.3. L'axe somatotrope et les boucles de rétrocontrôle négatif.	96
II.4. Les signaux périphériques.	97
II.5. Nutrition, glycémie, acides gras libres et sécrétion de GH.	97
II.5.a. La prise alimentaire.	97
II.5.b. La glycémie et l'insuline.	97
II.5.c. Les acides gras libres (FFA).	98
III. GH et métabolisme.	98
III.1. GH et contrôle central de la balance énergétique.	98
III.2. GH et métabolisme glucidique.	99
III.3. GH et métabolisme lipidique.	100
III.4. GH et métabolisme protéique.	100
IV. La leptine et l'axe somatotrope.	101
IV.1. Leptine et sécrétion de GH.	101
IV.2. Mode d'action de la leptine sur la sécrétion de GH.	103
IV.2.a. Au niveau hypothalamique.	103
IV.2.b. Au niveau hypophysaire.	104
Expression hypophysaire de ObR.	105
Action directe de la leptine sur les cellules somatotropes :	106
IV.2.c. Action paracrine de la leptine hypophysaire sur la sécrétion de GH.	107
V. Ghréline et axe somatotrope.	108
V.1. Découverte de la ghréline.	108
V.2. Ghréline et sécrétion de GH.	109
V.2.a. Action hypothalamique de la ghréline.	110
V.2.b. Action de la ghréline sur les cellules somatotropes.	111
V.3. Ghréline et prise alimentaire.	111
V.3.a. Régulation de la sécrétion de ghréline par la prise alimentaire.	111
V.3.b. Ghréline et neuropeptides orexigènes.	113
V.3.c. Relation entre leptine et ghréline : effets sur la régulation de la balance énergétique.	113
V.4. Effets différentiels de la ghréline sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire.	114
VI. GH et obésité.	115
VI.1. GH, obésité et les sécrétagogues hypothalamiques GHRH et SRIF.	115

VI.2. GH, obésité et ghréline.	117
VI.3. GH, obésité et les FFA.	118
VI.4. GH, obésité, glycémie et insuline.	119
VI.5. GH, obésité et IGF-I.	120
VI.6. GH, obésité et leptine.	120

RESULTATS - DISCUSSION. 122

Etude 1 : Action de la leptine sur les cellules somatotropes des rats obèses DIO.	123
---	-----

I. Résultats. 123

I.1. Caractéristiques des rats DIO.	123
I.2 Expression de ObR au niveau des cellules somatotropes.	125
I.3. Expression de SOCS-3 au niveau des cellules somatotropes.	126
I.4. Effets de la supplémentation en CLA/PUFA sur les caractéristiques des rats DIOs.	127
I.5. Effet de la supplémentation en CLA/PUFA sur l'expression de GH, ObR et SOCS-3.	128
I.6. Expression de ObR dans le cœur et l'hypothalamus des rats DIOs.	129

II. Discussion - conclusion. 130

Etude 2 : Régulation de l'axe GH chez le rat Lou/C.	134
---	-----

I. Résultats. 136

I.1. Caractéristiques des rats Lou/C.	136
I.1.a. Poids des rats, des dépôts adipeux et prise alimentaire.	136
I.1.b. Niveaux plasmatiques de leptine et de ghréline.	137
I.2. Expression des sécrétagogues hypothalamiques GHRH et SRIF et de leurs récepteurs.	137
I.3. Expression des récepteurs de la leptine et de la ghréline.	138
I.3.a. Au niveau hypophysaire.	138
I.3.b. Au niveau des cellules somatotropes.	138
Quantification de fluorescence.	138
« Laser Capture Microdissection » (LCM)	139
I.4. Effets de l'injection de leptine.	140
I.4.a. Sur la concentration plasmatique de GH.	140
I.4.b. Sur l'expression des récepteurs de la leptine et de la ghréline au niveau hypophysaire.	141
I.4.c. Sur l'expression des récepteurs de GHRH et SRIF.	141
I.5. Les rétrocontrôles négatifs de l'axe somatotrope chez les rats Lou/C.	142
I.6. SOCS-3.	143
I.7. Action autocrine/paracrine de la leptine et de la ghréline.	144

II. Discussion. 144

II.1. Le système GHRH / SRIF.	145
II.1.a. Régulation de l'expression du GHRH et de SRIF.	145
II.1.b. Régulation de l'expression hypophysaire des récepteurs de GHRH et SRIF.	146

II.2. Expression des récepteurs de la leptine et de la ghréline.	148
II.2.a. Expression hypophysaire de GHS-R.	148
II.2.b. Expression hypophysaire de ObR.	149
II.3. Les boucles de rétrocontrôles négatifs.	151
II.4 Effets de l'injection de leptine sur l'axe GH des rats Lou/C et Wistar.	152
II.5. Action autocrine/paracrine de la leptine hypophysaire.	154
III. Conclusion.	155
 Etude 3 : Relation entre le processus d'internalisation du récepteur de la leptine ObRb et l'activation des voies de signalisation.	 157
I. Caractérisation de l'internalisation de ObRb.	157
I.1. Choix et caractérisation du modèle cellulaire.	157
I.1.a. Choix du modèle d'étude.	157
I.1.b. Caractérisation fonctionnelle des cellules HEK-ObRb-GFP.	158
I.2. Localisation intracellulaire de ObRb.	159
I.2.a. ObRb est localisé principalement au niveau du Golgi/TGN.	160
I.2.b. Effets de la leptine sur la localisation intracellulaire de ObRb.	160
I.2.c. Effets du sucrose et de la cycloheximide sur la localisation intracellulaire de ObRb.	161
I.3. Caractéristiques de l'internalisation de la leptine et de son récepteur.	162
I.3.a. Cinétique d'internalisation de la leptine.	162
I.3.b. ObRb et les systèmes d'endocytose clathrine / cavéoles.	164
I.3.c. ObRb et recyclage.	164
I.3.d. Internalisation constitutive de ObRb.	164
I.4. Discussion – Perspectives.	165
I.4.a. Cinétique d'internalisation de la leptine et les systèmes d'endocytose clathrine / cavéoles.	165
I.4.b. ObRb et recyclage.	166
I.4.c. Accumulation de ObRb au niveau du Golgi/TGN induite par la leptine.	167
I.4.d. ObRb et internalisation constitutive.	169
II. Internalisation de ObRb et activation des voies de signalisation.	171
II.1. Stratégie d'étude.	171
II.2. Impact de l'inhibition de l'endocytose sur les voies de signalisation.	172
II.3. Discussion – Perspectives.	174
II.3.a. Activation des protéines JAK2 et ObRb-GFP.	175
II.3.b. Activation de la protéine STAT3.	176
II.3.c. Activation des protéines IRS/PI3K.	176
II.3.d. Activation des protéines ERK1/2.	177
II.3.e. Signalisation et voie des cavéoles.	178
II.3.f. Conclusion.	179

PROCEDURES EXPERIMENTALES	180
I. Les modèles expérimentaux	181
I.1. Les animaux.	181
I.1.a. Les rats DIO.	181
I.1.b. Les rats Lou/C.	181
I.2. Les cellules.	181
I.2.a. Lignées cellulaires et conditions de culture.	181
I.2.b. Transfections et établissement des lignées stables.	182
II. Immunohistochimie, immunocytochimie.	183
II.1. Liste des différents anticorps utilisés.	183
II.2. Préparation des échantillons.	183
II.2.a. Tissus congelés.	183
II.2.b. Tissus enrobés en paraffine.	184
II.2.c. Cellules en culture.	184
II.3. Immuno-marquage.	184
II.4. Observation en microscopie à fluorescence.	185
II.5. Quantification de la fluorescence.	185
II.6. Immuno-marquages en microscopie électronique.	185
III. Purification des ARN et PCR quantitative.	186
III.1. Extraction des ARN.	186
III.2. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc).	186
III.3. Choix des amorces.	186
III.4. PCR quantitative en temps réel.	187
III.5. Analyse et normalisation.	188
IV. Analyse de l'expression et de l'activation des protéines tissulaires ou cellulaires.	188
IV.1. Extraction des protéines totales.	188
IV.1.a. Pour les tissus.	188
IV.1.b. Pour les cellules en culture.	188
IV.1.c. Les différents tampons de lyse utilisés.	189
IV.2. Immuno-précipitation (pour cellules en culture).	189
IV.3. Le Western-blot.	189
IV.4. L'ELISA.	190
V. Laser Capture Microdissection (LCM).	191
V.1. Immuno-marquage fluorescent des cellules somatotropes et microdissection.	191
V.2. Extraction des ARN, amplification et PCR quantitative.	191
VI. Mesure de la cinétique d'internalisation de la leptine	192
VI.1. I^{125} binding couplé à la technique de lavages acides.	192
VI.2. Technique de biotinylation des protéines de surface.	192

BIBLIOGRAPHIE

194

ANNEXES

246

Les neuropeptides hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la balance énergétique.	247
I. Les neuropeptides orexigènes de premier ordre.	247
I.1. Le neuropeptide Y (NPY).	247
I.2. Le « Agouti Related Peptide » (AgRP).	247
II. Les neuropeptides orexigènes de second ordre.	248
II.1. Les orexines ou hypocretines.	248
II.2. La « Melanin-Concentrating Hormone » ou MCH.	249
II.3. La Galanine.	250
II.4. Le « Galanine-like Peptide » (GALP) .	251
III. Les neuropeptides anorexigènes de premier ordre.	252
III.1. La « Pro-OpioMelanoCortin » (POMC) et les Mélanocortines.	252
III.2. Les « Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript » (CART).	253
IV. Les neuropeptides anorexigènes de second ordre.	253
IV.1. La « Corticotropin-Releasing Hormone » (CRH) et les Urocortines.	253
IV.2. La « Thyrotropin-Releasing Hormone » (TRH).	254
IV.3. L'ocytocine.	255
IV.4. La neurotensine (NT).	256
IV.5. Les « Glucagon-like peptide » 1 et 2 (GLP1 et GLP2).	256
Publications	258

- Table des figures -

Introduction bibliographique.

CHAPITRE 1 : La leptine et son récepteur.

Figure 1 : Taille et caractéristiques des gènes <i>obese</i> murin et humain.	22
Figure 2 : Structure tridimensionnelle de la leptine E100.	24
Figure 3 : Evolution du taux plasmatique de leptine sur 24h, chez l'homme.	27
Figure 4 : Rythme ultradien de la sécrétion de leptine chez le rat.	28
Figure 5 : Facteurs induisant une augmentation des taux plasmatiques de leptine.	30
Figure 6 : Facteurs induisant une diminution des taux plasmatiques de leptine.	30
Figure 7 : Les différentes isoformes du récepteur de la leptine.	32
Figure 8 : La voie de signalisation STAT.	38
Figure 9 : La voie de signalisation des MAPK.	39
Figure 10 : La voie de signalisation IRS/PI3K.	41
Figure 11 : Les régulateurs négatifs de la signalisation induite par la leptine.	44

CHAPITRE 2 : Internalisation de la leptine et de son récepteur.

Figure 12 : Les différentes voies d'endocytose.	46
Figure 13 : Structure des vésicules à clathrine (CCV).	48
Figure 14 : Structure du complexe AP-2.	49
Figure 15 : Observation d'une vésicule d'endocytose CCV en formation.	49
Figure 16 : La formation des CCP et CCV.	51
Figure 17 : Devenir des CCV et des récepteurs internalisés.	52
Figure 18 : Les protéines Rab impliquées dans l'adressage des vésicules d'endocytose et les échanges de vésicules entre les différents endosomes.	53
Figure 19 : Les cavéoles observées par microscopie électronique.	55
Figure 20 : Protéines impliquées dans les voies de signalisation et localisées au niveau des « sorting endosomes ».	63
Figure 21 : Exemple de signalisation au niveau des endosomes : l'effet du NGF.	65

CHAPITRE 3 : Les fonctions physiologiques de la leptine.

Figure 22 : Les noyaux hypothalamiques.	71
Figure 23 : Le réseau des neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire.	76

CHAPITRE 4 : Leptine, ghréline et fonction somatotrope.

Figure 24 : Anatomie de l'hypophyse.	90
Figure 25 : Anatomie de l'adénohypophyse et de son système circulatoire.	91
Figure 26 : L'organisation 3D en réseau des cellules GH.	92
Figure 27 : Evolution de la sécrétion de GH avec l'âge chez le rat.	93
Figure 28 : Intégration des signaux GHRH et SRIF par les cellules somatotropes.	95
Figure 29 : L'axe somatotrope et ses boucles de rétrocontrôle négatif.	96
Figure 30 : Effets de l'injection ICV de leptine sur la sécrétion de GH.	102
Figure 31 : Effets du GHRH et du SRIF sur la régulation de la sécrétion de GH par la leptine	103
Figure 32 : Expression de ObRa et ObRb dans l'hypophyse.	105

Figure 33 : Action paracrine de la leptine au niveau hypophysaire.	107
Figure 34 : Effets de la ghréline sur la sécrétion de GH.	110
Figure 35 : Profils plasmatiques de leptine, insuline et ghréline sur 24 heures chez l'homme.	112
Figure 36 : Sécrétion de GH en réponse au GHRH chez les patients obèses.	116
Figure 37 : Ghréline et sécrétion de GH chez les patients obèses.	117
Figure 38 : FFA, obésité et sécrétion de GH.	118
Figure 39 : Insuline et sécrétion de GH.	119

Résultats.

Etude 1 : Action de la leptine sur les cellules somatotropes chez le rat obèse DIO.

Figure 40 : Caractéristiques des rats CTR, DIOs et DIOr.	124
Figure 41 : Expression de ObR au niveau de l'hypophyse et des cellules somatotropes.	126
Figure 42 : Expression de SOCS-3 au niveau des cellules somatotropes.	127
Figure 43 : Caractéristiques des rats CTR et DIOs supplémentés en CLA/PUFA.	128
Figure 44 : Effets de la supplémentation en CLA/PUFA sur l'expression de GH, ObR et SOCS-3.	129
Figure 45 : Expression de ObR au niveau du tissu cardiaque et de ObRb, SOCS-3 au niveau central.	130

Etude 2 : Régulation de l'axe GH chez le rat Lou/C.

Figure 46 : Evolution de la sécrétion de GH en fonction de l'âge chez les rats Lou/C.	135
Figure 47 : Caractéristiques des rats Lou/C.	136
Figure 48 : Taux plasmatiques de leptine et ghréline chez les rats Lou/C et Wistar.	137
Figure 49 : Le système des sécrétagogues GHRH et SRIF chez les rats Lou/C.	138
Figure 50 : Expression hypophysaire des récepteurs de la leptine et de la ghréline chez les rats Lou/C.	139
Figure 51 : Expression du récepteur de la leptine au niveau des cellules somatotropes des rats Lou/C et Wistar.	139
Figure 52 : Expression des récepteurs de la leptine et de la ghréline au niveau des cellules somatotropes isolées par LCM.	140
Figure 53 : Effets de l'injection de leptine sur la concentration plasmatique de GH et l'expression hypophysaire des récepteurs de la leptine et de la ghréline.	141
Figure 54 : Effets de l'injection de leptine sur l'expression hypophysaire des récepteurs de GHRH et SRIF.	142
Figure 55 : Effets de l'injection de leptine sur l'expression hypophysaire des récepteurs de la GH et d'IGF-1.	142
Figure 56 : Expression de SOCS-3 chez les rats Lou/C.	143
Figure 57 : Expression hypophysaire de la leptine et de la ghréline.	144

Etude 3 : Relation entre le processus d'internalisation du récepteur de la leptine ObRb et l'activation des voies de signalisation.

Figure 58 : Caractérisation des cellules HEK-ObRb-GFP.	158
Figure 59 : Localisation de ObRb dans les cellules HEK-ObRb-GFP.	159
Figure 60 : Localisation de ObRb au niveau du Golgi /TGN.	160
Figure 61 : Effets de la leptine sur la localisation intracellulaire de ObRb-GFP.	161

Figure 62 : Effets de la cycloheximide et du sucrose sur la localisation intracellulaire de ObRb.	162
Figure 63 : Cinétique d'internalisation de la leptine.	163
Figure 64 : Endocytose de ObRb <i>via</i> la voie dépendante de la clathrine et la voie des cavéoles.	163
Figure 65 : ObRb et recyclage.	164
Figure 66 : Internalisation constitutive et « down-regulation » de ObRb.	165
Figure 67 : Effets de la Dyn K44A sur la cinétique d'internalisation de la leptine.	172
Figure 68 : Effets de la Dyn K44A sur l'activation de ObRb-GFP et STAT3.	173
Figure 69 : Effets de la Dyn K44A sur les voies de signalisation IRS/PI3K et MAPK.	174

Procédures expérimentales.

Figure 70 : Validation du kit Elisa ObR	190
---	-----

LISTE DES ABREVIATIONS

aa	Acide Aminé
ACTH	Hormone adrénocorticotropine
ADH	Vasopressine ou hormone antidiurétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AgRP	Agouti Related Peptide
AMP	Adenosine monophosphate
AMPK	5'-AMP-Activated Protein Kinase
αMSH	α -Melanocyte-Stimulating Hormone
AP-2	Adaptor Protein-2
ARC	Noyau arqué de l'hypothalamus
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CART	Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript
CCP	Clathrin-Coated Pits
CCV	Clathrin-Coated Vesicles
CHO	Chinese Hamster Ovary
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
db/db	Souris <i>diabetes</i>
DIO	Diet Induced Obesity
Dyn	Dynamine
ERK	Extracellular signal Regulated Kinase
FFA	Acide gras libre
FSH	Hormone folliculo-stimulante
GALP	Galanine-like peptide
GH	Hormone de croissance
GH-R	Récepteur de la GH
GHRH	GH-releasing factor
GHRH-R	Récepteur du GHRH
GHS	Sécrétagogue de la GH
GHS-R	Récepteur de la ghréline et des GHS
GLUT	Transporteur de glucose
GRB-2	Growth factor receptor binding protein
HEK	Human Embryonic Kidney
HPRT	Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase
ICV	Intra-Cérébro-Ventriculaire
IGF-I	Insulin-like growth factor-I
IL-6	Interleukine-6
IRS	Insulin Receptor Substrate
JAK	Janus Kinase
kDa	Kilo Dalton
KO	Knock-Out
LBD	Ligand Binding Domain
LCM	Laser Capture Microdissection
LDL	Low Density Lipoprotein

LH	Hormone lutéinisante
LHA	Aire hypothalamique latérale
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MC4-R	Récepteur de la α MSH
MCH	Melanin-Concentrating Hormone
MEK	Mitogen-activated Kinase
MSH	Melanocyte-Stimulating Hormone
MVB	Multivesicular body
NEFA	Acide gras non estérifié
NO	Oxide nitrique
NOS	NO Synthase
NPY	Neuropeptide Y
Ob	Leptine
ob/ob	Souris <i>obese</i>
ObR	Récepteur de la leptine
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDE3B	Phosphodiesterase 3B
PK1	Phosphoinositide-Dependent Kinase 1
PFA	Aire périfornicale de l'hypothalamus
PFA	Paraformaldéhyde
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PIP3	Phosphoinositol-(3,4,5)-triphosphate
PKC	Protéine Kinase C
POMC	Pro-opiomelanocortine
PRL	Prolactine
PTP1B	Protéine Tyrosine Phosphate 1B
PVN	Noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
PYY	Peptide YY
RCPG	Récepteur Couplé aux Protéines G
RNAi	Interférence ARN
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SH2	Src Homology 2
SHP-2	SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase
SNC	Système Nerveux Central
SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
SOS	Son Of Sevenless
SREBP-1c	Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c
SRIF	Somatotropin-Releasing Inhibiting Factor ou Somatostatine
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
stt-R	Récepteur du SRIF
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TRH	Thyrotropin-Releasing Hormone
TSH	Hormone Thyroïdienne
UCN	Urocortine
UCP	Uncoupling protein
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VMH	Noyau Hypothalamique Ventro-Médian

Introduction Bibliographique

CHAPITRE 1 : La leptine et son récepteur.

I. La leptine.

I.1. La découverte de la leptine.

Dans sa façon de se nourrir au quotidien, l'individu alterne entre phase d'alimentation et phase de jeûne. D'un jour à l'autre, la quantité d'aliments ingérés ainsi que leurs compositions peuvent varier considérablement, sans que la dépense énergétique quotidienne n'évolue en conséquence. Cependant le poids d'un individu reste, d'une manière générale, relativement constant au cours de sa vie d'adulte. Ainsi, le poids d'une femme augmente en moyenne de onze kilogrammes entre l'âge de 25 ans et 65 ans, pour une prise alimentaire totale sur cette période d'environ vingt tonnes (Hervey GR 1969). Il existe donc une régulation fine de la balance énergétique définie par l'équilibre entre prise alimentaire et dépense énergétique (activité physique, métabolisme basal et thermogénèse adaptative). La régulation de cette balance par un système endocrine intégrant les réserves énergétiques est maintenant étudiée depuis plus d'un demi-siècle.

Hetherington et Ranson en 1942, puis Anand et Brobeck en 1951 montrent que, chez le rat, des lésions au niveau de l'hypothalamus induisent un déséquilibre de la balance énergétique. La lésion de l'hypothalamus ventromédian induit une hyperphagie conduisant à une obésité morbide, ainsi qu'une altération de la thermorégulation. La lésion de l'hypothalamus latéral induit une forte réduction de la prise alimentaire conduisant à la mort par « famine » (Hetherington A et Ranson S 1942; Anand B et Brobeck J 1951). Ces expériences sont les premières démonstrations de l'importance de l'hypothalamus en tant que centre de contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique.

Kennedy en développant sa théorie lipostatique est le premier en 1953 à expliquer la constance du poids d'un individu au cours de sa vie par la régulation de la masse adipeuse de l'organisme (Kennedy G 1953). En se basant sur les expériences de lésions hypothalamiques réalisées au cours des années 1940-50, il émet l'hypothèse d'une relation entre la masse adipeuse et le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire. L'hypothalamus collecterait des informations relatives à la quantité de masse adipeuse de l'organisme par l'intermédiaire d'un facteur circulant, et régulerait en retour prise alimentaire et dépense énergétique de manière adéquate.

Suite à ces travaux, Hervey réalise en 1959 l'expérience qui allait marquer l'histoire de l'étude de la prise alimentaire. Grâce au processus chirurgical de parabiose, permettant

l'union chronique de deux rats vivants en suturant ensemble leur péritoine et leurs muscles (Huff R 1950), il réunit la circulation sanguine d'un rat rendu obèse par lésion hypothalamique et d'un rat contrôle (Hervey G 1959). Suite à cette union, le comportement du rat obèse n'est pas modifié tandis que le rat contrôle cesse de s'alimenter. Hervey suggère alors l'existence d'un facteur de satiété circulant dont la concentration chez le rat obèse devait être augmentée par rapport au rat contrôle. L'absence d'effet observée chez le rat ayant subi une lésion hypothalamique suggère également la présence du récepteur de ce facteur de satiété circulant au niveau de l'hypothalamus. Cette simple expérience a permis de mettre en place les préceptes de la leptine, dont l'étude, quarante-cinq ans plus tard, est toujours d'actualité.

Les conclusions de Hervey sont ensuite soutenues par la découverte de souris génétiquement obèses, la souris « obese » (*ob/ob*) et la souris « diabetes » (*db/db*), caractérisées par une hyperphagie, une dépense énergétique réduite et un syndrome d'obésité morbide. Coleman réalise des expériences de parabiose avec ces deux modèles murins (Coleman D 1973). La parabiose entre souris contrôle et *ob/ob* provoque une réduction de la masse adipeuse de la souris *ob/ob* et n'a pas d'effet sur la souris contrôle. La parabiose entre souris contrôle et *db/db* n'a pas d'effet sur la souris *db/db*, mais induit cependant une forte réduction de la prise alimentaire chez la souris contrôle (hypophagie), conduisant à sa mort. La parabiose entre les souris *ob/ob* et *db/db* n'induit aucun changement chez la souris *db/db* ; néanmoins la souris *ob/ob* devient hypophagique et meurt. Logiquement, Coleman interprète ses résultats de la manière suivante : les souris *ob/ob* ne produisent pas le (ou un) facteur de satiété, tandis que les souris *db/db* le produisent mais y sont insensibles. Il sera démontré plus tard que le gène *obese* code pour la leptine (Ob) et le gène *diabetes* pour son récepteur (ObR).

I.2. Le clonage du gène *obese*.

La découverte de la séquence des gènes *obese* murin et humain, a été réalisée par l'équipe de Friedman (Zhang Y *et al.* 1994), en utilisant la technique du clonage de position (Genbank :[U18812](#), [U18915](#)). Ils retrouvent ainsi une mutation du gène *obese* chez les souris *ob/ob*. La même équipe montre que la protéine Ob est présente dans le plasma et que l'injection de celle-ci chez la souris produit une réduction de la prise alimentaire et de la masse adipeuse (Zhang Y *et al.* 1994). Le facteur de satiété découvert par Coleman vingt ans plus tôt était identifié, et l'équipe de Friedman baptise le produit du gène *obese* leptine, du grec *leptos* signifiant fin ou maigre (Halaas JL *et al.* 1995).

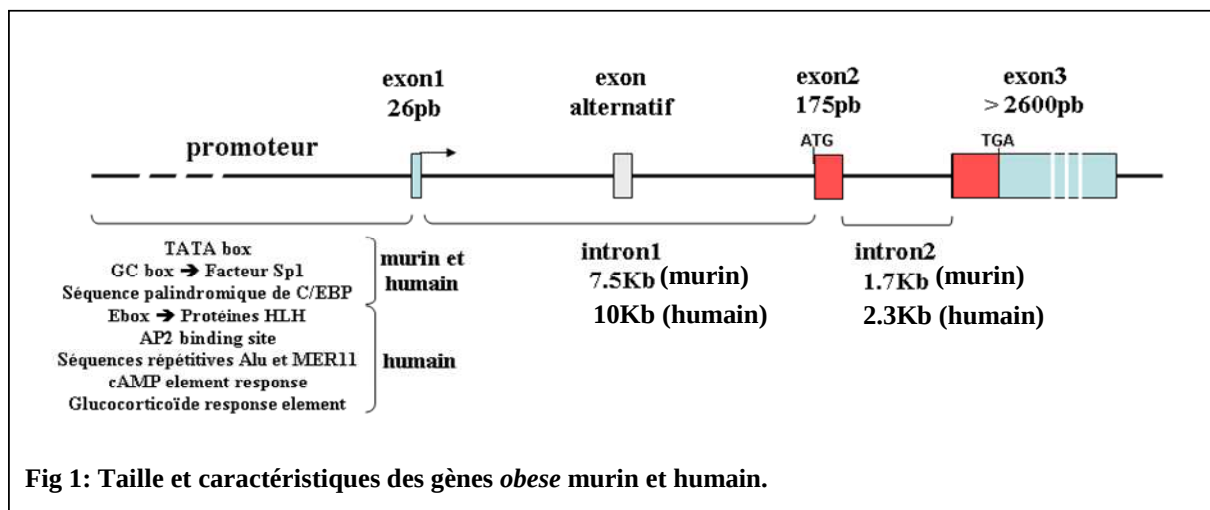
I.3. Les caractéristiques du gène *obese*.

I.3.a. Caractéristiques de la séquence codante.

Le gène *obese* est composé de 3 exons séparés par 2 introns. La séquence codante de la protéine leptine est localisée au niveau des exons 2 et 3 et code pour un ARNm de 4,5 kb environ chez le rat.

Chez la souris, la taille totale du gène *obese* est de 20 kb. La taille de l'exon 1 est de 26 pb, celle de l'exon 2 (qui possède l'ATG) est de 175 pb et celle de l'exon 3 (qui possède le TGA) est de 2600 pb au minimum. Les introns 1 et 2 mesurent 7,5 et 1,7 kb respectivement (Figure 1) (He Y *et al.* 1995). Il existerait également un autre exon apparemment non traduit localisé entre les exons 1 et 2 et mesurant 93 pb. Cet exon est présent dans un transcript ARN résultant d'un épissage alternatif, retrouvé *in vivo*, chez la souris, au niveau du tissu adipeux. Il représente environ 5 % des transcripts totaux du gène *obese* et sa fonction est encore inconnue (He Y *et al.* 1995).

Chez l'homme, le gène *obese* mesure environ 20 kb. La taille des différents exons chez l'homme et la souris est comparable. Les introns 1 et 2 sont cependant plus grands avec 10 kb et 2,3 kb respectivement (Figure 1) (Isse N *et al.* 1995).



I.3.b. Caractéristiques du promoteur et de la région 3'.

La taille exacte du promoteur murin est inconnue, néanmoins un promoteur de 750 pb est considéré comme suffisant pour induire efficacement la transcription, la région située entre les nucléotides 0 et -161 étant primordiale. A partir de la séquence nucléotidique, différentes équipes ont recherché les séquences consensus *cis* pouvant interagir avec divers facteurs de transcription. Le promoteur du gène *obese* murin contient une TATA box (-29 à -

34), ainsi qu'une ou plusieurs séquences Sp1 (GC box) suggérant une régulation de la synthèse de leptine par les facteurs de transcription à doigts de Zinc Sp1 (Lania L *et al.* 1997). Une courte séquence palindromique caractéristique des « CCAAT/enhancer-binding protein » (C/EBP) est retrouvée entre les nucléotides -49 et -58, conférant aux facteurs de transcription adipocytaires C/EBP α un rôle dans la régulation de la production de leptine (Hwang C-S *et al.* 1996).

Ces mêmes éléments *cis* sont retrouvés dans le promoteur humain (Isse N *et al.* 1995; Gong D-W *et al.* 1996; Miller SG *et al.* 1996), et s'y ajoutent une « Ebox » permettant l'interaction des protéines possédant un domaine HLH (Murre C *et al.* 1989), un « AP-2-binding site » permettant le recrutement du facteur de transcription AP-2 (Mitchell PJ *et al.* 1987), des séquences répétitives MER11 et Alu dont la fonction est encore mal définie, des séquences « cyclic AMP element response » et des séquences « glucocorticoid response element » (GRE).

La région 3' du gène *obese* est peu conservée entre souris et humain, avec seulement 50% d'homologie de séquence (Wickens M 1990; Isse N *et al.* 1995). Cette divergence pourrait être expliquée ou être la cause d'une différence de stabilité entre les ARNm codant pour la leptine de ces deux espèces.

I.3.c. De la séquence génique et protéique à la fonction.

Suite à l'obtention de la séquence nucléotidique du gène *obese*, son analyse en fonction de critères de similitude ou d'homologie a permis l'identification d'une séquence caractéristique d'une protéine extracellulaire sécrétée (Zhang Y *et al.* 1994). L'équipe de Bryant a établi, à partir de la séquence peptidique, les différentes structures 3D potentielles de la leptine, et recherché des similitudes dans des banques de données adaptées. Ils ont alors suggéré que le produit du gène *obese* code pour une protéine pouvant adopter une structure similaire aux cytokines hélicoïdales de type InterLeukine-6 (IL-6) (Madej T *et al.* 1995).

La leptine est une protéine de 16KDa. 67% de sa séquence peptidique est conservée entre les différentes espèces étudiées à ce jour. Il existe un fort taux d'homologie entre la leptine de rat et de souris et entre la leptine de souris et humaine avec respectivement 83 et 84% d'homologie (Zhang F *et al.* 1997).

L'étude structurale de la leptine a été difficile, dû principalement au fait que la leptine s'agrège facilement, empêchant ainsi le processus de cristallisation. L'équipe de Schevitz en 1997 a contourné ce problème en utilisant une leptine mutante (E100) dans laquelle le tryptophane en position 100 est remplacé par une glutamine. Cette mutation n'induit pas de

modification de l'activité biologique de la leptine mais permet sa cristallisation et la détermination précise de sa structure 3D (Figure 2) (Zhang F *et al.* 1997). La structure de la leptine est caractérisée par quatre hélices alpha anti-parallèles (A à D) connectées par deux longues boucles (AB et CD) et une plus courte (BC). Les résidus les plus conservés, certainement importants pour maintenir l'intégrité structurale de la leptine ainsi que la fonction biologique sont situés dans un cœur hydrophobe. D'autres régions fortement conservées sont situées au niveau des quatre hélices alpha ; deux cystéines conservées en position 96 et 146 forment un pont disulfure entre la région carboxy-terminale et la longue boucle CD. La mutation d'une de ces cystéines rend la protéine biologiquement inactive ce qui rend compte de leur importance. L'agencement des hélices alpha et des boucles de la leptine E100 est similaire à celui de cytokines, comme le « Granulocyte Colony-Stimulating Factor » (G-CSF), le « Leukaemia Inhibitory Factor » (LIF), le « Ciliary Neurotrophic Factor » (CNTF) et l'hormone de croissance (GH). La superposition de la structure 3D de la leptine avec celle de ces protéines est possible (Zhang F *et al.* 1997).

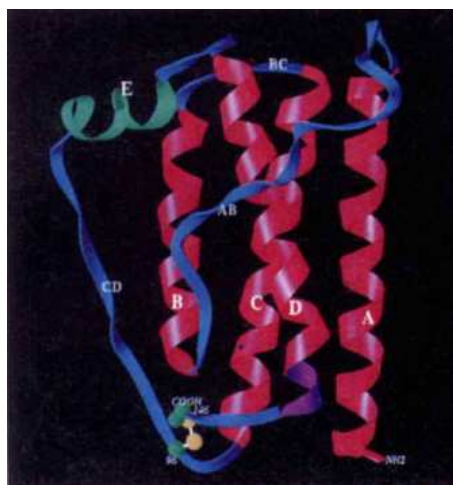


Fig 2: Structure tridimensionnelle de la leptine E100.

La structure 3D de la leptine E100 est caractérisée par quatre hélices alpha anti-parallèles (A, B, C, D) connectées par 3 boucles (AB, BC, CD). Elle est comparable à celle des cytokines G-CSF, CNTF, GH et LIF. La région localisée entre les aa 106 et 140 est responsable de l'activité biologique de la leptine. D'après Zhang F *et al.* 1997.

En injectant chez les souris *ob/ob* différents peptides de synthèse recouvrant les acides aminés (aa) 106 à 167, l'équipe de Lee DW a mis en évidence que la région localisée entre les résidus 106 et 140 est la principale responsable de l'activité biologique de la leptine (Grasso P *et al.* 1997).

- La leptine -

- L'existence de la leptine (Ob) a été suggérée dès les années 1950, mais le clonage de son gène (*obese*) ne fût réalisé qu'en 1994 par l'équipe de J.Friedman.

- Le gène *obese* est composé de 3 exons séparés par 2 introns. Sa région promotrice possède notamment la séquence consensus des facteurs de transcription adipocytaires C/EBP α .

- Ob est une protéine de 16 KDa appartenant à la famille des cytokines hélicoïdales de type IL-6. Elle partage une forte homologie de structure avec le G-CSF et la GH notamment.

II. Régulation de la synthèse de leptine.

Initialement les adipocytes du tissu adipeux blanc étaient considérés comme les seules cellules productrices de leptine. Cependant, une synthèse ectopique de leptine a été mise en évidence dans de nombreux tissus et notamment le muscle, le foie et l'hypophyse (Jin L *et al.* 1999; Morash B *et al.* 1999; Jin L *et al.* 2000). Nous aborderons plus précisément ce point dans le chapitre consacré à l'hormone de croissance (Chapitre IV). L'importance relative de la synthèse ectopique de leptine dans la concentration plasmatique de cette hormone reste sujette à controverses, et à ce jour les adipocytes sont toujours considérés comme la source principale de leptine. La régulation de la synthèse de leptine est bien entendu différente selon les tissus considérés. Elle est de plus soumise à un grand nombre de facteurs de régulation.

II.1. Niveaux plasmatiques de leptine et nutrition.

La leptine est une hormone circulant dans le plasma à une concentration dépendante du statut énergétique et du niveau de masse adipeuse de l'organisme. Dans les modèles murins ou chez l'homme, l'obésité est associée à une élévation du taux plasmatique de leptine tandis que les états lipodystrophiques sont associés à une réduction de ce taux (M. Maffei M *et al.* 1995).

Suite à la prise d'un repas unique, le niveau plasmatique de leptine augmente chez les rongeurs, tandis qu'il semble inchangé chez l'homme (Saladin R *et al.* 1995; Korbonits M *et al.* 1997). Chez l'homme, ce niveau augmente sous l'effet d'un régime hypercalorique de plusieurs jours. Cependant un jeûne (24-48h) induit une forte baisse de la concentration plasmatique de leptine chez les rongeurs et l'homme. Après une période de jeûne, la prise

d'un repas individuel induit une augmentation de la leptine plasmatique jusqu'au rétablissement de son taux initial. La sécrétion de leptine est également corrélée à la composition et à l'apport calorique des repas (Poppitt SD *et al.* 2005).

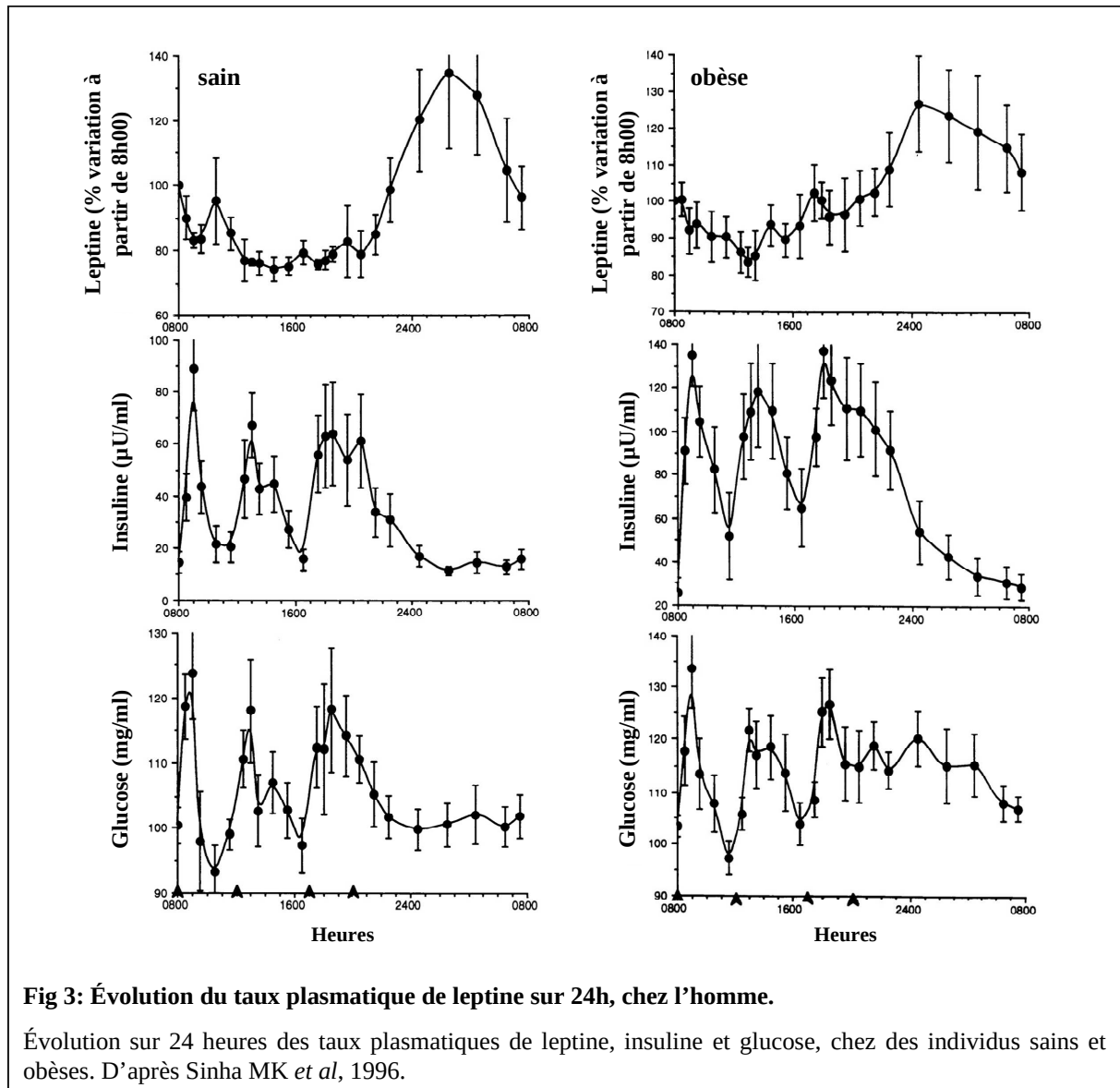
II.2. Sécrétion de leptine et rythmes biologiques.

II.2.a. Rythme circadien.

L'expression et la sécrétion de leptine sont caractérisées par un rythme diurne chez les rongeurs et chez l'homme (Saladin R *et al.* 1995; Sinha MK *et al.* 1996).

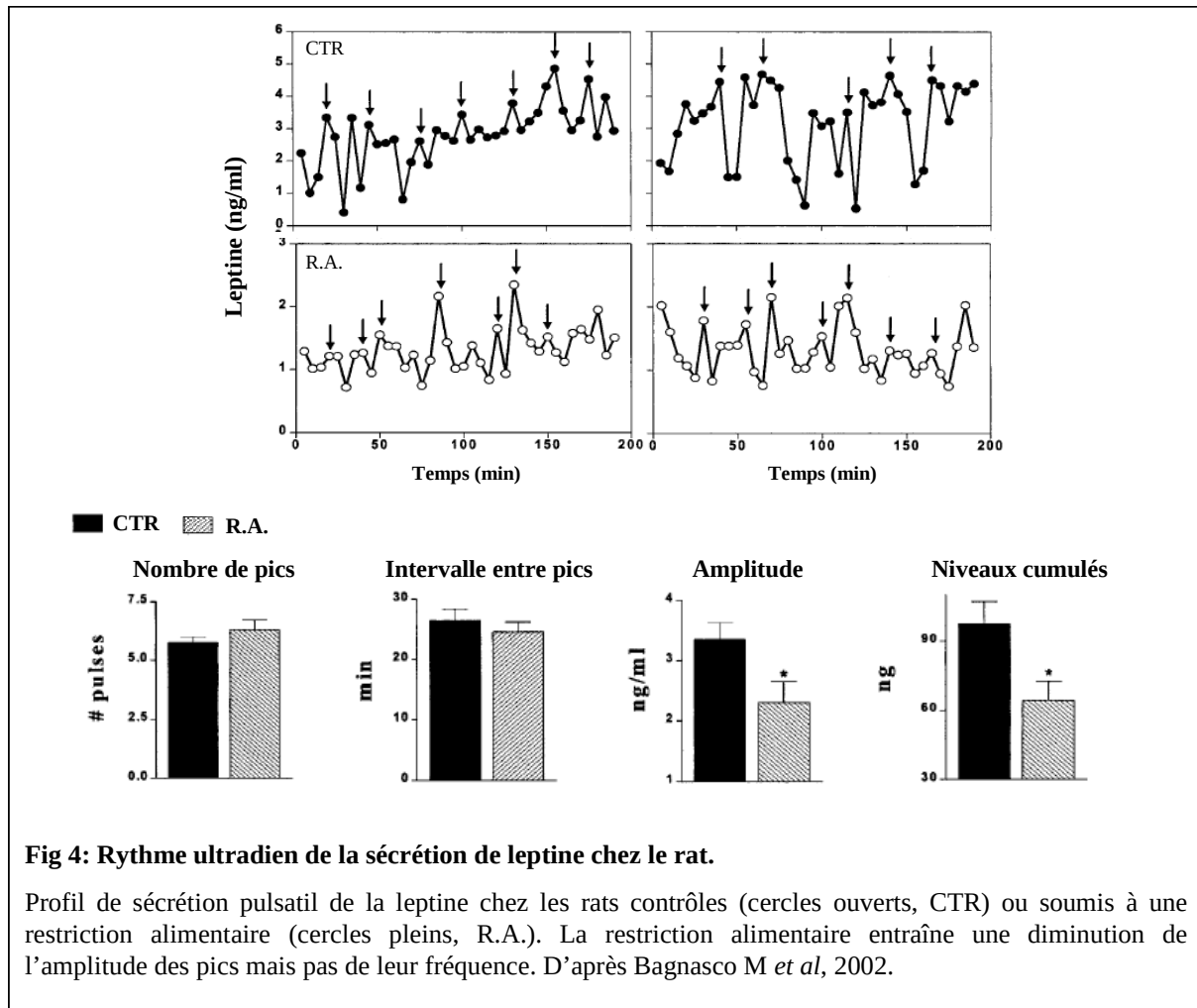
Chez les rongeurs, le taux plasmatique de leptine est plus élevé durant la phase sombre que durant la phase lumineuse du cycle nycthéral. Lorsque le rat est soumis à un cycle lumière/obscurité de 5h-19h/19h-5h, la concentration plasmatique de leptine augmente à partir de 19h pour atteindre son maximum à 23h (environ 9ng/mL) et diminue ensuite jusqu'à rejoindre son niveau basal à 5h (environ 6ng/mL) (Xu B *et al.* 1999). La phase d'obscurité correspondant chez les rongeurs à la période d'activité, l'augmentation de leptine plasmatique est en corrélation avec le début de la prise alimentaire, et semble indépendante de la photopériodicité et des autres mécanismes classiques du contrôle du rythme circadien. Chez le rat, la synthèse de leptine par les cellules adipocytaires et l'expression hypothalamique de son récepteur augmentent quant à elles avant le début de la phase sombre. Elles sont donc indépendantes de l'initiation de la prise alimentaire. Ces résultats suggèrent que la sécrétion de leptine et sa synthèse sont régulées en partie par des mécanismes indépendants (Kalra SP *et al.* 2003).

Chez l'homme, on retrouve également des variations de la concentration plasmatique de leptine corrélées avec le cycle circadien (Figure 3). Celle-ci augmente durant la phase sombre qui, contrairement aux rongeurs, correspond à la phase de sommeil. Bien qu'une simple prise alimentaire ne semble pas changer le taux de leptine circulante, l'augmentation nocturne de cette hormone est corrélée avec la rythmicité et l'heure de la prise alimentaire précédente (Schoeller DA *et al.* 1997). Le rôle de cette rythmicité biologique dans le contrôle central de la prise alimentaire est pour l'instant mal défini. Elle pourrait intervenir dans la régulation au niveau périphérique d'autres acteurs moléculaires impliqués dans les diverses fonctions de la leptine (Kalra SP *et al.* 2003). Ce rythme n'est pas affecté par l'obésité (Sinha MK *et al.* 1996)



II.2.b. Rythme ultradien

Chez l'homme et les rongeurs, la sécrétion de leptine par les adipocytes n'est pas continue mais pulsatile, caractérisée par des pics de sécrétion de faible amplitude mais de fréquence élevée (Figure 4) (Licinio J *et al*. 1997; Bagnasco M *et al*. 2002). Chez le rat, la restriction alimentaire entraîne une diminution de l'amplitude des pics, sans modification de leur fréquence (Bagnasco M *et al*. 2002).



II.3. Facteurs régulant la sécrétion de leptine.

II.3.a. Effets de l'insuline et du glucose.

La régulation de la sécrétion de leptine en fonction de la nutrition est liée en partie à l'insuline et au glucose. En réponse à une prise alimentaire, le taux d'insuline dans le sang augmente pour favoriser l'absorption par les tissus du glucose « ingéré », et ainsi compenser son augmentation plasmatique et restaurer une glycémie normale. Chez l'homme, dans des conditions standards, les taux plasmatiques de leptine ne sont pas corrélés à la variation des taux d'insuline suite à une prise alimentaire (Figure 3) (Ahima RS et Flier JS 2000). Par opposition, les taux d'insuline et de leptine diminuent en période jeûne, chez l'homme (Ahima RS et Flier JS 2000). Des études réalisées *in vitro* montrent que l'insuline stimule la synthèse et la sécrétion de leptine dans une lignée cellulaire d'adipocytes de souris ainsi que dans les cultures primaires d'adipocytes humains isolés (Kolaczynski JW *et al.* 1996; Rentsch J et Chiesi M 1996). *In vivo*, l'injection d'insuline chez les rongeurs entraîne également une augmentation de la concentration plasmatique de leptine ; c'est également le cas chez

l'homme soumis à une perfusion chronique d'insuline (Saladin R *et al.* 1995; Kolaczynski JW *et al.* 1996).

II.3.b. Autres facteurs.

Il existe de nombreux facteurs régulant la sécrétion de leptine et il est très difficile de les classer en fonction de leur importance, car celle-ci dépend de l'état physiologique de l'organisme ainsi que des fonctions biologiques étudiées. De nombreuses revues les répertorient et nous n'en donnerons ici qu'une liste non exhaustive (Figures 5 et 6). De plus, il ne faut pas oublier que si la leptine est synthétisée principalement par les adipocytes, il existe une synthèse ectopique de cette hormone dans de nombreux tissus, dont la régulation est certainement tissus dépendants.

- La sécrétion de leptine -

- La leptine est principalement produite et sécrétée par les adipocytes du tissu adipeux blanc. D'autres tissus comme l'hypophyse, le muscle et le foie sont également des lieux de synthèse de cette hormone.**
- La concentration plasmatique de leptine est proportionnelle au niveau de masse adipeuse de l'organisme et donc fortement dépendante du statut énergétique.**
- La concentration plasmatique de leptine augmente suite à une prise alimentaire unique chez les rongeurs et suite à un régime hypercalorique de plusieurs jours chez l'homme. Elle diminue fortement suite à une restriction alimentaire (24-48h) chez les rongeurs et l'homme.**
- La sécrétion de leptine est caractérisée par un rythme circadien diurne chez les rongeurs et chez l'homme. Elle est plus importante durant la phase d'obscurité (ou phase sombre) du cycle nycthémeral.**
- La sécrétion de leptine n'est pas continue mais pulsatile, caractérisée par des pics de sécrétion de faible amplitude mais de fréquence élevée (rythme ultradien).**
- Les taux d'insuline et de leptine sont étroitement corrélés. L'insuline stimule la synthèse et la sécrétion de leptine chez les rongeurs et chez l'homme.**

Factor	Models	References
Obesity	Rodents Humans	Frederich et al, ^{55,315} Maffei et al ²⁹ Considine et al, ³⁰ Maffei et al ²⁹
Overfeeding	Rodents Humans	Trayhurn et al, ⁷⁷ Hardie et al ⁷⁰ Kolaczynski et al ²¹⁵
Impaired renal function	Humans	Iida et al, ³¹⁶ Merabet et al ³¹⁷
Insulin	Adipocyte Rat islets Humans ob/ob mice	Saladin et al, ²⁰⁹ Leroy et al ³¹⁸ Ceddia et al ²³¹ Utriainen et al, ²⁰⁸ Saad et al, ²⁰⁷ Mantzoros et al ²⁴² Stephens et al ¹⁰⁵
Glucose	Mice	Kamohara et al ²⁴⁸
Glucocorticoides	Adipocyte Rats Humans	Leroy et al, ³¹⁸ Slieker et al ²⁷⁶ Saladin et al ²⁰⁹ Miell et al, ²⁸¹ Kolaczynski et al, ³¹⁹ Papasprou-Rao et al ³²⁰
TNF- α	Humans Adipocytes	Mantzoros et al ³⁰⁶ Zhang et al ³²¹
Oestrogen	Adipocytes Humans Rats Pigs	Machinal et al ³⁷ Shimizu et al ¹⁸² Shimizu et al ¹⁸² Qian et al ³²²
Endotoxin	Hamsters	Grunfeld et al ³⁰⁷
Interleukin-1	Humans Hamsters	Janik et al ³⁰³ Grunfeld et al ³⁰⁷
Alcohol	Humans	Mantzoros et al ²⁴²

Fig 5: Facteurs induisant une augmentation des taux plasmatiques de leptine. D'après Margetic S *et al*, 2002

Factor	Models	References
Androgens	Adipocytes	Wabitsch et al, ³⁰⁰ Machinal et al ³⁷
Fasting	Humans	Trayhurn et al, ⁷⁷ Hardie et al ⁷⁰
β_3 -Adrenoceptor agonists	Humans Rodents Adipocytes	Donahoo et al ⁸⁸ Ghorbani and Himms-Hagen, ³²³ Li et al, ⁸⁷ Trayhurn et al, ⁷³ Mantzoros et al ⁸⁶ Gettys et al, ³²⁴ Slieker et al ²⁷⁶
Growth hormone	Zucker rats Rats Children	Isozaki et al ²⁹⁸ Carro et al ^{289,290} Rauch et al ²⁹⁷
Cold exposure	Humans Rats Human adipocytes	Trayhurn et al ²⁸ Hardie et al ⁷⁰ Peino et al ⁷²
Exercise — long term	Rats Humans — women	Zheng et al ⁶² Kohrt et al ⁶³
Somatostatin	Humans Rats	Donahoo et al ⁸⁸ Carro et al ²⁹⁰
Cyclic AMP	Adipocytes	Saladin et al, ²⁰⁹ Slieker et al ²⁷⁶
Thiazolidinediones	Adipocytes	De Vos et al, ⁹⁶ Kallen and Lazar ⁹⁷
Cigarette smoking	Humans	Hodge et al, ³²⁵ Wei et al, ³²⁶ Mantzoros et al, ²⁴² Miyata and Meguid ³²⁷
IGF-1	Rats	Boni-Schnetzler et al ³⁰²
Free fatty acids	Adipocytes	Deng et al ²²

Fig 6: Facteurs induisant une diminution des taux plasmatiques de leptine. D'après Margetic S *et al*, 2002

III. Le récepteur de la leptine.

III.1. La découverte du récepteur de la leptine.

L'équipe de Tepper a été la première à isoler et cloner le récepteur de la leptine (ObR) en suivant une démarche scientifique particulièrement intéressante (Tartaglia LA *et al.* 1995). Ils ont utilisé une banque d'ADN complémentaire (ADNc) construite à partir d'ARNm isolés du plexus choroïde de souris, tissu identifié à l'aide de leptine couplée à la phosphatase alcaline comme exprimant fortement le récepteur de la leptine. Après transfection de combinaisons de plusieurs ADNc de plus en plus restreintes dans des cellules en culture et en utilisant la leptine marquée à la phosphatase alcaline pour identifier les clones positifs, ils ont finalement isolé un ADNc codant pour une protéine de 894aa.

Le domaine extracellulaire du récepteur cloné par Tartaglia possède de nombreuses similitudes avec les récepteurs de la superfamille des cytokines classe I. Bien que le taux d'homologie de séquence entre ce domaine et celui des autres récepteurs de cytokines ne soit que de 24% environ, ObR possède le motif Trp-Ser-X-Trp-Ser caractéristique de cette famille de récepteur (Kishimoto T *et al.* 1994). Tout comme les récepteurs de cytokines, ObR présente un domaine membranaire unique composé de vingt-trois résidus. Le domaine intracellulaire de l'ObR isolé par Tartaglia, est étonnamment court par rapport à celui des autres membres de la famille des cytokines de classe I (34 résidus), mais présente néanmoins 47% d'homologie avec le récepteur du LIF (LIF-R). Il possède également un site de fixation de la protéine Janus kinase (JAK) appelé boîte 1, impliqué dans l'activation du récepteur et l'initiation des voies de transduction du signal.

En établissant une carte de la région génétique du gène cloné, Tartaglia *et al* (1995) ont mis en évidence une localisation proche du locus du gène *diabetes* codant pour le récepteur de la leptine. Cependant chez les souris *db/db*, la fixation de la leptine au niveau du plexus choroïde est identique à celle des souris contrôles. Et surtout, aucune mutation dans la séquence de ce récepteur isolé et cloné par Tartaglia n'a été retrouvée chez les souris *db/db*. De ces observations émergea l'hypothèse de l'existence de plusieurs isoformes de ObR. Au moins six isoformes sont dénombrées à l'heure actuelle et sont nommées de ObRa à ObRf. Elles sont générées par épissage alternatif à partir du même ARNm pré-messager. Le récepteur cloné par Tartaglia *et al.* correspond à une isoforme courte de ObR, ObRa.

III.2. Les différentes isoformes du récepteur de la leptine.

Le récepteur de la leptine appartient à la famille des récepteurs de cytokines de classe I contenant notamment les récepteurs aux interleukines 2, 3, 4, 6, 7, au G-CSF, à la GH, à la prolactine et l'érythropoïétine (Bazan JF 1989). Le gène *diabetes* codant pour ObR possède dix-sept exons communs à toutes les isoformes et plusieurs exons alternatifs. Toutes les isoformes d'ObR générées par épissage alternatif partagent le même domaine extracellulaire amino-terminal de 816aa possédant le site de liaison du ligand, un domaine fibronectine de type III, un pont disulfure indispensable à l'interaction avec la leptine ainsi que le motif Trp-Ser-X-Trp-Ser caractéristique de la famille de récepteur de cytokines de classe I (Kishimoto T *et al.* 1994; Ahima RS et Flier JS 2000).

Les isoformes diffèrent au niveau des domaines membranaire ou intracellulaire carboxy-terminal et sont classées en trois catégories distinctes : l'isoforme longue ou ObRb, les isoformes courtes ou ObRs (a, c, d, f) possédant un domaine intracellulaire réduit et l'isoforme circulante ou ObRe ne possédant ni domaine membranaire ni domaine intracellulaire (Figure 7).

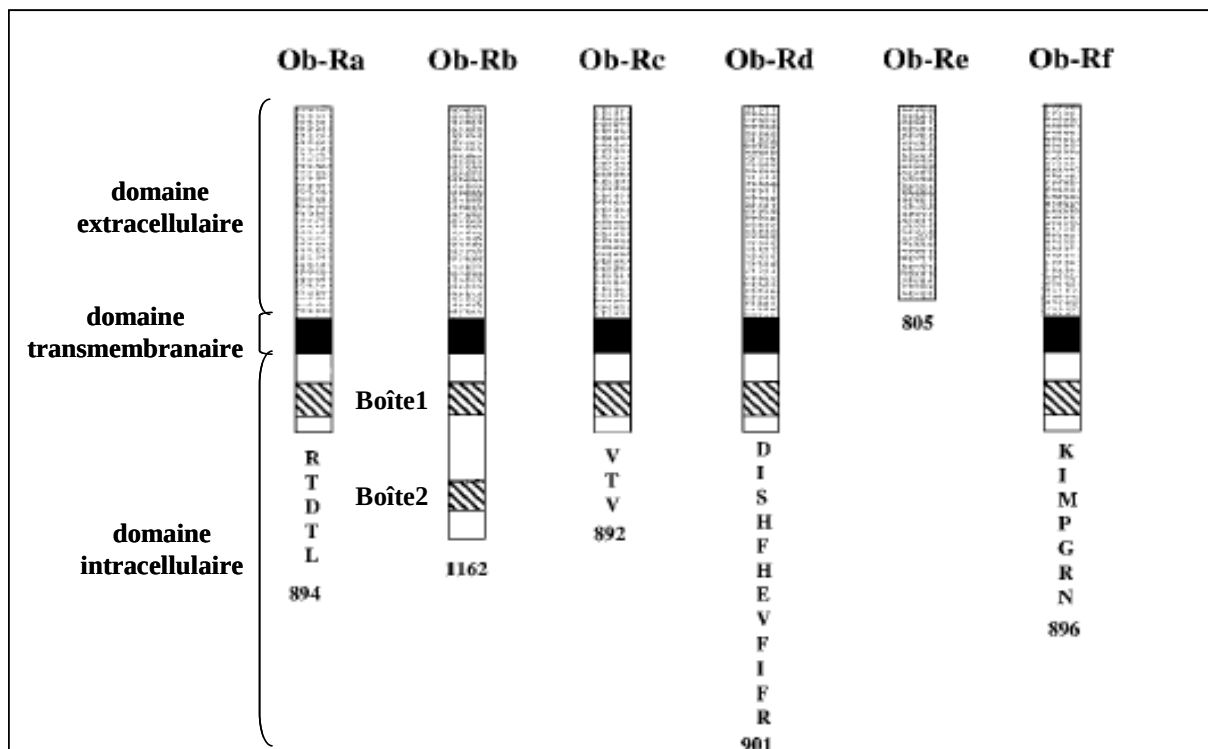


Fig 7: Les différentes isoformes du récepteur de la leptine.

Toutes les isoformes de ObR possèdent un domaine extracellulaire commun. Le domaine intracellulaire permet de différencier les isoformes courtes ObRs (a, c, d, f) et l'isoforme longue ObRb. L'absence de domaine transmembranaire est caractéristique de l'isoforme circulante ObRe. D'après Ahima RS *et al.*, 2000.

III.2.a L'isoforme longue ObRb.

A partir des données obtenues lors du clonage de ObRa, l'équipe de Tepper en collaboration avec Morgenstern, a pu isoler une autre isoforme de ObR chez l'homme et chez la souris (Chen H *et al.* 1996). Le domaine intracellulaire carboxy-terminal de cette isoforme est composé de 302 résidus : c'est l'isoforme longue ou ObRb. Elle correspond au produit du gène *diabetes*. La mutation de ObRb retrouvée chez les souris *db/db* (Chen H *et al.* 1996; Lee G-H *et al.* 1996) et le rat Zucker (Phillips MS *et al.* 1996) conduit à l'obésité, suggérant le rôle prépondérant de ObRb dans l'établissement des voies de signalisation induites par la leptine. Les souris *db/db* sont d'ailleurs caractérisées par une déficience de la voie de signalisation « Signal Transducer and Activator of Transcription » (STAT) induite par la leptine (Ghilardi N *et al.* 1996). Pour ces raisons, ObRb peut être considérée comme l'isoforme la plus importante du récepteur de la leptine. De plus, les souris *db/db* possèdent le même phénotype que les souris *db^{3J}/db^{3J}* (mutation pour toutes les isoformes de ObR) et *ob/ob* (Bates SH et Myers JMG 2003).

III.2.b. Les isoformes courtes.

ObRa : cette isoforme est exprimée dans la très grande majorité des tissus étudiés. Cependant, sa fonction précise est à l'heure actuelle mal définie et son importance probablement sous-estimée. En effet, malgré un domaine intracellulaire court, ObRa possède la capacité d'activer certaines voies de signalisation en réponse à la leptine (voir le paragraphe IV de ce chapitre). ObRa est également impliquée dans le transport actif de la leptine du sang vers le cerveau. Cette isoforme est fortement exprimée au niveau des micro-vaisseaux cérébraux et du plexus choroïde, structures qui constituent respectivement la barrière hémato-encéphalique et la barrière hémato-fluide cérébrospinaux (Bjorbaek C *et al.* 1998b). Le passage de la barrière hémato-encéphalique est réduit chez les souris ObRa « knock-out » (KO). *In vitro*, ObRa possède la capacité de transporter la leptine au travers des cellules de rein (Madin-Darby Canine Kidney) par transcytose (Hileman SM *et al.* 2000).

ObRc, ObRd, ObRf : ces trois isoformes courtes sont moins exprimées que ObRa et le sont uniquement dans certains tissus. De plus, contrairement à ObRa, leurs séquences sont faiblement conservées entre les espèces (Ahima RS et Flier JS 2000) suggérant un rôle moins important de ces isoformes dans la physiologie de la leptine. Leurs fonctions sont à l'heure actuelle très mal définies. ObRc est exprimée dans les micro-vaisseaux cérébraux et le plexus choroïde suggérant comme pour ObRa une fonction de transporteur de leptine (Hileman SM

et al. 2002). ObRd et ObRf sont très faiblement exprimés dans les tissus et ne semblent pas jouer de rôle majeur dans la biologie de la leptine.

III.2.c. L'isoforme circulante ObRe.

ObRe ne possède ni le domaine transmembranaire ni le domaine intracellulaire de ObR. Ce récepteur circulant correspond à la protéine de liaison (ou « binding protein ») soluble de la leptine (Li C *et al.* 1998). Comme les autres « binding protein », la principale fonction de ObRe est de stabiliser la leptine plasmatique, de réguler la proportion de leptine libre dans le plasma et donc son action biologique.

L'ARNm codant pour ObRe est présent chez la souris et le rat mais aucun ARNm correspondant n'a été découvert chez l'homme alors que la protéine ObRe est bien présente dans le plasma (Chua JSC *et al.* 1997). ObRe humain n'est donc pas le produit d'une transcription génique classique. Les isoformes ObRa et ObRb peuvent être clivées au niveau de leur domaine extracellulaire et former ainsi ObRe (Ge H *et al.* 2002). Ce processus de clivage pourrait jouer un rôle prépondérant dans le contrôle des effets physiologiques de la leptine. En effet, des études menées chez l'homme ont montré que l'obésité est associée à une baisse de ObRe circulant dans le plasma, tandis qu'une perte de poids est associée à son augmentation (Van Dielen FMH *et al.* 2002). A l'inverse, d'autres études n'ont montré aucune différence dans la concentration plasmatique de ObRe chez les patients obèses ; cependant ceux-ci présentent environ 75% de ObRe liée à la leptine, contre seulement 33% chez les sujets sains. Dans tous les cas, la majorité de la leptine circule sous forme libre chez les individus obèses (Wu Z *et al.* 2002).

III.3. Expression tissulaire du récepteur de la leptine.

ObRa est l'isoforme la plus exprimée au niveau périphérique, en terme de quantité et de localisation, tandis que ObRb est plus exprimée au niveau central. A l'heure actuelle, ObRa semble exprimée dans l'ensemble des tissus périphériques étudiés (hypophyse, foie, muscle squelettique et lisse, cœur, reins, pancréas, os, poumons, intestin, testicules, ovaire, rate, glande mésentérique, tissu adipeux) suggérant une grande diversité dans les fonctions de la leptine et dans les processus biologiques qu'elle régule.

Initialement, l'expression de ObRb n'avait été montrée qu'au niveau central. Cependant, quelques études montrent la présence de ObRb au niveau de la glande mésentérique, du rein, du poumon, du muscle et du foie (Hoggard N *et al.* 1997; Tsuchiya

T *et al.* 1999; Kim Y-B *et al.* 2000). En 1999, l'équipe de RJ Smeyne montre que ObRb est exprimée dans de nombreux tissus périphériques mais à un très faible niveau (Chen S *et al.* 1999). L'équipe de Cinti montre même que la majorité des tissus périphériques expriment ObRa et ObRb dans les mêmes types cellulaires (De Matteis R *et al.* 1998). ObRb semble également exprimée au niveau hypophysaire bien que cette donnée reste soumise à discussion ; nous aborderons ce sujet dans la partie consacrée à la relation entre GH et leptine (voir Chapitre 4 IV.2.b).

- Les différentes isoformes du récepteur de la leptine -

- Le récepteur de la leptine ObR appartient à la famille des récepteurs de cytokines de classe I.
- Il existe 6 isoformes du récepteur de la leptine qui sont répertoriées en isoforme longue (ObRb), isoformes courtes (ObRa principalement) et isoforme circulante (ObRe).
- ObRb est principalement exprimée au niveau du système nerveux central mais semble également présente dans certains tissus périphériques. Elle est considérée comme l'isoforme la plus importante pour l'action biologique de la leptine.
- ObRa est l'isoforme la plus exprimée en terme de quantité et de localisation. Elle est exprimée au niveau central et dans la très grande majorité des tissus périphériques. Si ObRa joue un rôle prépondérant dans le passage de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique, l'ensemble de ses fonctions est pour l'instant mal défini.
- ObRe correspond à la « binding protein » de la leptine. Elle permet de stabiliser la leptine dans le compartiment sanguin, de réguler la proportion de leptine libre dans le plasma et donc son action biologique. ObRe est produite directement par transcription/traduction (chez les rongeurs) ou indirectement par clivage des isoformes ObRa et ObRb (chez les rongeurs et l'homme).

IV. Les voies de signalisation activées par le récepteur de la leptine.

Bien qu'initialement ObRb était considérée comme la seule isoforme capable d'activer les voies de signalisation induites par la leptine, des études ont montré que les isoformes courtes ObRs peuvent également participer à la régulation de ces voies.

IV.1. La dimérisation du récepteur.

En absence de leptine, ObRb et ObRs sont présentes au niveau de la membrane plasmique sous la forme de monomères ou d'homodimères. La leptine interagit avec ObR selon une stoechiométrie de 1:1, conduisant à la formation de complexes tétramériques récepteur-ligand (Devos R *et al.* 1997). En absence de leptine, il n'existe pas d'hétérodimères ObRb / ObRs. Ceux-ci deviennent cependant détectables en présence de leptine, mais leur participation à l'activation des voies de signalisation de la leptine reste à démontrer (White D et Tartaglia L 1999).

ObR appartenant à la famille des récepteurs de cytokines, il ne possède pas d'activité enzymatique (kinase) intrinsèque. L'activation complète de ObR ne peut donc avoir lieu que par l'intermédiaire de protéines à activité tyrosine kinase, les JAK. La formation du complexe tétramérique ObR-Ob induit un changement conformationnel permettant l'activation des JAK qui activent en retour ObR (Ihle JN et Kerr IM 1995).

IV.2. Les Janus Kinases (JAK).

La famille JAK comprend quatre membres (JAK1, 2, 3 et TYK2) qui sont constitutivement associés aux récepteurs de cytokines *via* les séquences conservées Box1 (présente dans ObRs et ObRb) et Box2 (présente uniquement dans ObRb) (Behrmann I *et al.* 2004). ObR n'interagit qu'avec JAK2 (Ghilardi N et Skoda RC 1997) bien que JAK1 semble également avoir un rôle *in vitro* dans l'activation des voies de signalisation de la leptine (Bjorbaek C *et al.* 1997).

La Box1 et les acides aminés 31-36 localisés en aval (présents dans ObRb uniquement) sont suffisants pour l'activation de JAK2 par la leptine (Kloek C *et al.* 2002). Cependant d'autres résultats montrent que si les résidus 31-36 permettent une activation de JAK2 maximale, ils ne sont pas indispensables. Ainsi JAK2 peut être activée à la fois par ObRb et ObRs, du moins *in vitro* (Bjorbaek C *et al.* 1997; Murakami T *et al.* 1997).

Une fois activée, JAK2 phosphoryle le domaine intracellulaire du récepteur au niveau de plusieurs résidus Tyrosine, notamment Y⁹⁸⁵, Y¹⁰⁷⁷ et Y¹¹³⁸. Chaque tyrosine phosphorylée permet le recrutement de protéines adaptatrices spécifiques possédant un domaine « Src Homology 2 » (SH2) et ainsi l'initiation des différentes voies de signalisation. La spécificité du recrutement de ces protéines adaptatrices s'effectue grâce aux acides aminés environnants ces tyrosines phosphorylées (Zhou S *et al.* 1993). La protéine JAK2 active peut également recruter directement certaines protéines adaptatrices. Elle joue donc un rôle central dans la

signalisation de la leptine, en régulant directement ou *via* le récepteur activé les différentes voies de transduction du signal.

IV.3. La voie STAT.

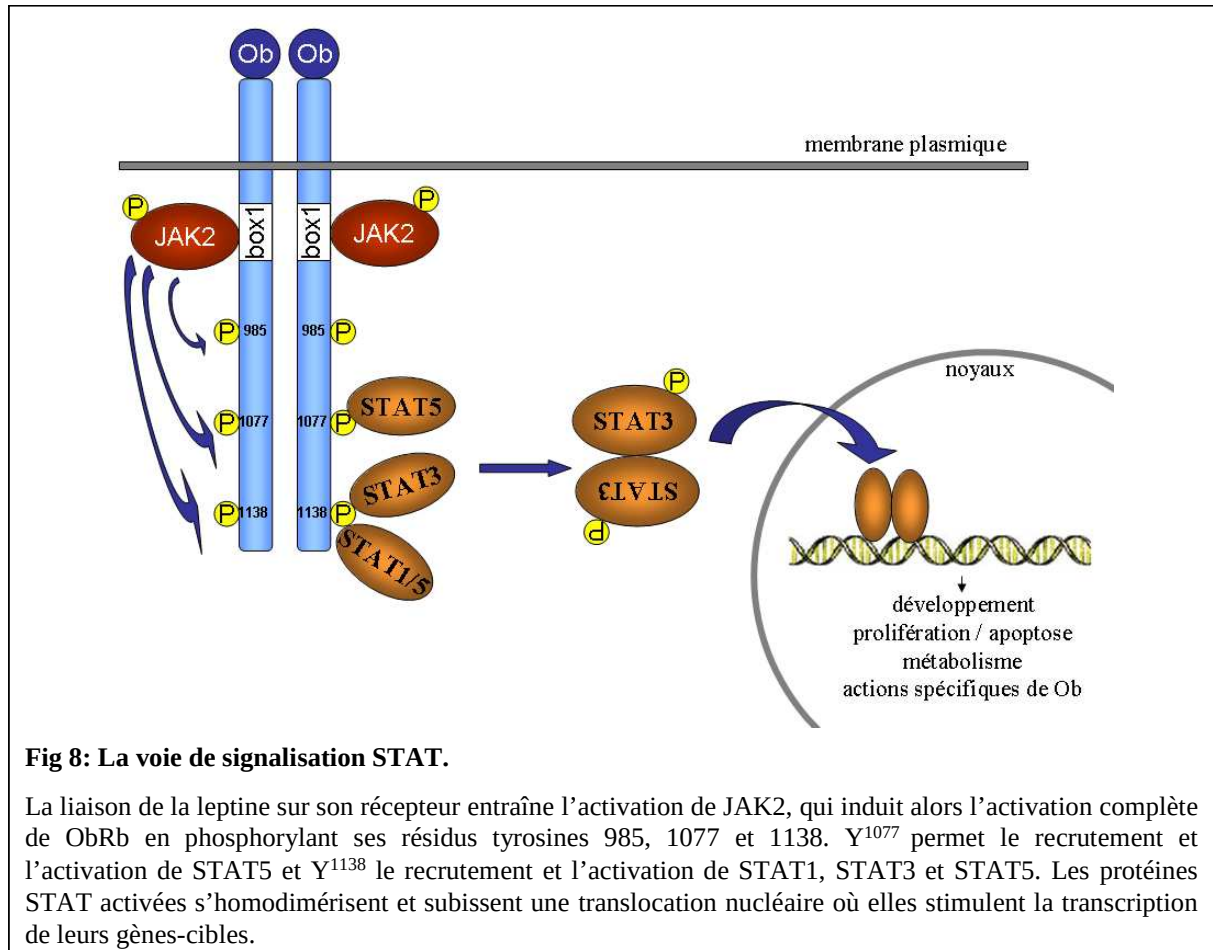
La famille des protéines STAT comprend sept membres (85 à 95 kDa). Ce sont des facteurs de transcription activés par l'ensemble des cytokines (Levy DE et Darnell JE 2002). Les STAT sont recrutées *via* leur domaine SH2 par ObRb uniquement, au niveau des tyrosines phosphorylées Y¹⁰⁷⁷ et Y¹¹³⁸, et sont activées par la phosphorylation de leurs propres résidus tyrosines (Baumann H *et al.* 1996). Les STAT s'assemblent ensuite en homodimères et effectuent une translocation nucléaire. Elles stimulent alors la transcription de nombreux gènes-cibles impliqués dans le contrôle de processus biologiques variés tels que le développement, la prolifération, l'apoptose et le métabolisme (Figure 8). C'est aussi par l'intermédiaire des STAT que les cytokines induisent leurs fonctions plus spécifiques.

Parmi les membres de la famille STAT, plusieurs possèdent la capacité d'être recruté par ObRb. La sélection s'effectue en fonction des tissus et des conditions physiologiques, grâce notamment aux séquences peptidiques avoisinant Y¹⁰⁷⁷ et Y¹¹³⁸. *In vitro*, dans les cellules COS co-transfectées avec des constructions ADNC codant pour l'isoforme ObRb de souris et les différentes protéines STAT, seules STAT3, STAT5 et STAT6 sont activées en réponse à la leptine (Ghilardi N *et al.* 1996). Cependant, d'autres études ont montrées que la leptine pouvait activer également STAT1, et *in vivo* ObRb ne semble pas activer STAT6.

Chez l'homme et les rongeurs, l'injection de leptine induit l'activation de STAT3 dans les principaux tissus impliqués dans le contrôle de la balance énergétique : le tissu adipeux (Bendinelli P *et al.* 2000), le muscle et le foie (Kim Y-B *et al.* 2000), les îlots de Langerhans (Morton NM *et al.* 1999) et l'hypothalamus (Vaisse C *et al.* 1996). STAT1 est également activée par la leptine *in vivo*, principalement au niveau du tissu adipeux (Bendinelli P *et al.* 2000), ainsi que STAT5 au niveau de l'intestin (Morton NM *et al.* 1998). STAT5 peut être recrutée par Y¹⁰⁷⁷ ou Y¹¹³⁸ tandis que STAT3 et STAT1 ne sont recrutées que par Y¹¹³⁸.

Néanmoins, STAT1 et STAT5 ne sont pas activées par la leptine au niveau de l'hypothalamus (McCowen KC *et al.* 1998). Les souris exprimant le récepteur ObRb muté pour la tyrosine 1138 (souris ObRb^{Y1138S}), caractérisé par une incapacité à recruter STAT3, présentent une augmentation de la prise alimentaire ainsi qu'une diminution de la dépense énergétique induisant une obésité précoce (Bates SH *et al.* 2003). Ces données montrent l'importance de l'activation de la protéine STAT3 dans la médiation des effets de la leptine. Il

est intéressant de noter que les souris Y1138S, malgré leur obésité, ne présentent pas d'altération de leur pouvoir de reproduction (Bates SH *et al.* 2003) contrairement aux souris ObRb KO, ce qui rend compte de l'importance des voies de transduction du signal autres que STAT.

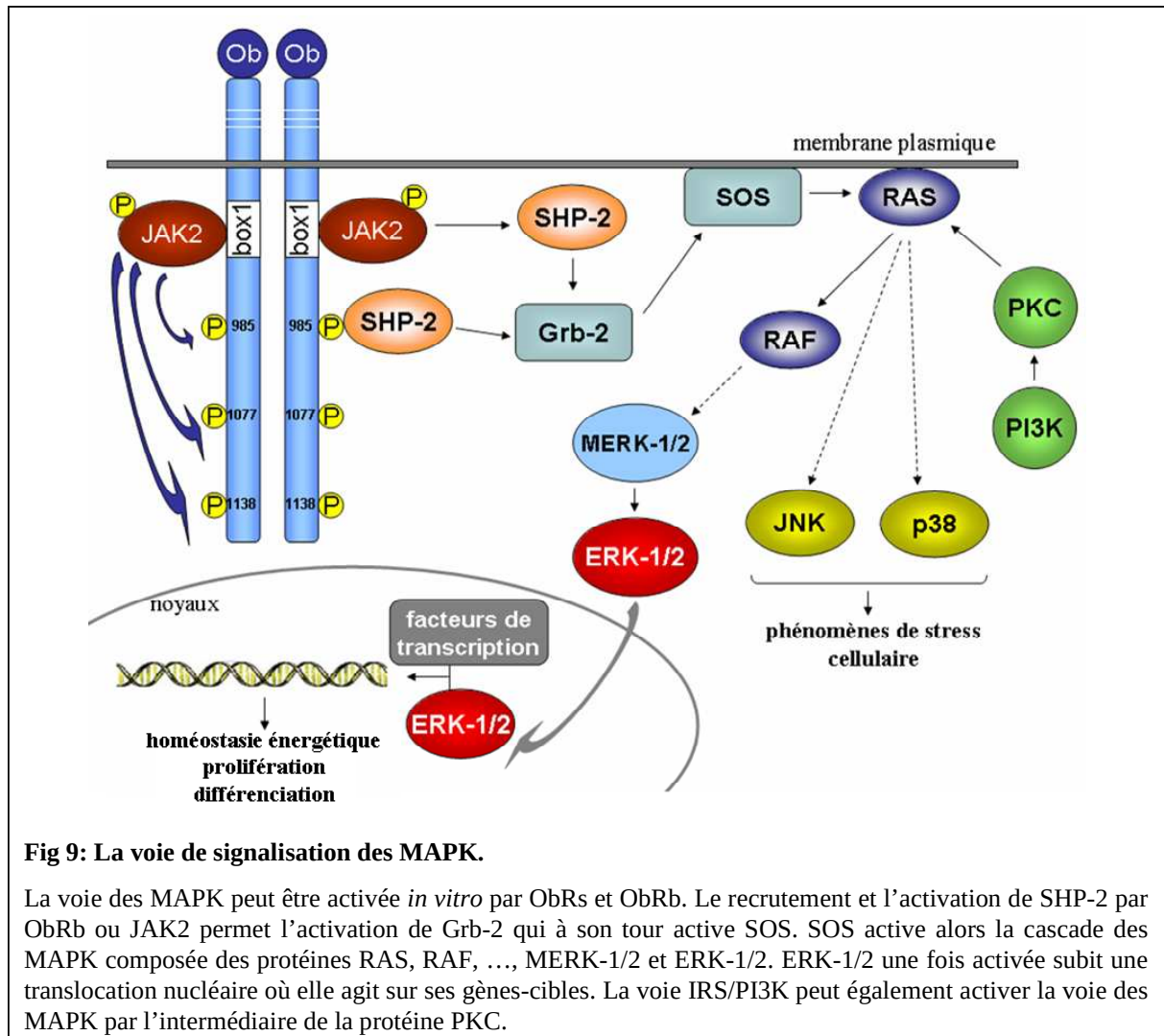


IV.4. La voie des MAPK.

La voie MAPK (« Mitogen-Activated Protein Kinase ») joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie énergétique de la cellule. Elle stimule la production d'énergie en agissant par exemple sur le transport du glucose et l'oxydation des acides gras, et freine la consommation énergétique en inhibant la lipogenèse, la gluconéogenèse et la synthèse protéique.

La famille des protéines MAPK comprend à l'heure actuelle douze membres qui forment une véritable cascade de signalisation activée entre autres par les cytokines. Cette cascade est activée par la leptine *via* ObRb et plus faiblement *via* ObRs (Bjorbaek C *et al.* 1997). En effet, la cascade Ras/Raf/.../MEK/ERK (« Mitogen-activated Kinase » /

« Extracellular signal Regulated Kinase ») peut être stimulée par l'intermédiaire du domaine intracellulaire phosphorylé de ObRb ou indépendamment de celui-ci par JAK2. Cependant dans les 2 cas, l'activation de la protéine « SH2 domain-containing protein tyrosine Phosphatase » (SHP-2) est indispensable pour une activation maximale de cette voie de signalisation (Bjorbaek C *et al.* 2001). SHP-2 est recrutée par ObRb au niveau du résidu tyrosine Y⁹⁸⁵ (Li C et Friedman JM 1999) ou par JAK2 de façon directe ou indirecte. SHP-2 permet alors le recrutement de la protéine adaptatrice « Growth factor Receptor Binding protein » (Grb-2) (Banks AS *et al.* 2000). Grb-2 active ensuite la protéine membranaire « Son Of Sevenless » (SOS), qui phosphoryle à son tour une autre protéine membranaire Ras, déclencheur de la cascade des MAPK (Figure 9).



L'ensemble des protéines impliquées dans cette cascade est encore mal défini. Les protéines situées en bout de cascade sont MEK-1/2 et ERK-1/2. L'activation de ERK-1/2 par

les MEK-1/2 induit sa translocation nucléaire (Horgan AM et Stork PJS 2003) où en coopération avec des facteurs de transcription, elle régule l'expression de gènes-cibles tels que *c-fos* et *egr-1* impliqués dans les processus de prolifération et de différenciation (Figure 9).

In vitro le recrutement et l'activation de la protéine SHP-2 induit une inhibition de l'activation de STAT3 (Bates SH et Myers JMG 2003). Cette interaction, si elle était avérée *in vivo*, représenterait la possibilité d'une activation différentielle des voies de signalisation induites par la leptine. Dans les cellules mononucléaires humaines, de muscle L6 et de muscle lisse des vaisseaux sanguins, la leptine peut réguler l'activité de la MAPK p38 qui est impliquée notamment dans les phénomènes de stress (van den Brink GR *et al.* 2000; Sweeney G *et al.* 2001; Shin H-J *et al.* 2005). La leptine peut également activer la protéine de stress cellulaire « c-Jun N-terminal kinase » (JNK) (Bouloumie A *et al.* 1999).

IV.5. La voie IRS/PI3K.

IV.5.a. La relation entre leptine et insuline.

La voie IRS/PI3K (« Insulin Receptor Substrate / Phosphoinositide 3-kinase ») est la voie principale par laquelle l'insuline induit ses effets. Le récepteur de la leptine activé peut également recruter certains acteurs de cette voie, et il existe une interconnection entre les voies de signalisation de ces 2 hormones, qui sont impliquées entre autres dans le contrôle de la prise alimentaire (Niswender KD et Schwartz MW 2003). Cependant, selon les tissus ou les conditions expérimentales, la leptine et l'insuline peuvent agir en synergie ou de façon opposée sur la voie IRS/PI3K (Szanto I et Kahn CR 2000; Carvalheira JBC *et al.* 2001; Benomar Y *et al.* 2005; Hennige AM *et al.* 2006).

IV.5.b. L'activation des IRS et de la PI3K.

La première évidence du rôle de la voie de signalisation IRS/PI3K dans l'action de la leptine provient des souris IRS-2 KO (IRS-2^{-/-}) qui présentent une augmentation de la prise alimentaire associée à une baisse de leurs dépenses énergétiques (Withers DJ *et al.* 1998). Les souris KO pour les autres membres de la famille des IRS, notamment IRS-1, ne présentent pas un tel phénotype, suggérant le rôle prépondérant de IRS-2 dans l'action de la leptine (Araki E *et al.* 1994).

L'activation des protéines IRS est la première étape de la voie IRS/PI3K. Dans le cas de la leptine, ObRs et ObRb peuvent activer *in vitro* IRS-1 et IRS-2, probablement par leur

interaction directe avec JAK2 (Bjorbaek C *et al.* 1997; Szanto I et Kahn CR 2000). Cependant la leptine peut également activer la voie IRS/PI3K sans agir *via* JAK2 et même activer la PI3K sans recruter les protéines IRS par un mécanisme encore inconnu (Berti L *et al.* 1997) (Figure 10).

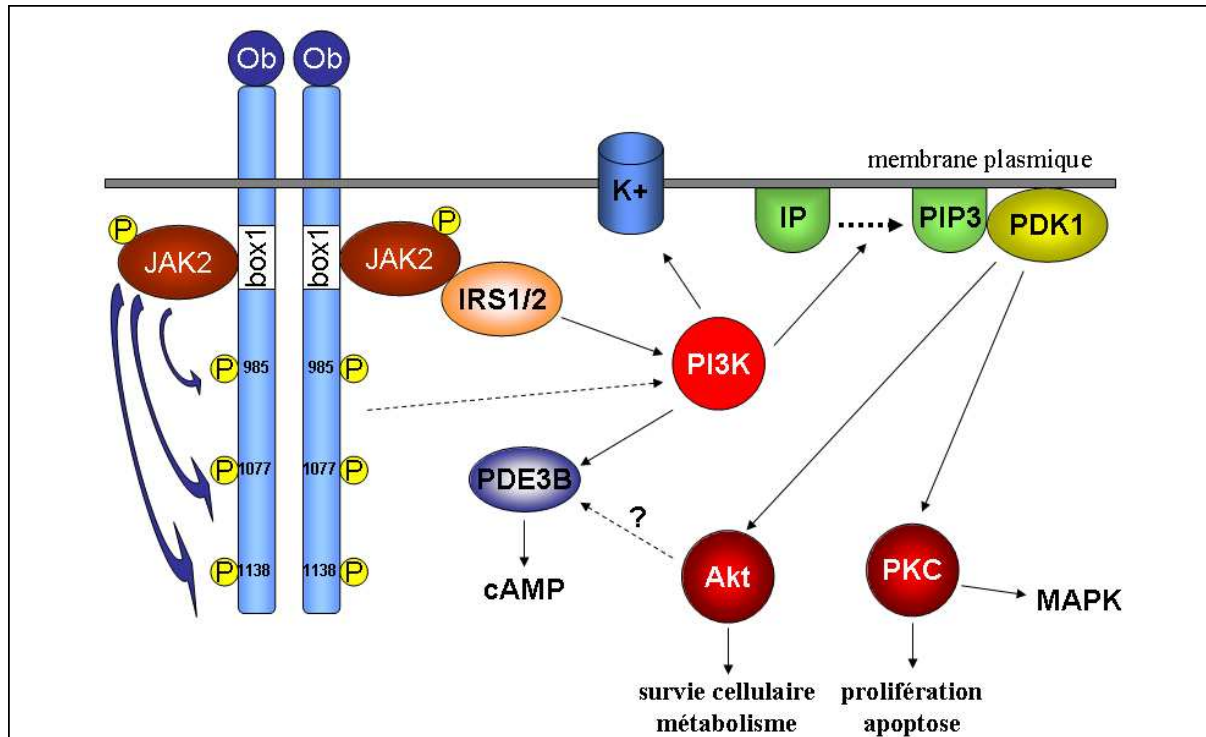


Fig 10: La voie de signalisation IRS/PI3K.

In vitro, la voie IRS/PI3K peut être activée en réponse à la leptine par les isoformes ObRs et ObRb. IRS1/2 est activé par l'intermédiaire de JAK2 ou par un autre mécanisme inconnu, et active en réponse PI3K. Les cibles moléculaires de PI3K sont principalement les canaux potassiques, la protéine PDE3B impliquée dans le contrôle de la production d'AMPc et les inositols phosphates conduisant à la formation de PIP3. PIP3 active par l'intermédiaire de PDK1 les protéines Akt et PKC impliquées dans de nombreux processus comme la prolifération, l'apoptose et le métabolisme cellulaire.

Les protéines IRS-1/2 activées interagissent avec la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K, ce qui provoque l'augmentation de l'activité de la sous-unité catalytique p110 de la PI3K (Sun XJ *et al.* 1995). La PI3K activée phosphoryle les « inositol phosphates » localisés au niveau de la membrane plasmique pour produire « Phosphoinositol(3,4,5)Phosphate 3 » (PIP3). PIP3 sert alors de substrat à la « Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 » (PDK1) qui active à son tour la famille des « protein kinase C » (PKC) et Akt (Protein Kinase B), deux protéines clés pour les événements en aval (Figure 10).

IV.5.c. Les protéines Akt et PKC.

Akt joue un rôle prépondérant dans de nombreux processus comme la survie et le métabolisme cellulaires (Chan TO *et al.* 1999). Akt est activée par de nombreux facteurs de croissance. Néanmoins, la leptine n'a qu'un impact mineur sur son activation (Kim Y-B *et al.* 2000; Zhao AZ *et al.* 2000). De plus la leptine ne semble pas influencer l'activation de Akt par l'insuline.

La famille des protéines PKC compte douze isoformes et joue un rôle prépondérant dans la prolifération cellulaire et l'apoptose (Dempsey EC *et al.* 2000). Elle permet également de faire le lien entre les voies IRS/PI3K et MAPK, l'activation de la protéine Ras nécessitant une PKC active. Différentes études ont montré que la leptine possède, selon les conditions physiologiques, un effet inhibiteur ou stimulateur sur l'activation des différentes isoformes de PKC (Chen NG *et al.* 1997; Ookuma M *et al.* 1998). Le rôle de PKC dans la transduction du signal induite par la leptine est encore mal défini.

IV.5.d. La voie IRS/PI3K au niveau central.

Au niveau des neurones hypothalamiques, la voie IRS/PI3K régule les canaux potassiques ATP dépendants (K⁺/ATP), impliqués dans l'excitation des cellules nerveuses (Figure 10). De plus, au niveau central, la leptine agit également sur le métabolisme de l'AMPc en activant, *via* PI3K, la « Phosphodiesterase 3B » (PDE3B) (Zhao AZ *et al.* 1998) (Figure 10). Ainsi la voie IRS/PI3K participe à la régulation de l'expression et de la sécrétion des neuropeptides hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la balance énergétique comme le « neuropeptide Y » (NPY) (Zhao AZ *et al.* 2002). La voie IRS/PI3K est indispensable pour médier les effets anorexigènes de la leptine et de l'insuline au niveau central (Spanswick D *et al.* 1997; Sweeney G 2002; Niswender KD *et al.* 2003).

L'étude de la voie de transduction IRS/PI3K activée par la leptine est toujours d'actualité. En effet, la relation entre cette voie et le phénomène de résistance à la leptine n'a pas encore été établie. De même, le rôle de PI3K dans la médiation des effets biologiques de la leptine autres que la régulation de la balance énergétique reste encore à déterminer.

IV.6. Les régulateurs négatifs des voies de signalisation.

IV.6.a. SOCS-3.

Les protéines SOCS (« Suppressor Of Cytokine Signaling ») sont les acteurs d'une boucle de rétrocontrôle négatif induite par de nombreuses cytokines. La transcription des

gènes codant pour les protéines SOCS est activée par les protéines STAT. Une fois synthétisées, les SOCS inhibent en retour les protéines STAT, JAK et par conséquent les voies MAPK et IRS/PI3K, bien que leur rôle dans l'inhibition de cette dernière soit encore mal défini (Figure 11).

In vitro, la leptine *via* ObRb induit l'expression de SOCS-3 environ 1 à 2 heures après stimulation; les niveaux de SOCS-3 sont maximum 4 heures après stimulation et restent élevés pendant 24 heures. SOCS-3 se fixe sur de multiples sites du domaine intracellulaire de ObRb, conduisant à une baisse de l'activation de STAT3 (20% de baisse 4 heures après stimulation puis 30-40% de 8 à 24 heures), de JAK2 (50% de 2 à 4 heures après stimulation, puis 30% de 8 à 24 heures après stimulation), de ERK (60% de 2 à 4 heures après stimulation, puis 80-90% de 8 à 24 heures) (Dunn SL *et al.* 2005).

In vivo, l'injection de leptine au niveau central, et plus particulièrement au niveau du noyau arqué, entraîne l'expression hypothalamique de SOCS-3. L'expression de SOCS-3 dans ces neurones est modulée par le jeûne et la prise alimentaire (Baskin DG *et al.* 2000). Une augmentation de l'expression de SOCS-3 au niveau hypothalamique est associée au phénomène de résistance à la leptine caractéristique de l'obésité (Bjorbaek C *et al.* 1999). De plus, chez le rat, une déficience en SOCS-3 conduit à une plus grande sensibilité à la leptine et à une résistance à l'obésité induite par l'alimentation (« Diet-Induced Obesity » (DIO)) (Howard JK *et al.* 2004).

IV.6.b. PTP1B.

Comme SOCS-3, PTP1B (« Protein Tyrosine Phosphatase 1B ») est un régulateur négatif de la signalisation induite par la leptine, *in vitro* et *in vivo*, aussi bien au niveau central que périphérique (Kasubaska W *et al.* 2002; Zabolotny JM *et al.* 2002). Sa cible principale est JAK2 dont elle inhibe l'activation. PTP1B agit également négativement sur la voie de signalisation de l'insuline, probablement en inhibant les IRS (Figure 11). C'est un élément clé des interactions entre les voies de signalisation de l'insuline et de la leptine. Les souris PTP1B KO sont caractérisées par une sensibilité accrue à l'insuline et à la leptine, ainsi que par une résistance à l'obésité (Elchebly M *et al.* 1999).

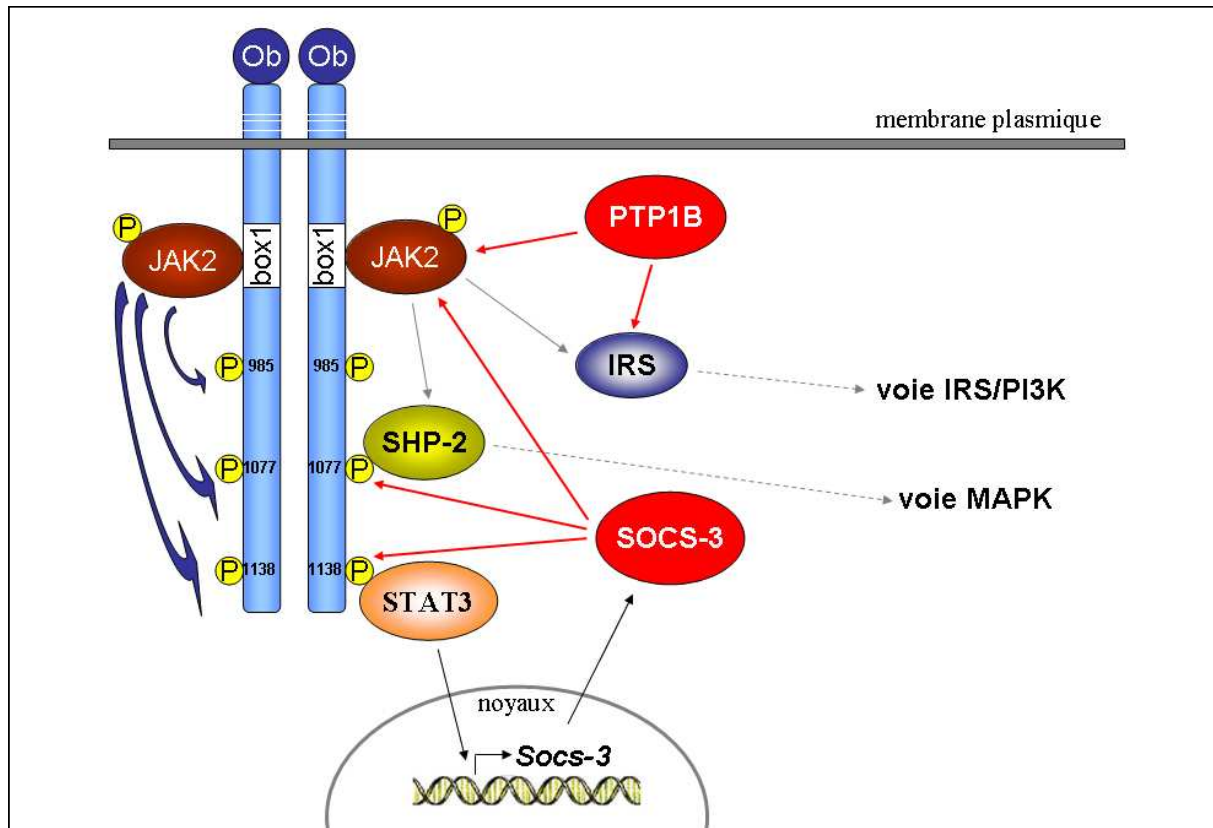


Fig 11: Les régulateurs négatifs de la signalisation induite par la leptine.

La synthèse de SOCS-3 est activée par les STAT. SOCS-3 inhibe la signalisation induite par la leptine en agissant au niveau de JAK, STAT et ObRb. PTP1B est un inhibiteur de JAK2 et des IRS; c'est un élément majeur du « cross-talk » entre les voies de signalisation induites par la leptine et l'insuline.

IV.7. Autres voies de signalisation induites par la leptine.

La leptine peut activer la « 5'-AMP-Activated Protein Kinase » (AMPK), une enzyme clé dans le contrôle du métabolisme cellulaire qui stimule notamment l'oxydation des acides gras et l'entrée de glucose dans la cellule (Minokoshi Y *et al.* 2002; Hardie DG *et al.* 2003; Unger RH 2003). L'AMPK joue également un rôle important dans le contrôle de la prise alimentaire au niveau hypothalamique (Minokoshi Y *et al.* 2004).

D'autre part, la leptine participe également à la régulation du système de l'oxide nitrique (NO) en augmentant sa production et sa libération, en particulier au niveau des cellules endothéliales (Kimura K *et al.* 2000). Par ce mécanisme, la leptine pourrait participer au contrôle de la pression artérielle bien que la réalité de ce phénomène *in vivo* soit encore discutée.

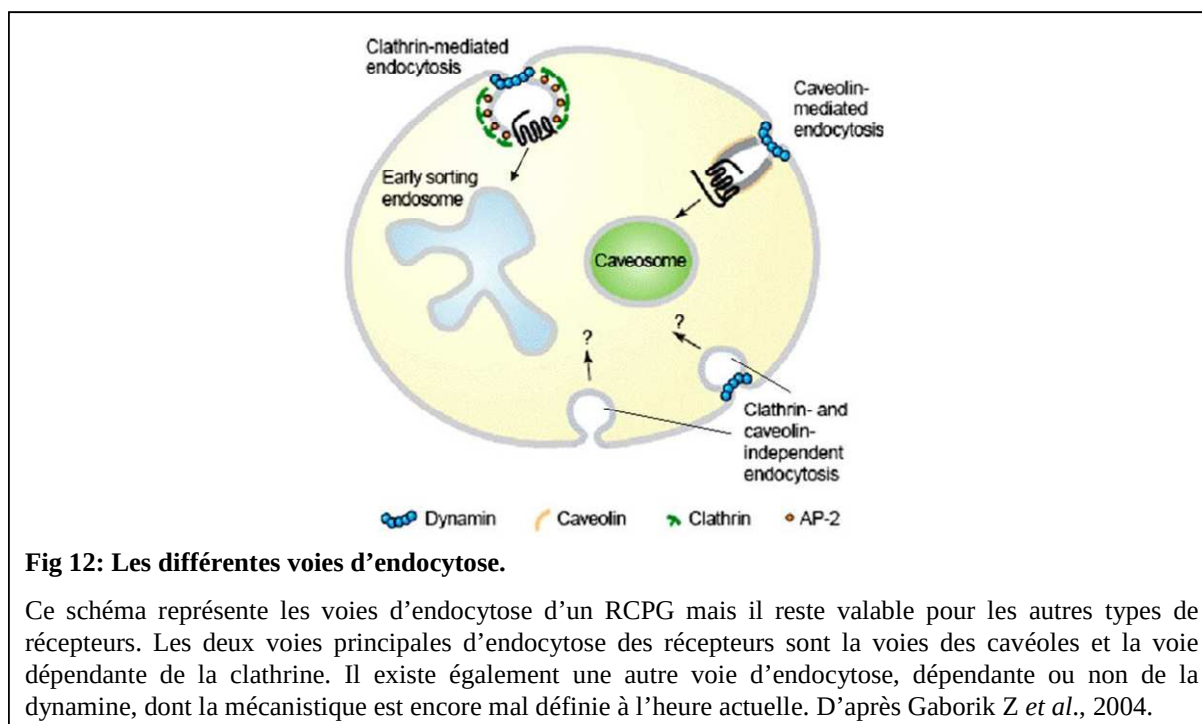
- Les voies de signalisation induites par la leptine -

- En absence de leptine, ObRb et ObRs sont présents au niveau de la membrane plasmique sous la forme de monomères ou d'homodimères. La fixation de la leptine sur ObR (complexe tétramérique 2(ObR-Ob)) entraîne l'activation de la protéine JAK2 qui est constitutivement associée à ObR. JAK2 active en retour ObR en le phosphorylant au niveau de plusieurs résidus tyrosines.
- ObRb est la seule isoforme permettant l'activation de la voie STAT. La leptine, induit *via* ObRb l'activation de la protéine STAT3 principalement, par laquelle elle engendre la majorité de ses effets sur la balance énergétique.
- La voie MAPK est activée par ObRb et plus faiblement par ObRs en réponse à la leptine, ceci par l'intermédiaire du domaine intracellulaire du récepteur ou *via* JAK2. Cette voie de signalisation, impliquée dans l'homéostasie énergétique cellulaire, stimule la production et freine la consommation d'énergie. Elle est également impliquée dans les processus de prolifération et de différenciation, ainsi que dans les phénomènes de stress cellulaire.
- ObRb et ObRs activent la voie IRS/PI3K en réponse à la leptine. Cette voie de signalisation est primordiale dans la médiation des effets anorexigènes de la leptine au niveau central. Elle est également impliquée dans les processus de prolifération et d'apoptose, ainsi que dans la régulation du métabolisme cellulaire.
- La leptine active également la voie de signalisation AMPK impliquée notamment dans le métabolisme cellulaire. La leptine participe également à la régulation du système de l'oxide nitrique (NO).
- Les protéines SOCS-3 et PTP1B sont des régulateurs négatifs des voies de signalisation induites par la leptine. Les protéines SOCS sont exprimées suite à l'activation de la voie STAT et inhibent en réponse l'activation des protéines STAT et JAK et ainsi inhiber également les voies de signalisation MAPK et PI3K. La protéine PTP1B inhibe les protéines JAK2 et IRS.

CHAPITRE 2 : Internalisation de la leptine et de son récepteur.

L'action d'une hormone sur ses tissus-cibles est dépendante du nombre de ses récepteurs localisés à la surface cellulaire (sauf évidemment dans le cas des récepteurs nucléaires, que nous excluons de ce chapitre). Ce nombre est le résultat d'une balance fine entre synthèse, adressage membranaire, recyclage et endocytose des récepteurs. L'endocytose est le mécanisme moléculaire de formation de vésicules au niveau de la membrane plasmique permettant l'internalisation des récepteurs.

Les rôles du processus d'internalisation sont variés : l'apport de nutriments à l'intérieur de la cellule, la régulation du nombre de protéines membranaires et la régulation de la signalisation induite par les hormones et autres ligands extracellulaires. Les récepteurs hormonaux peuvent être internalisés *via* différentes voies d'endocytose dont les principales sont la voie dépendante de la clathrine et la voie des cavéoles (Figure 12).



Dans ce chapitre nous nous consacrerons à l'étude de l'internalisation des récepteurs hormonaux membranaires, *via* ces deux voies d'endocytose, en nous focalisant sur le récepteur de la leptine. Après avoir décrit la mécanistique du processus d'endocytose, nous

nous intéresserons plus particulièrement à la relation entre l'internalisation du récepteur et l'activation des voies de transduction du signal sous-jacentes.

I. Internalisation par la voie dépendante de la clathrine.

La voie d'endocytose dépendante de la clathrine est considérée comme le principal processus d'internalisation des récepteurs hormonaux membranaires. Il existe différents types d'internalisation par cette voie : l'endocytose compensatoire (dans le cas des synapses), l'endocytose induite par le ligand et l'endocytose constitutive (internalisation du récepteur indépendamment de son ligand). Néanmoins, dans tous les cas, le mécanisme d'endocytose est identique et nécessite la même machinerie protéique.

I.1. Les composants des vésicules à clathrine.

La clathrine est l'un des constituants principaux des puits recouverts de clathrine (CCP pour « clathrin-coated pits »), structures membranaires spécialisées où sont généralement concentrés les récepteurs hormonaux membranaires. Les CCP sont également composés d'autres protéines comme le complexe AP-2 et la dynamine. L'ensemble de ces acteurs protéiques va permettre l'invagination de la membrane plasmique au niveau des CCP et la formation d'une vésicule à clathrine (CCV pour « clathrin-coated vesicles »).

I.1.a. La clathrine.

La clathrine a été caractérisée à la fin des années 70 (Pearse BMF 1976). C'est une protéine de grande taille, constituée de trois chaînes lourdes (180 kDa) associées par leur domaine carboxy-terminal et de trois chaînes légères (20-40 kDa) reliées aux chaînes lourdes (Figure 13). Les molécules de clathrine s'assemblent entre elles en une structure appelée triskèle (ou triskelion) sous forme de polygones observables en microscopie électronique (Kirchhausen T 2000) (Figure 13). Cet assemblage particulier forme un véritable squelette autour des CPP et CCV, permettant la déstructuration locale de la membrane plasmique et la formation des vésicules. En plus de ce rôle d'échafaudage, la clathrine participe également à l'organisation au niveau de la membrane plasmique des autres protéines impliquées dans le processus d'internalisation, ceci par l'intermédiaire de la Boîte Clathrine localisée au niveau du domaine amino-terminal des chaînes lourdes.

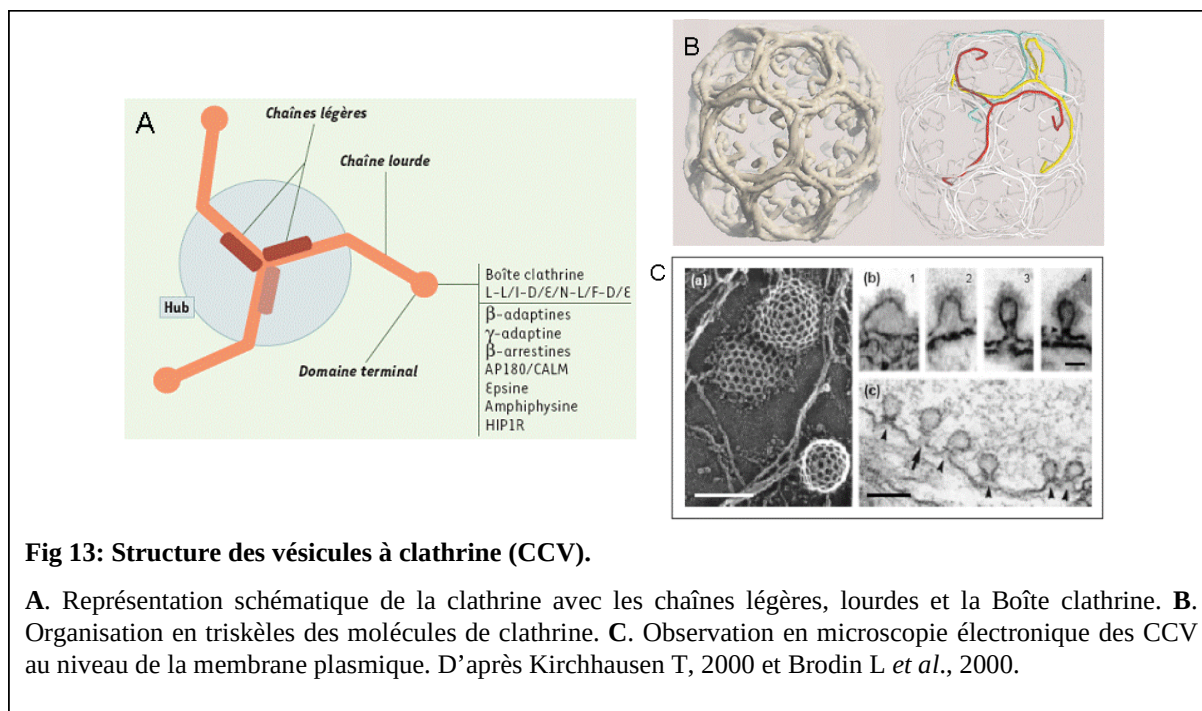


Fig 13: Structure des vésicules à clathrine (CCV).

A. Représentation schématique de la clathrine avec les chaînes légères, lourdes et la Boîte clathrine. **B.** Organisation en triskèles des molécules de clathrine. **C.** Observation en microscopie électronique des CCV au niveau de la membrane plasmique. D'après Kirchhausen T, 2000 et Brodin L *et al.*, 2000.

I.1.b. Le complexe AP-2.

Le complexe AP-2 est composé de deux chaînes lourdes, α et $\beta 2$ adaptines, et de deux chaînes légères associées en structure de « tête de Mickey » (Kirchhausen T 1999). Les complexes AP-2 sont des adaptateurs permettant le lien entre les composants de la membrane plasmique, les récepteurs et la clathrine. Ces protéines stimulent la formation des triskèles de clathrine au niveau de la membrane plasmique qui, selon le modèle proposé, forment une enveloppe autour de ces adaptateurs.

Les complexes AP-2 jouent un rôle primordial dans la reconnaissance des récepteurs et leur concentration au niveau des CCP, ainsi que dans le processus d'internalisation (Figure 14 et 16). Il existe dans le domaine intracellulaire des récepteurs hormonaux des motifs consensus spécifiques d'internalisation. Deux grandes classes ont été décrites : les motifs NPxY présents dans la famille du récepteur des LDL et les motifs Yxx Φ (Φ : résidu hydrophobe). Les récepteurs possédant le motif Yxx Φ interagissent directement avec les complexes AP-2. Les autres récepteurs interagissent avec cette protéine via des protéines intermédiaires comme la β -arrestine dans le cas des RCPG, et Disabled-2 (Dab-2) dans le cas de la famille du récepteur des LDL (Figure 14).

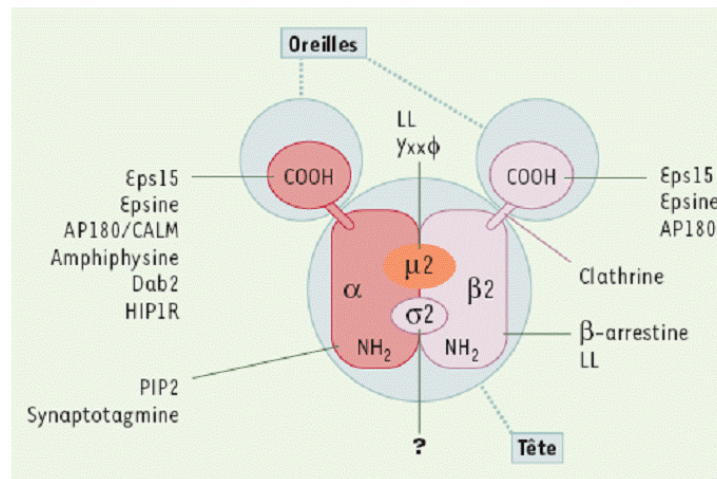


Fig 14: Structure du complexe AP-2.

Le complexe AP-2 est caractérisé par une structure en « tête de Mickey ». Cet adaptateur interagit directement avec le récepteur via son le motif peptidique YxxΦ ou indirectement via la β-arrestine. Il interagit également avec de nombreuses protéines auxiliaires permettant entre autres de stabiliser les vésicules d'endocytose en formation.

I.1.c. Les dynamines.

Les dynamines sont des GTPases impliquées dans la formation des vésicules d'endocytose et dans les phénomènes de fission membranaire (Hinshaw JE 2000). Les molécules de dynamine s'assemblent entre elles en spirales au niveau du cou de la vésicule en formation, agissant comme de véritables anneaux de constriction (Figure 15). Elles permettent la séparation entre la vésicule d'endocytose en cours de formation et la membrane plasmique.

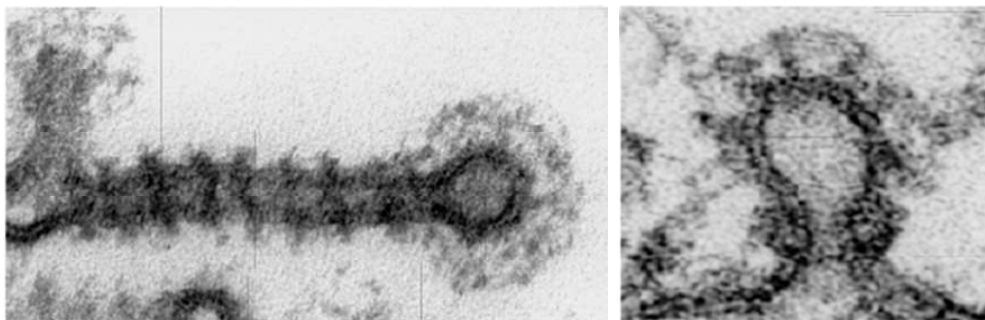


Fig 15: Observation d'une vésicule d'endocytose CCV en formation.

Les molécules de dynamine s'organisent en spirale agissant comme des anneaux de constriction et permettant la formation des CVV. D'après Hinshaw JE *et al.*, 2000.

La famille des dynamines compte trois membres (Dyn I, II, III), mais seule la dynamine II est exprimée de façon ubiquitaire. Bien que les fonctions distinctes de ces trois protéines soient encore mal appréciées, de nombreux résultats montrent que la dynamine I est impliquée dans

le processus d'internalisation dépendant de la clathrine. De plus, la surexpression par transfection d'un mutant de la dynamine I (Dyn K44A) entraîne une accumulation des CCP au niveau de la membrane plasmique (Damke H *et al.* 1994). Nous avons utilisé ce mutant de la dynamine I au cours de cette thèse afin d'inhiber l'internalisation du récepteur de la leptine.

I.1.d. Les protéines auxiliaires.

Chronologiquement, la clathrine, le complexe AP-2 et la dynamine ont été décrits en premier. Même si leur importance dans le processus d'endocytose est primordiale, d'autres acteurs protéiques ont depuis été découverts. Ceux-ci interagissent avec les protéines précédemment décrites, favorisant leurs interactions, leur activation ou leur recrutement au niveau de la membrane plasmique. Elles permettent également de connecter les CCP et CCV aux différents éléments du cytosquelette et en particulier aux microfilaments d'actine.

I.2. La formation des vésicules à clathrine et leur devenir.

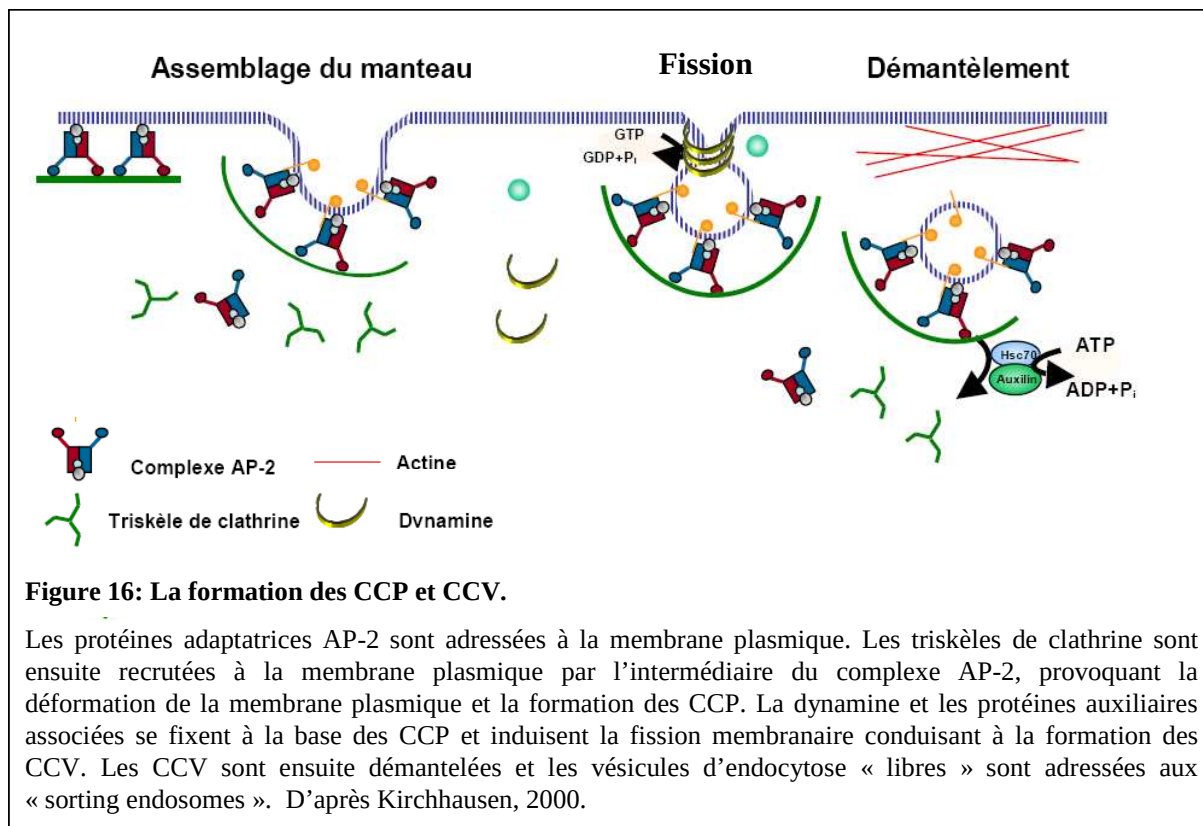
L'endocytose des récepteurs se produit au niveau de sites spécialisés de la membrane plasmique, les radeaux lipidiques (« lipid rafts »), caractérisés par une composition lipidique particulière, interconnectés avec le cytosquelette d'actine et riches en protéines membranaires (Gaidarov I *et al.* 1999). Les récepteurs hormonaux sont internalisés à partir de CCP pré-existants (Scott MGH *et al.* 2002). Généralement, seule une partie du pool de récepteurs est localisée dans les CCP préformés ou en cours de formation. L'assemblage du complexe hormone/récepteur peut induire la concentration des récepteurs au niveau des CCP.

I.2.a. La formation des CCP et des CCV.

Le recrutement du complexe AP-2 au niveau de la membrane plasmique constitue la première étape de la formation des CCP (Figure 16). Il dépend principalement des interactions avec les phosphoinositides membranaires (Gaidarov I et Keen JH 1999) et les protéines membranaires comme la synaptotagmine dans le cas des synapses (Zhang JZ *et al.* 1994).

Les molécules de clathrine sont ensuite recrutées à la membrane par l'intermédiaire du complexe AP-2. L'organisation en triskèles permet l'invagination de la membrane plasmique et la formation des CCP (Figure 16). Cette association structurale des molécules de clathrine est dépendante de protéines auxiliaires régulant la stabilité et la taille des CCP.

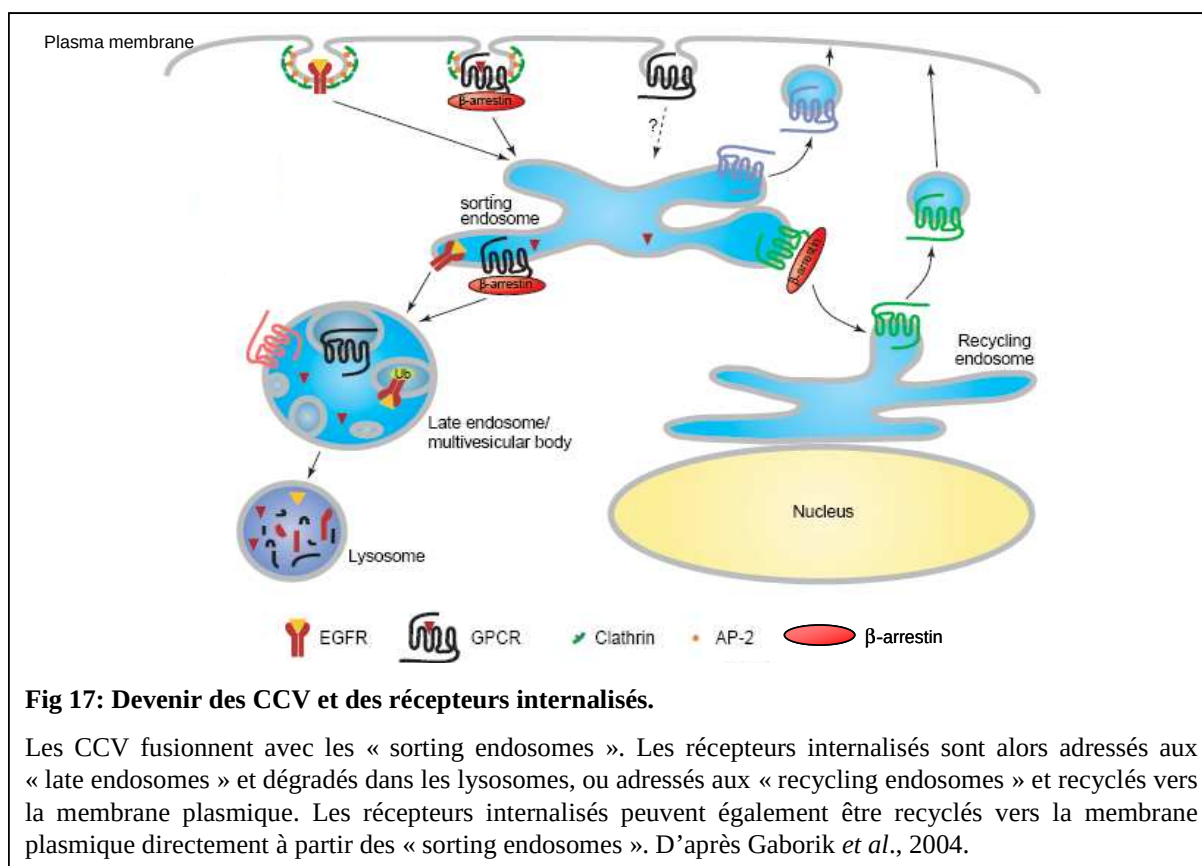
La dynamine et les protéines auxiliaires associées se fixent ensuite à la base des CCP, provoquant une réaction de fission et permettant le détachement des CCP de la membrane plasmique et la formation des CCV (Figure 16).



I.2.b. Devenir des CCV et des récepteurs internalisés.

Les « sorting endosomes ».

Les CCV une fois séparées de la membrane plasmique sont rapidement démantelées (perte du manteau de clathrine, complexe AP-2, dynamine et protéines auxiliaires) (Figure 16). Ces vésicules « libres » fusionnent alors avec des compartiments membranaires cytosoliques localisés en périphérie de la cellule, les « sorting endosomes » également appelés « early sorting endosomes » (Maxfield F et McGraw T 2004) (Figure 17). Les « sorting endosomes » reçoivent des vésicules provenant de l'internalisation dépendante et non-dépendante de la clathrine ; c'est le point de passage des récepteurs internalisés. Le pH intraluminal de ce compartiment est acide (pH=6) provoquant la séparation du complexe hormone/récepteur mais semble-t-il seulement en partie (voir paragraphe IV.2 de ce chapitre). Les récepteurs sont alors recyclés vers la membrane plasmique ou dégradés dans les lysosomes (Maxfield F et McGraw T 2004).



Le recyclage.

Le recyclage vers la membrane plasmique ne concerne pas tous les récepteurs internalisés. Au sein d'une même famille de récepteur, certains membres peuvent être recyclés et d'autres non. Il existe deux voies de recyclage, une dite « rapide » et une autre dite « lente ». La voie rapide correspond à un recyclage des récepteurs directement à partir des « sorting endosomes ». La voie lente correspond à un transfert des récepteurs des « sorting endosomes » vers les « recycling endosomes » à partir desquels ils sont adressés à la membrane plasmique. Les « recycling endosomes » sont des structures tubulaires localisées à proximité du noyau et dont le pH interne est moins acide que celui des « sorting endosomes » (Gaborik Z et Hunyady L 2004). Un même récepteur peut suivre parallèlement ces 2 voies de recyclage.

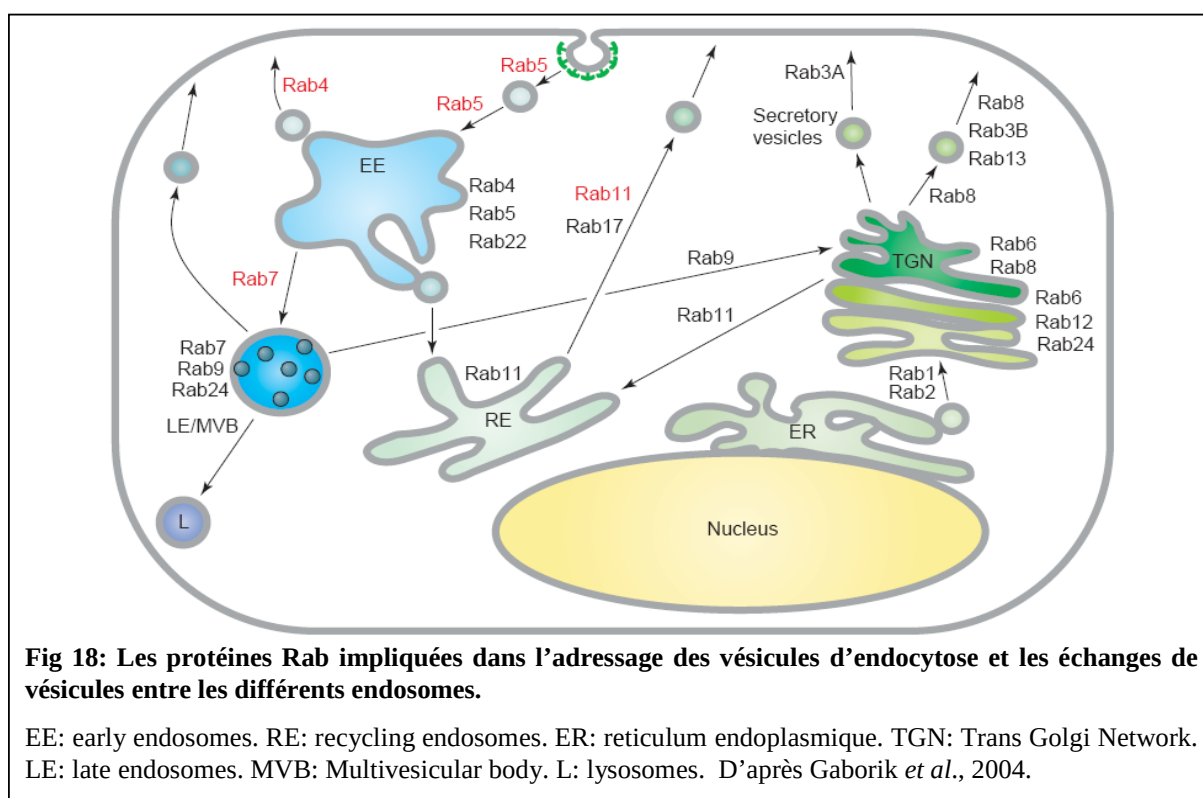
La dégradation.

Les « sorting endosomes » sont caractérisés par une structure tubulo-vésiculaire. Durant leur maturation, ils perdent progressivement leurs extensions tubulaires et le cœur des « sorting endosomes » migre alors vers l'intérieur de la cellule grâce aux microtubules, tout

en devenant de plus en plus acide. A ce stade, ils sont appelés endosomes tardifs (« late endosomes ») ou « multivesicular body » (MVB). Les récepteurs destinés à la dégradation sont accumulés dans le(s) MVB qui fusionne(nt) par la suite avec les lysosomes, où ils sont alors hydrolysés par les enzymes lysosomales.

I.2.c. Le rôle des protéines Rab.

La famille des protéines Rab est composée d'un grand nombre de membres (11 chez la levure et plus de 60 chez les mammifères (Grosshans BL *et al.* 2006)). Ces protéines sont de petites GTPases impliquées dans l'adressage des CCV, dans les échanges de vésicules entre les différents types d'endosomes et dans les phénomènes de fusion membranaire (Rosenfeld J *et al.* 2002) (Figure 18). Ce sont également d'excellents marqueurs cellulaires des endosomes car ceux-ci sont caractérisés par une combinaison particulière de protéines Rab. L'utilisation de mutants des protéines Rab dans les années 90 a permis une avancée spectaculaire dans la compréhension du processus d'internalisation.



« recycling endosomes ». Rab7 est caractéristique des MVB et participe à leur fusion avec le compartiment lysosomal (Figure 18).

- Formation et devenir des CCV (et des récepteurs internalisés) -

- Les récepteurs hormonaux sont internalisés à partir de structures membranaires spécialisées, les puits recouverts de clathrine (CCP). Les CCP sont principalement composés d'oligomères de clathrine, organisés en triskèles permettant la déformation de la membrane plasmique, et des complexes AP-2 permettant entre autres la stabilisation des triskèles de clathrine. Ces deux protéines permettent également le recrutement de protéines auxiliaires indispensables au processus d'endocytose.

- L'invagination progressive des CCP conduit à la formation des vésicules à clathrine (CCV) grâce notamment à la dynamine, une GTPase interagissant avec la base de la vésicule en formation et permettant son détachement de la membrane plasmique en participant au phénomène de fission membranaire.

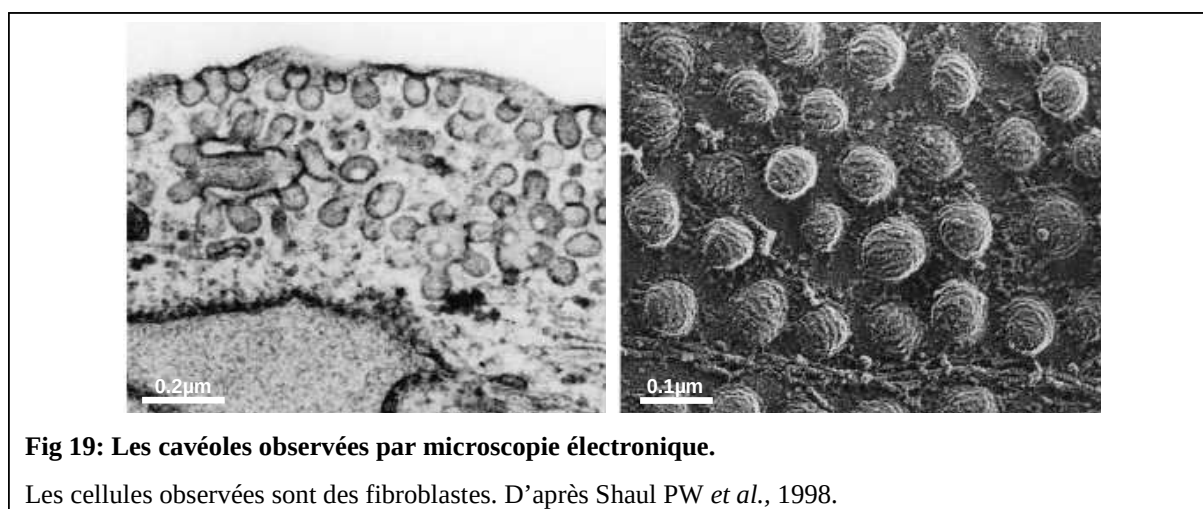
- Une fois formées, les CCV perdent leur manteau de clathrine et fusionnent avec les « sorting endosomes », un compartiment intracellulaire localisé à proximité de la membrane plasmique et caractérisé par un pH interne acide provoquant la dissociation du complexe hormone/récepteur.

- Les récepteurs localisés au niveau des « sorting endosomes » peuvent alors être recyclés vers la membrane plasmique ou dégradés. Le recyclage des récepteurs s'effectue directement à partir des « sorting endosomes » ou *via* les « recycling endosomes ». La dégradation des récepteurs est associée à la maturation des « sorting endosomes » en « late endosomes » qui fusionnent par la suite avec les lysosomes.

- Les protéines Rab, de petites GTPases impliquées dans les phénomènes de fusion membranaire, participent à l'adressage des CCV et aux échanges de vésicules entre les différents types d'endosomes. Ce sont des éléments clés des différentes étapes du processus d'internalisation.

II. Internalisation *via* la voie des cavéoles.

Les cavéoles sont de petites vésicules de 50 à 80 nm de diamètre identifiées pour la première fois en microscopie électronique dans les années 50 par l'équipe de Georges Palade (Figure 19). Ces structures lipidiques localisées au niveau de la membrane plasmique sont particulièrement riches en cholestérol et glycosphingolipides. Elles sont retrouvées dans l'ensemble des cellules de l'organisme, à l'exception des lymphocytes et neuroblastes, et sont particulièrement nombreuses dans les cellules endothéliales.



Même si l'existence des cavéoles est connue depuis plus de 50 ans, leurs fonctions et la mécanistique de leur formation sont encore mal définies. Elles sont impliquées dans le processus de transcytose (transport à travers une cellule) dans les cellules endothéliales. Leur capacité d'endocytose est moins bien décrite que dans le cas de la clathrine, bien que des récepteurs et de nombreuses molécules de signalisation soient présents à leur niveau.

II.1. La cavéoline et la formation des cavéoles.

Les cavéoles possèdent un manteau strié sur leur face cytoplasmique (côté externe) (Figure 19). Ce manteau est composé de protéines membranaires dont la cavéoline (Rothberg KG *et al.* 1992). A l'heure actuelle, quatre isoformes de cavéoline ont été décrites chez les mammifères (1 α , 1 β , 2, 3). Les cavéolines 1 et 2 sont exprimées de façon ubiquitaire tandis que la cavéoline 3 est principalement exprimée dans les cellules musculaires.

La cavéoline 1 est la plus importante d'un point de vue fonctionnel, la cavéoline 2 ne semblant tenir qu'un rôle de co-activateur de la cavéoline 1. Au niveau des cavéoles, la cavéoline 1 est la plus représentée et possède de nombreux motifs d'interaction avec les autres constituants protéiques et lipidiques des cavéoles. La structure des cavéoles est le résultat d'une étroite collaboration entre les molécules de cholestérol membranaires et les cavéolines, le cholestérol interagissant avec les oligomères de cavéolines afin de les stabiliser (Li S *et al.* 1996; Uittenbogaard A *et al.* 1998).

Contrairement aux vésicules de clathrine, les cavéoles sont préformées au niveau de l'appareil de Golgi puis adressées vers la membrane plasmique (Dupree P *et al.* 1993).

II.2. Devenir des cavéoles.

Le processus de fission membranaire, permettant la séparation des cavéoles de la membrane plasmique, fait intervenir les membres de la famille dynamine et notamment Dyn-2 (Henley JR *et al.* 1998). De plus chez *Drosophila melanogaster*, l'homologue de Dyn-1, *shibire*, participe à l'internalisation indépendante de la clathrine (Kessell I *et al.* 1989). La transfection *in vitro* du mutant de la dynamine-1 K44A dans des cellules de mammifères inhibe l'endocytose des cavéoles (Oh P *et al.* 1998).

Une fois endocytées, les cavéoles pénètrent dans le cytoplasme le long des microtubules et fusionnent avec le cavéosome, un compartiment membranaire localisé en périphérie des cellules (Pelkmans L *et al.* 2001). Ce compartiment intracellulaire possède un pH interne neutre, si bien que les éléments internalisés *via* la voie des cavéoles ne sont pas dégradés. La voie empruntée ensuite par les éléments internalisés et accumulés au niveau du/des cavéosome(s) est pour l'instant mal définie. Des vésicules sont émises à partir du cavéosome vers d'autres compartiments intracellulaires comme le réticulum endoplasmique, les mitochondries, le noyau... Il existerait également une relation vésiculaire entre les cavéosomes et les endosomes de la voie dépendante de la clathrine (Katzmann D *et al.* 2002).

II.3. Rôles du système cavéolaire d'endocytose.

Dans la plupart des cellules, à l'état basal, le système cavéolaire est très peu dynamique (Thomsen P *et al.* 2002). L'endocytose *via* les cavéoles est activée par stimulation. Les cavéoles sont également le principal système de pénétration dans les cellules des virus (cas du SV40 par exemple) et de certaines toxines bactériennes (Pelkmans L *et al.* 2001).

Le rôle des cavéoles dans l'internalisation des récepteurs hormonaux reste à l'heure actuelle mal défini. De nombreux récepteurs sont localisés dans les cavéoles ; c'est le cas par exemple des récepteurs des cytokines TGF β , INF γ et GH (Sadir R *et al.* 2001; Di Guglielmo GM *et al.* 2003). La surexpression de cavéoline 1, dans un modèle de cellules CHO transfectées avec GH-R, augmente significativement l'internalisation de la GH (Lobie PE *et al.* 1999). Dans ce cas particulier, l'internalisation *via* les cavéoles permet l'apport de GH extracellulaire et de son récepteur, tous deux non dégradés, à des compartiments intracellulaires, et notamment au noyau dans lequel la GH extracellulaire est accumulée (Lobie PE *et al.* 1994; Perret-Vivancos C *et al.* 2006). L'importance potentielle de

l'internalisation *via* les cavéoles dans la fonction biologique d'autres cytokines comme la leptine reste donc d'actualité.

- Internalisation des récepteurs hormonaux par les voies des cavéoles -

- Les cavéoles sont de petites invaginations de la membrane plasmique composées principalement de cavéoline, une protéine permettant la stabilisation de ces structures, l'interaction avec les protéines auxiliaires impliquées dans le processus d'endocytose et les composants lipidiques (notamment le cholestérol) de la membrane plasmique.

- Comme dans le cas des CCV, le phénomène de fission membranaire permettant la séparation des cavéoles de la membrane plasmique est dépendant de la dynamine. Une fois internalisées, les cavéoles fusionnent avec le cavéosome, un compartiment intracellulaire de pH interne neutre n'altérant pas le complexe hormone-récepteur.

- L'internalisation des récepteurs hormonaux par la voie des cavéoles est encore mal décrite à l'heure actuelle. Cette voie d'endocytose pourrait permettre l'apport d'hormones biologiquement actives à des compartiments intracellulaires comme le noyau par exemple.

III. Internalisation du récepteur de la leptine.

La grande majorité des récepteurs de cytokines est internalisée d'une manière dépendante du ligand, *via* la voie d'endocytose des vésicules de clathrine. Les récepteurs internalisés sont ensuite recyclés vers la membrane plasmique ou dégradés. Ces processus contribuent à la sensibilité des cellules aux effets d'une hormone. La leptine ne fait pas exception et son action biologique est fortement dépendante de l'internalisation de ObR au niveau de ses cellules cibles. Cependant, malgré l'importance physiologique de la leptine, relativement peu d'études ont été réalisées dans ce domaine. Au commencement de cette thèse, seuls deux articles importants avaient été publiés, ouvrant un large champ d'étude (Barr VA *et al.* 1999; Uotani S *et al.* 1999). Depuis, de nouvelles données ont été publiées par l'équipe de Rouillé, permettant une meilleure compréhension du processus d'internalisation de ObR mais soulevant également de nombreuses interrogations (Belouzard S *et al.* 2004).

III.1. La cinétique d'internalisation et d'adressage à la membrane plasmique de ObR.

L'ensemble des données publiées rapporte que ObR est internalisé par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Ainsi, l'utilisation d'un milieu hypertonique (sucrose 0,5 M) empêchant l'invagination totale des CCP, inhibe l'internalisation de leptine radio-marquée *in vitro* (Carpentier J *et al.* 1989; Uotani S *et al.* 1999). L'internalisation des différentes isoformes du récepteur de la leptine *via* la voie des cavéoles n'a pas été étudiée pour l'instant.

Concernant la cinétique d'internalisation de la leptine et de son récepteur, il existe des divergences selon les différentes isoformes d'ObR, les modèles cellulaires et les protocoles expérimentaux utilisés. Ainsi, dans un modèle de cellules CHO transfectées avec ObR, la cinétique d'internalisation est identique pour les isoformes ObRa et ObRb, avec environ 10% de la leptine radio-marquée, initialement fixée à la surface cellulaire, internalisée en 15 minutes (Uotani S *et al.* 1999). Dans un modèle de cellules HeLa transfectées, ObRa et ObRb s'internalisent tous deux à la même vitesse, avec 20% de leptine internalisée en 10 minutes (Belouzard S *et al.* 2004). Dans un modèle de cellules COS-7 transfectées avec ObR, 15% de la leptine est internalisée en 20 minutes *via* ObRa, contre 25% *via* ObRb (Barr VA *et al.* 1999). Malgré ces différences, il faut noter que l'internalisation de la leptine *in vitro* *via* ObRa ou ObRb, est légèrement plus lente que d'autres cytokines comme la GH, l'IL-6 et la prolactine (Dittrich E *et al.* 1994; Genty N *et al.* 1994; Allevato G *et al.* 1995).

Dans les cellules HeLa transfectées avec ObR, les récepteurs ObRa néosynthétisés atteignent la membrane plasmique en 30 minutes. Le d'ObRa néosynthétisés localisés à la surface cellulaire est maximal à 1 heure puis diminue. ObRb est adressé à la membrane plasmique plus rapidement, avec un nombre de récepteurs néosynthétisés localisés à la membrane plasmique supérieur et maximal à 30 minutes (Belouzard S *et al.* 2004).

III.2. Les signaux d'internalisation.

Par analyse de séquence, aucun signal d'internalisation classique (motifs dileucine DXXLL, ou tyrosine NPxY et YxxΦ (Bonifacino JS et Traub LM 2003)) n'a été découvert dans le domaine cytoplasmique du récepteur de la leptine (Uotani S *et al.* 1999; Belouzard S *et al.* 2004). L'étude de mutants par délétion de ObRa et ObRb a permis d'identifier la zone localisée entre les acides aminés 8 et 29 du domaine cytoplasmique comme importante (mais pas indispensable) pour l'internalisation de ObR (Uotani S *et al.* 1999). Ces données

suggèrent que le récepteur de la leptine possède un nouveau motif d'internalisation encore non identifié.

La mutation de la boîte 1 du récepteur de la leptine (le site d'interaction de JAK2) ne modifie pas sa cinétique d'internalisation, suggérant que son activation par la leptine n'est pas nécessaire pour son internalisation (Uotani S *et al.* 1999). Dans certains cas, l'ubiquitynation des récepteurs à la membrane plasmique peut être considérée comme un motif d'internalisation à part entière (Bonifacino JS et Traub LM 2003). Dans le cas du récepteur de la leptine, les isoformes ObRa et ObRb sont ubiquitynées au niveau de leur queue cytoplasmique, mais concernant le processus d'internalisation, cette ubiquitylation n'est nécessaire que dans le cas de l'isoforme ObRa (Belouzard S et Rouille Y 2006).

III.3. Le mode d'internalisation de ObR.

En 2004, l'équipe de Rouillé a montré pour la première fois, dans un modèle de cellules HeLa transfectées, que l'internalisation de ObRa et ObRb est constitutive, c'est-à-dire que les récepteurs ObRa et ObRb localisés au niveau de la membrane plasmique peuvent être internalisés en absence de leptine (Belouzard S *et al.* 2004). De plus, cette internalisation semble totalement indépendante de la leptine, puisque la présence ou l'absence de leptine ne modifie pas la vitesse d'internalisation de ObRa et ObRb (Belouzard S *et al.* 2004).

Ce résultat est surprenant car il est très rare qu'un récepteur de cytokines soit internalisé de manière totalement constitutive, sans influence du ligand. De plus les précédentes études réalisées n'avaient pas mises en évidence un tel mécanisme. Au contraire, l'équipe de Flier a montré que le nombre de récepteurs ObRa et ObRb localisés à la surface cellulaire diminue suite à une stimulation par la leptine (Uotani S *et al.* 1999). La réalité de ce processus d'internalisation constitutive sera discutée dans la partie résultats-discussion en intégrant nos propres résultats.

III.4. Recyclage et dégradation.

Une fois internalisé *via* la voie dépendante de la clathrine, le récepteur de la leptine peut potentiellement être dégradé ou recyclé vers la membrane plasmique. L'ensemble des données publiées montre que ObR et son ligand sont dégradés dans le compartiment lysosomal (Barr VA *et al.* 1999; Uotani S *et al.* 1999; Belouzard S *et al.* 2004). *In vitro*, dans un modèle de cellules CHO transfectées, ObRa induit une dégradation de la leptine supérieure à ObRb, malgré une cinétique d'internalisation de ces deux isoformes identique dans ce

modèle expérimental (Uotani S *et al.* 1999). Cependant, dans un modèle de cellules COS-7 transfectées, ObRb est plus rapidement transporté dans les lysosomes (Barr VA *et al.* 1999).

Les études de co-localisation avec les protéines Rab spécifiques des vésicules de recyclage et des « recycling endosomes », n'ont pas permis de mettre en évidence un processus de recyclage de ObR (Barr VA *et al.* 1999; Belouzard S *et al.* 2004). Ces résultats suggèrent que la grande majorité des récepteurs de la leptine localisés au niveau de la membrane plasmique provient de récepteurs néosynthétisés.

III.5. Localisation intracellulaire de ObR.

In vitro, dans les différents modèles cellulaires, ObRa et ObRb sont localisés principalement au niveau de l'appareil de Golgi et du « Trans Golgi Network » (Golgi / TGN, en présence ou absence de leptine (Barr VA *et al.* 1999; Belouzard S *et al.* 2004). De la même manière, *in vivo*, ObRb est localisé principalement au niveau de l'appareil de Golgi des corps cellulaires des neurones hypothalamiques (Diano S *et al.* 1998; Baskin DG *et al.* 1999).

Ces pools intracellulaires de ObR correspondent principalement à une accumulation de récepteurs néosynthétisés. En effet, dans les cellules COS-7 transfectées, seuls 25% des récepteurs ObRa ou ObRb synthétisés sont adressés à la membrane plasmique, les autres étant dégradés (Barr VA *et al.* 1999). Dans les cellules HeLa, ce chiffre est d'environ 50% (Belouzard S *et al.* 2004). C'est le domaine transmembranaire de ObR qui est impliqué dans son adressage vers la membrane plasmique et son accumulation intracellulaire. Une mutation de ce domaine peut entraîner une augmentation du transport de ObR vers la surface cellulaire (Belouzard S *et al.* 2004).

L'accumulation au niveau du Golgi peut correspondre à des récepteurs présentant des défauts (Lodish HF 1988). Dans le cas de ObR, cela ne semble pas être le cas, la leptine se liant de la même façon aux récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique et des pools intracellulaires (Barr VA *et al.* 1999). *In vitro*, une partie des récepteurs accumulés au niveau du Golgi / TGN est dégradée par les lysosomes avant d'atteindre la membrane plasmique (Belouzard S *et al.* 2004). Ce phénomène pourrait participer au mécanisme de contrôle qualité post-RE, permettant de dégrader les protéines présentant des défauts, et à la régulation du nombre de ObR localisés à la surface cellulaire (Fayadat L et Kopito RR 2003).

- Internalisation de ObR -

- Les isoformes ObRa et ObRb du récepteur de la leptine sont internalisées par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine, avec une cinétique d'internalisation relativement lente comparée à celle d'autres récepteurs de cytokine. Aucun signal d'internalisation caractéristique de ce type d'endocytose n'a cependant été découvert dans le domaine intracellulaire du récepteur.
- L'internalisation de ObR est constitutive et semble totalement indépendante de son interaction avec la leptine. Cependant, la stimulation par la leptine induit une baisse du nombre de ObR localisés à la surface cellulaire.
- ObR ne semble pas être recyclé vers la membrane plasmique suite à son internalisation, mais dégradé dans le compartiment lysosomal. Ainsi, les ObR localisés à la surface cellulaire correspondent à des récepteurs néosynthétisés.
- En présence ou absence de leptine, ObR est principalement localisé au niveau du Golgi/TGN. Ces pools intracellulaires correspondent à une accumulation / rétention de récepteurs néosynthétisés. Seule une partie des récepteurs ObRa et ObRb synthétisés est adressée à la membrane plasmique, l'autre étant dégradée. Ce mécanisme de rétention pourrait correspondre au contrôle de qualité post-RE et participe à la régulation du nombre de ObR localisés à la surface cellulaire.

IV. Internalisation et signalisation.

Initialement, l'internalisation était considérée comme un processus de terminaison de la signalisation induite par une hormone, en diminuant le nombre de récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique et en stimulant la dégradation de ces récepteurs. Cependant depuis quelques années, les données scientifiques collectées par différents laboratoires montrent que le processus d'endocytose participe également à la propagation des signaux intracellulaires. Il existe en effet une étroite relation entre l'internalisation des récepteurs et l'établissement des différentes voies de signalisation. Cette relation est bidirectionnelle, et des acteurs des voies de transduction du signal participent également à la régulation du processus d'internalisation. Cependant, nous nous intéresserons ici principalement à l'effet de l'internalisation sur la transduction du signal.

La majorité des études menées dans ce domaine a été réalisée dans le cadre des récepteurs à Tyrosine Kinase (RTK) et les récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG). Malheureusement peu d'études jusqu'à présent se sont focalisées sur la famille des récepteurs de cytokines. Il est important de préciser que la relation entre internalisation et signalisation est variable pour chaque récepteur (même au sein

de la même classe) et est fonction du modèle cellulaire d'étude. Ainsi, s'il faut considérer l'importance, dans le cas de chaque récepteur, de l'internalisation dans l'étude des voies de transduction activées en réponse à une hormone, toute généralisation est inenvisageable.

IV.1. Relation entre les composants des voies de signalisation et des vésicules à clathrine.

Plusieurs protéines impliquées dans le processus biochimique d'endocytose participent également aux différentes voies de signalisation. Ainsi la β -arrestine, qui intervient comme adaptateur entre la clathrine, le complexe AP-2 et les RCPG, interagit avec certains composants de la voie des MAPK (Src, Raf, ERK), et participe ainsi à la régulation de cette voie de transduction en permettant la formation et l'organisation de complexes protéiques de signalisation (Miller WE et Lefkowitz RJ 2001). La dynamine joue également un rôle prépondérant dans l'établissement des voies de signalisation. En effet cette protéine, par son domaine de liaison SH3 interagit avec les protéines possédant un domaine SH3 comme les protéines GRB2 et SOS impliquées dans la voie de signalisation des MAPK (Gout I *et al.* 1993; Baron V *et al.* 1998).

Ainsi, il faut imaginer les acteurs protéiques de l'endocytose comme un lien entre les récepteurs activés et certains composants des voies de signalisation, et les CCP et CCV comme de véritables complexes de signalisation.

IV.2 Signalisation au niveau des « sorting endosomes ».

Initialement la communauté scientifique s'accordait à dire que l'activation des récepteurs hormonaux membranaires et l'établissement des voies de signalisations prenaient place uniquement au niveau de la membrane plasmique. Depuis une dizaine d'années, plusieurs données supportent l'hypothèse selon laquelle des récepteurs internalisés peuvent également activer des voies de signalisation. C'est la théorie des « signaling endosomes » (Leof EB 2000).

Le complexe ligand-récepteur une fois internalisé dans les CCV rejoint les « sorting endosomes ». Le pH acide de ces compartiments intracellulaires est responsable de la dissociation du complexe ligand-récepteur et donc de l'inactivation du récepteur. Cependant, il a été démontré, dans le cas des RTK et RCPG, que le complexe ligand-récepteur n'est pas totalement dissocié dans les « sorting endosomes », et que des récepteurs activés sont toujours présents à ce niveau (Sorkin A *et al.* 1993; Baass PC *et al.* 1995; Pitcher JA *et al.* 1995).

De nombreuses protéines impliquées dans les voies de signalisation sont également présentes au niveau des « sorting endosomes » (Figure 20).

Proteins or protein complexes	Main functions in signalling	Detection methods of localization and interactions*	Endogenous/ epitope-tagged	Activated receptor	References
Grb2, SOS, Shc	Activation of Ras	IP, SF, IF, LC	+/+	EGF receptor, TrkA	54–56,150
CrkL, C3G, Gab2	Activation of Rap1	SF, IP	+/-	TrkA	68,69
IRS	Scaffold mediator of insulin-receptor signalling	SF	+/-	Insulin receptor	151
p120RasGAP	Regulation of Ras	IF, EM, SF, IP	+/-	EGF receptor	152
Eps8	Regulation of Rac and Rab5	IP	+/-	EGF receptor	150
Rap1	Activation of B-Raf	SF, IP, IF	+/-	TrkA	68
Ras	Activation of Raf, Ral, Rab5 and PI3K	LC, IF, SF	+/+	Constitutively; EGF receptor, insulin receptor	58–60
c-Raf/B-Raf	Activation of MEK	IP, SF, IF, LC	+/+	EGF receptor, TrkA	58,62,68,79
MEK	Activation of ERK/MAPK 1/2	IF, SF	+/-	EGF receptor, insulin receptor, GPCRs	58,62,66
ERK/MAPK1/2	Phosphorylation of transcription factors and cytosolic substrates	IF, IP, SF	+/-	Insulin and EGF receptors, TrkA, GPCRs	58,62,72,76,79
MP1	MAPK scaffold protein	IF, SF	+/-	Constitutively	67
PLC- γ 1	Ca ²⁺ signalling	IF, LC, IP	-/+ +/-	EGF receptor Trk A	46,153,154
p110 α PI3K	Production of PtdIns(3,4,5)P ₃	IF, SF	+/-	PDGF Insulin receptor	151,155
β -arrestin 1/2	Desensitization; activation of c-Src and MAPKs	LC, IF, SF	+/+	GPCRs	72
GRK	Desensitization	IF	-/+	GPCR δ -opioid	137
RGS-PX1 (SNX13)	Inactivation of heterotrimeric G protein	IF	-/+	Constitutive	156
c-Src	Tyrosine phosphorylation of multiple targets	IF, SF	+/-	Constitutive	97,157
JNK3, MKK4, Ask1	Phosphorylation of transcription factors and cytosolic substrates	IF	+/-	GPCRs	74

Fig 20: Protéines impliquées dans les voies de signalisation et localisées au niveau des « sorting endosomes ». D'après Sorkin A *et al.*, 2002.

C'est le cas des protéines GRB2, SOS et Ras, impliquées dans la voie des MAPK, qui sont localisées à la fois au niveau de la membrane plasmique et au niveau des « sorting endosomes » (Jiang X et Sorkin A 2002). L'activation de Ras se produit au niveau membranaire, et c'est une protéine Ras active qui est internalisée en même temps que le récepteur. La fonction de cette localisation de Ras active au niveau des « sorting endosomes » n'est pas clairement définie, mais semble indispensable pour maintenir l'activité de la voie MAPK sur un temps prolongé. D'autres protéines impliquées dans la voie des MAPK comme Raf, MEK et ERK sont également localisées au niveau des « sorting endosomes » (Pol A *et al.* 1998). Ainsi la présence de Ras au niveau de ces compartiments intracellulaires pourrait permettre le recrutement d'autres kinases de la voie MAPK, favorisant la formation de

véritables complexes de signalisation au niveau des « sorting endosomes », ceci par l'intermédiaire de protéines d'échafaudage encore non identifiées (Wunderlich W *et al.* 2001).

Les protéines IRS et PI3K sont également présentes au niveau des « sorting endosomes » (Kelly KL et Ruderman NB 1993). Cette localisation est somme toute logique dans le cas des IRS car ces protéines interagissent directement avec les récepteurs activés (dans le cas du récepteur de l'insuline en tout cas), mais plus curieuse pour PI3K car son substrat est localisé au niveau de la membrane plasmique. La protéine Rab5 impliquée dans la formation des CCV et leur adressage vers les « sorting endosomes », joue également un rôle dans l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K (Zerial M et McBride H 2001).

La protéine STAT3 active est également présente au niveau des « sorting endosomes ». Dans le cas du récepteur de l'IL-6, l'activation optimale de STAT3 est dépendante de son internalisation (Shah M *et al.* 2006).

IV.3. Internalisation et activation spécifique des voies de signalisation.

Comme nous venons de le voir, de nombreuses protéines impliquées dans les voies de signalisation activées notamment par la leptine sont localisées au niveau des « sorting endosomes ». Mais quelle est la réalité physiologique de cette localisation et l'impact véritable du processus d'internalisation sur l'établissement des différentes voies de transduction du signal ?

L'internalisation des récepteurs peut permettre d'établir une spécificité supplémentaire dans l'activation des différentes voies de transduction du signal en transportant des complexes de signalisation vers des localisations intracellulaires spécifiques. En effet, les protéines ne sont pas localisées au hasard dans le cytosol mais organisées dans des régions spécifiques, cette spécificité jouant un rôle important dans la réponse cellulaire à un ligand.

Dans le cas de la voie des MAPK par exemple, les protéines ERK une fois activées subissent une translocation nucléaire où elles agissent notamment sur la prolifération et la différenciation cellulaires. Mais les protéines ERK actives peuvent également demeurer dans le cytosol où elles ont d'autres actions biologiques. Ces deux devenir différents des protéines ERK activées impliquent les vésicules d'endocytose. Les protéines ERK localisées au niveau des endosomes, si elles restent associées avec ces vésicules une fois activées, peuvent alors être transportées vers des localisations subcellulaires précises *via* le transport vésiculaire. C'est le cas du récepteur RCPG PAR2, qui une fois activé et internalisé dans les « sorting endosomes » recrute des protéines formant un complexe multiprotéique empêchant la

translocation de ERK activée dans le noyau (Figure 21) (DeFea KA *et al.* 2000). Dans le cas d'autres RCPG, un tel complexe multiprotéique existe également au niveau des « sorting endosomes », mais ERK peut s'en séparer et être transloqué dans le noyau.

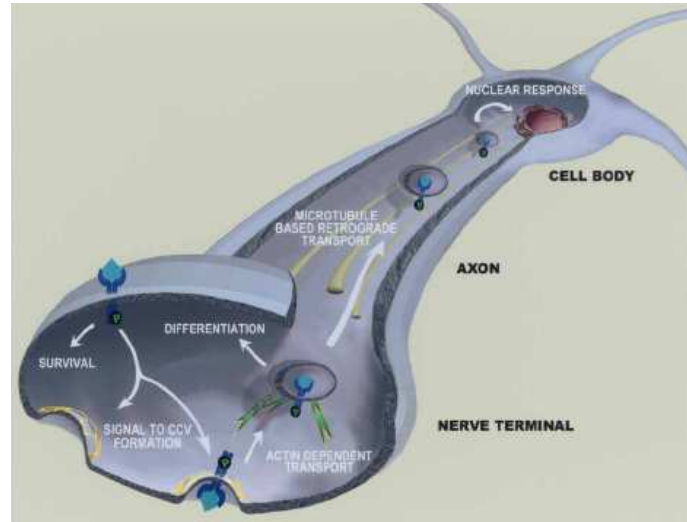


Fig 21: Exemple de signalisation au niveau des endosomes: l'effet du NGF.

D'après McPherson PS *et al.*, 2001.

Un autre exemple de l'influence de l'internalisation sur la spécificité des réponses cellulaires, est le cas de la réponse des cellules neuronales PC12 à une stimulation par le facteur de croissance NGF (Figure 21). Dans ce cas, le NGF induit à la fois un processus de survie (*via* PI3K et Akt) et de différenciation. En provoquant l'inhibition du processus d'internalisation, l'action du NGF sur la survie cellulaire est augmentée tandis que son action sur la différenciation est inhibée (Zhang Y-z *et al.* 2000). Ainsi, dans le même contexte cellulaire, un même ligand agissant sur un même récepteur peut induire différentes réponses biologiques, selon que celui-ci est localisé au niveau de la membrane plasmique ou internalisé.

Les données précédentes montrent bien l'importance d'un processus d'internalisation sans faille dans les réponses cellulaires aux différents stimuli. La dérégulation de l'internalisation d'un récepteur peut entraîner de nombreuses complications physiologiques. Ainsi dans le cas des cellules cancéreuses, des récepteurs aux facteurs de croissances sont caractérisés par une internalisation « ralentie » ou accélérée entraînant un déséquilibre des voies de signalisation.

Dans le cas des récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs aux LDL, DAB-1 est une protéine adaptatrice impliquée dans le processus d'internalisation et dans l'établissement des voies de signalisation. Une altération de la fonction de DAB-1 au niveau des cellules neuronales peut entraîner de graves pathologies (altération de la migration des neurones dans le cerveau) (Morris SM et Cooper JA 2001).

Dans le cas de l'obésité, l'exposition prolongée à de fortes concentrations plasmatiques en leptine pourrait entraîner à terme une modification du processus d'internalisation du récepteur de la leptine et ainsi entraîner une altération des voies de signalisation activées par la leptine. Nous discuterons de cette hypothèse dans la partie Résultats-Discussion.

- Relation entre internalisation et signalisation -

- **L'internalisation n'est pas simplement un mécanisme de terminaison de la signalisation induite par une hormone. Il existe en effet une étroite relation entre l'internalisation d'un récepteur et l'établissement des différentes voies de signalisation sous-jacentes.**
- **Certaines protéines, comme la dynamine et la β -arrestine, impliquées dans le processus d'endocytose, participent également aux différentes voies de signalisation. Elles permettent de faire le lien entre le récepteur activé et certains composants des voies de transduction du signal.**
- **Plusieurs études ont démontré que des récepteurs actifs sont présents au niveau des « sorting endosomes », malgré le pH acide de ce compartiment. De nombreuses protéines impliquées dans les différentes voies de signalisation sont également présentes au niveau des « sorting endosomes », dont des composants de la voie des MAPK, les protéines IRS et PI3K, et la protéine STAT3. Les « sorting endosomes » sont le siège de véritables complexes de signalisation.**
- **L'internalisation des récepteurs vers les « sorting endosomes » permet d'engendrer une sélectivité des voies de transduction du signal activées. Ainsi, plusieurs exemples montrent que la signalisation induite par un récepteur activé est différente selon la localisation de celui-ci, au niveau de la membrane plasmique ou au niveau des endosomes. L'internalisation participe pleinement à la réponse biologique induite par un ligand, et la dérégulation de ce processus cellulaire peut être associée à des pathologies.**

CHAPITRE 3 : Les fonctions physiologiques de la leptine.

La vision initiale de la leptine en tant que simple cytokine adipocytaire régulant la balance énergétique au niveau central a évolué. En effet, les profils d'expression de la leptine et de son récepteur ont été étendus à de nouveaux tissus, et de nouvelles fonctions de cette hormone ont été découvertes. Ainsi, la leptine est impliquée dans de nombreux processus physiologiques comme la reproduction, le développement, la réponse immunitaire, la contraction cardiaque... Néanmoins les effets de la leptine au sein de ces processus sont toujours liés au statut métabolique de l'organisme.

Dans cette partie, nous nous intéresserons principalement à l'action de la leptine sur le contrôle de la balance énergétique. Nous décrirons ensuite plus brièvement son rôle dans la fonction cardiaque qui a fait l'objet d'un travail de recherche en collaboration durant cette thèse.

I. La régulation de la balance énergétique.

Il existe une régulation fine de la balance énergétique, équilibre entre prise alimentaire et dépense énergétique (activité physique, métabolisme basal, thermogénèse adaptative). Bien que dans nos sociétés modernes, la prise alimentaire d'un individu soit influencée par de nombreux paramètres non biologiques et dépendants de facteurs sociaux, le corps humain se repose sur un solide système physiologique pour établir l'homéostasie énergétique, indispensable pour vivre en bonne santé. En effet, des altérations et déséquilibres de cette homéostasie entraînent le développement de pathologies graves telles que l'anorexie, l'obésité et le diabète de type II.

La régulation de la balance énergétique s'appuie sur des signaux périphériques, nerveux, endocrines ou métaboliques, intégrés au niveau central permettant ainsi une réponse adaptative. Le système nerveux central (SNC) régule la balance énergétique principalement par trois mécanismes principaux :

- en influençant le comportement (prise alimentaire, activité physique).
- en régulant le système nerveux autonome (dépense énergétique : métabolisme basal, thermogénèse adaptative).
- en régulant le système neuro-endocrinien et la sécrétion d'hormones (prise alimentaire, métabolisme basal, thermogénèse adaptative).

L'acteur principal du maintien de l'homéostasie énergétique au niveau central est l'hypothalamus. Le système de régulation implique des circuits neuronaux complexes entre les différents noyaux hypothalamiques, communiquant par l'intermédiaire de neuropeptides qui tiennent le rôle de neurotransmetteurs. Ces neuropeptides peuvent être classés en deux catégories : les neuropeptides orexinogènes qui stimulent la prise alimentaire et inhibent les dépenses énergétiques (neuropeptides anaboliques) et les neuropeptides anorexigènes qui à l'inverse inhibent la prise alimentaire et stimulent les dépenses énergétiques (neuropeptides cataboliques).

I.1. Les signaux périphériques.

I.1.a. La leptine et l'insuline.

Ces deux hormones peuvent être considérées comme des « signaux d'adiposité » permettant entre autres de réguler la balance énergétique en agissant au niveau central ou périphérique.

Comme nous l'avons vu précédemment, la leptine est une hormone peptidique sécrétée principalement par le tissu adipeux. C'est un facteur de satiété, et le jeûne prolongé induit une suppression des taux plasmatiques de la leptine, phénomène qui peut être contrecarré par une prise alimentaire. Les taux plasmatiques de leptine sont corrélés aux niveaux de masse adipeuse et sont donc fortement augmentés en cas de surpoids et dans la pathologie obésité. L'injection au niveau central de leptine dans des modèles murins induit une baisse de la prise alimentaire ainsi qu'une augmentation des dépenses énergétiques.

La concentration plasmatique d'insuline dont le rôle principal est de contrôler le taux de glucose sanguin, reflète également les niveaux de masse adipeuse de l'organisme. La leptine et l'insuline régulent mutuellement leur sécrétion et agissent de concert dans le contrôle de l'homéostasie énergétique au niveau central. L'insuline agit essentiellement sur la régulation de la prise alimentaire. Ainsi sa concentration plasmatique augmente très rapidement à la suite d'un repas et l'injection centrale d'insuline réduit la prise alimentaire ainsi que le poids total de l'organisme chez les rongeurs (Woods S *et al.* 1979).

I.1.b. Autres signaux périphériques.

Nous n'en citerons que trois parmi les plus importants.

L'Adiponectine :

L'adiponectine est une hormone sécrétée par le tissu adipeux, et sa concentration plasmatique est inversement proportionnelle aux niveaux de masse adipeuse de l'organisme et réduite par le jeûne (Dani *et al.* 1996). L'injection intra-péritonéale d'adiponectine chez les rongeurs induit une baisse de poids total en stimulant la dépense énergétique mais sans influencer la prise alimentaire (Fruebis J *et al.* 2001). Au niveau central, l'action de cette hormone adipocytaire semble relayée par le noyau hypothalamique paraventriculaire (PVN) et le système mélanocortine (Gao Q *et al.* 2004).

Le Peptide YY₃₋₃₆ » (PYY₃₋₃₆) :

Ce peptide est synthétisé par les cellules du tube digestif et de l'intestin. Sa sécrétion postprandiale est dépendante de la quantité de calories ingérées au cours du repas (Pedersen-Bjergaard U 1996). Le PYY₃₋₃₆ a suscité un grand intérêt en 2001 quand l'équipe de Bloom a montré que son injection réduit la prise alimentaire spontanée d'environ 30%, chez les individus sains et obèses (Wren AM *et al.* 2001). Cependant ces résultats ont été la cible de nombreuses critiques.

La ghréline :

La ghréline est sécrétée principalement par l'estomac. A l'origine, cette hormone était considérée uniquement comme un sécrétagogue de l'hormone de croissance. Cependant, la communauté scientifique s'est rapidement rendue compte de l'effet orexigénique de la ghréline au niveau central. Ainsi, son injection ICV chez les rongeurs augmente la prise alimentaire et le poids total de l'organisme. Nous décrirons plus en détail cette hormone dans le chapitre consacré à l'hormone de croissance.

I.2. La leptine et le passage de la barrière hémato-encéphalique.

Contrairement aux capillaires des autres tissus, à l'exception du testicule et du thymus, les cellules endothéliales du SNC formant la barrière hémato-encéphalique (BHE) sont reliées entre elles par de nombreuses jonctions serrées et sont dépourvues de canaux trans-endothéliaux permettant le passage passif de molécules. Le transport d'une protéine à travers la BHE est proportionnelle à sa solubilité dans les lipides et inversement proportionnelle à son poids moléculaire.

Chez le rat, suite à l'injection périphérique de leptine radio-marquée, un marquage est observé dans des zones spécifiques du cerveau notamment au niveau du noyau arqué hypothalamique et du plexus choroïde. Ces deux structures sont des organes circumventriculaires et sont proches physiquement de la BHE (Banks WA *et al.* 1996). Le transport de la leptine à travers la BHE est un processus actif, saturable et finement régulé et n'induit pas de dégradation de cette hormone. Comme nous l'avons vu, ce sont les isoformes ObRa et ObRc fortement exprimées au niveau des micro-vaisseaux cérébraux et du plexus choroïde, qui sont les principaux acteurs de ce transport (Banks WA *et al.* 1996; Bjorbaek C *et al.* 1998b).

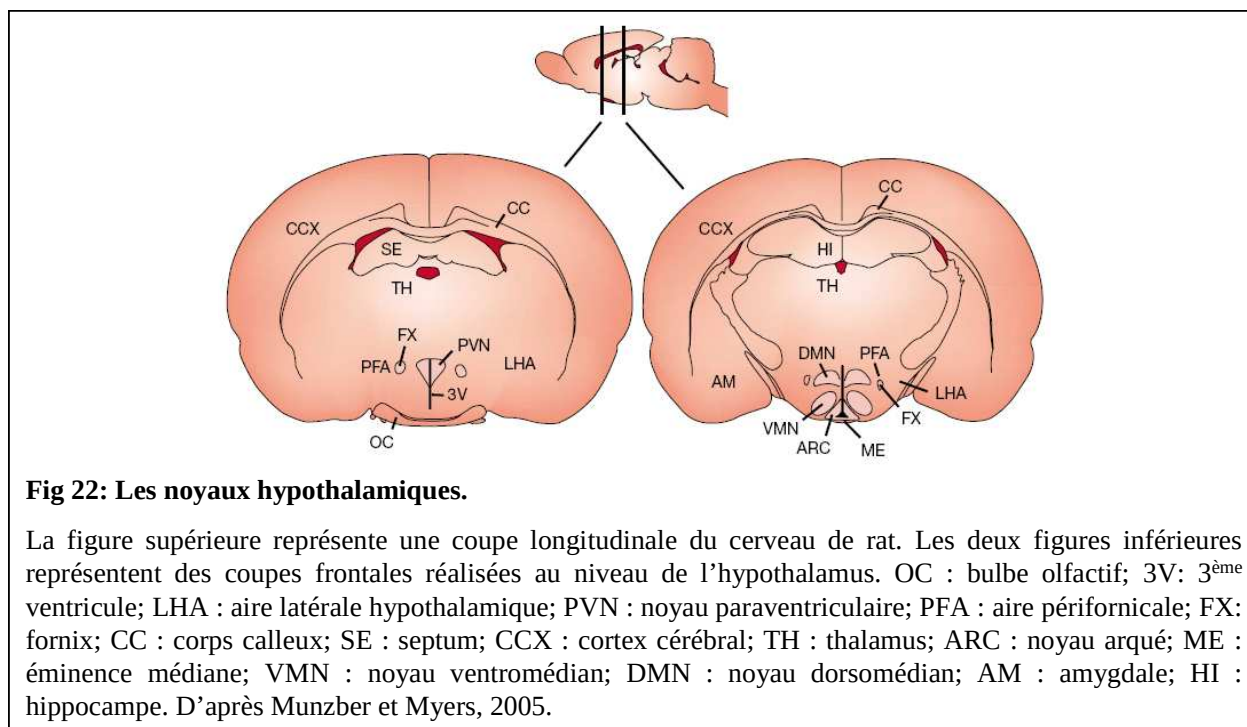
Il existe une forte corrélation entre l'efficacité du transport de la leptine à travers la BHE et sa concentration plasmatique. Ainsi chez le rat, ce transport est réduit en période de jeûne (niveau plasmatique de leptine faible) et augmenté lors de la prise alimentaire (Kastin AJ et Akerstrom V 2000). Ce mécanisme pourrait permettre d'amplifier le signal de satiété induit par la leptine. Lors de concentrations plasmatiques de leptine très élevées (obésité sévère), le transport à travers la BHE est fortement diminué impliquant ce mécanisme dans le phénomène de résistance à la leptine (Banks WA *et al.* 1999). De la même manière ce transport est perturbé dans les cas d'anorexie (Mantzoros C *et al.* 1997).

I.3. La leptine et le système des neuropeptides hypothalamiques.

L'hypothalamus permet l'intégration des signaux d'adiposité comme la leptine et l'insuline, et l'activation en retour d'un ensemble de neuropeptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. Ces neuropeptides et les neurones les synthétisant interagissent entre eux selon le modèle suivant : le noyau arqué de l'hypothalamus (ARC) (Figure 22) est la base de ce circuit neuronal et contient deux populations distinctes de neurones anorexigènes et orexigènes. Ces neurones sont dits de « premier ordre » (synthétisent les neuropeptides de premier ordre) car ils traduisent directement, selon le modèle proposé, les signaux d'adiposité en signaux nerveux. Grâce à leurs nombreuses projections neuronales, ils transmettent ces informations aux autres noyaux hypothalamiques (Figure 22) dans lesquels sont localisés les neurones de « second ordre » (synthétisent les neuropeptides de second ordre).

Le but de ce chapitre n'est pas de fournir une liste exhaustive des neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation du métabolisme. Nous décrirons les plus importants et leurs caractéristiques principales. Ces données permettront de mieux

appréhender les modèles animaux utilisés au cours de mon travail de thèse. De plus, certains neuropeptides interviennent également dans le contrôle de l'axe GH. Une étude bibliographique plus précise concernant ces neuropeptides est disponible dans l'annexe de ce manuscrit.



I.3.a. Les neuropeptides orexigènes de premier ordre.

Le neuropeptide Y (NPY).

Dans l'hypothalamus, le NPY est principalement exprimé au niveau de l'ARC. L'expression et la libération de NPY sont stimulées par le jeûne et inhibées par la prise alimentaire (Sanacora G *et al.* 1990). Chez les rongeurs, sa synthèse au niveau de l'ARC est inhibée par l'insuline et la leptine (Schwartz MW *et al.* 1991; Stephens TW *et al.* 1995). Chez le rat et la souris, l'injection intra-cérébro-ventriculaire (ICV) de NPY augmente la prise alimentaire (Glenn Stanley B *et al.* 1986), diminue la dépense énergétique en réduisant la thermogénèse (Billington CJ *et al.* 1991) et l'activité du système nerveux autonome (Egawa M *et al.* 1991). L'injection ICV répétée de NPY induit l'obésité chez le rat (Zarjevski N *et al.* 1993).

Chez les rats obèses Zucker, l'expression de NPY est augmentée au niveau de l'ARC (Beck B *et al.* 1990). Chez l'homme cependant, son expression ne semble pas être affectée

dans les cas d'obésité bien que quelques études témoignent d'une augmentation (Brunani A *et al.* 1995; Nam S-Y *et al.* 2001).

Le « Agouti Related Peptide » (AgRP).

Au niveau du SNC, AgRP est principalement exprimé au niveau de l'ARC (Shutter JR *et al.* 1997). L'injection ICV d'AgRP induit une augmentation de la prise alimentaire pouvant durer jusqu'à sept jours (Rossi M *et al.* 1998). Les souris génétiquement modifiées pour surexprimer AgRP sont hyperphagiques et fortement obèses (Graham M *et al.* 1997). L'expression et la sécrétion d'AgRP sont stimulées par le jeûne et inhibées par la prise alimentaire, la leptine, l'insuline et le glucose (Mizuno TM *et al.* 1999; Morrison CD *et al.* 2005). Les rats rendus obèses par l'alimentation (rats DIO) présentent une augmentation de la concentration d'AgRP au niveau hypothalamique (Harrold JA *et al.* 1999).

En plus de son rôle dans la prise alimentaire, AgRP influence négativement la dépense énergétique. Ainsi son injection ICV inhibe l'expression de UCP1 (« uncoupling protein 1 ») dans le tissu adipeux brun (Yasuda T *et al.* 2004).

I.3.b. Les neuropeptides orexigènes de second ordre.

Les orexines ou hypocretines.

La famille des orexines est composée de deux peptides, orexine A et orexine B, issus du clivage protéolytique du précurseur prépro-orexine. Les neurones synthétisant les orexines sont principalement localisés dans l'aire hypothalamique latérale (LHA) et l'aire périfornicale (PFA).

L'expression hypothalamique de la prépro-orexine est augmentée par un jeûne complet de 48 heures mais n'est pas affectée par une prise alimentaire simplement réduite (Cai XJ *et al.* 1999). Chez le rat, l'injection ICV d'orexine A induit une augmentation de la prise alimentaire (à court terme) tandis que celle d'orexine B ne la modifie pas (Haynes AC *et al.* 1999). L'injection ICV de leptine, si elle induit une diminution de la production d'orexine A, n'a curieusement pas d'effet sur l'expression de son précurseur dans des conditions standards (Beck B et Richy S 1999; Cai XJ *et al.* 1999). De façon contradictoire, l'obésité est associée à une baisse de l'expression de la prépro-orexine chez le rat Zucker (Cai XJ *et al.* 2000).

La « Melanin-Concentrating Hormone » (MCH).

La MCH est à la fois un neurotransmetteur et une hormone, issue du clivage protéolytique d'une pro-hormone, la Pmch. Celle-ci code également pour les neuropeptides EI (NEI) et GE (NGE) qui pourraient également jouer un rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Nahon JL *et al.* 1989). Dans l'hypothalamus, les neurones synthétisant la MCH sont localisés principalement au niveau du LHA (Bittencourt J *et al.* 1992).

Le jeûne augmente l'expression hypothalamique de la MCH. L'injection centrale de MCH augmente la prise alimentaire et l'infusion ICV de MCH conduit même à une obésité légère (Qu D *et al.* 1996). L'injection ICV de leptine et d'insuline inhibe et stimule respectivement l'expression de la MCH dans le LHA (Bahjaoui-Bouhaddi M *et al.* 1994; Sahu A 1998).

Les rats obèses Zucker, les souris *ob/ob* et *db/db* sont caractérisés par une augmentation de l'expression de MCH au niveau de l'hypothalamus (Stricker-Krongrad A *et al.* 2001; Mondal MS *et al.* 2002). Les souris génétiquement modifiées pour surexprimer la MCH au niveau du LHA présentent une hyperphagie associée à une forte obésité et un diabète de type II (Ludwig DS *et al.* 2001).

La Galanine.

Ce neuropeptide est exprimé dans l'ensemble du cerveau et plus précisément au niveau du PVN (Merchenthaler I *et al.* 1993). Chez les rongeurs, un jeûne complet de 48 heures n'induit pas de modification de l'expression hypothalamique de la Galanine. L'injection ICV de Galanine augmente faiblement la prise alimentaire mais n'induit ni gain de poids ni obésité (Smith BK *et al.* 1994). L'injection centrale de leptine inhibe l'expression hypothalamique de la Galanine.

Les rats Zucker obèses sont caractérisés par une augmentation de l'expression de Galanine au niveau du PVN (Mercer J *et al.* 1996). Des données contradictoires sont publiées chez les patients obèses indiquant soit une légère augmentation de l'expression centrale de la Galanine soit aucune modification.

Le « Galanine-like Peptide » (GALP) :

Le GALP est proche structurellement de la Galanine et possède même une forte affinité pour le récepteur de la Galanine GAL2R. GALP est exprimé dans des neurones spécifiques de l'ARC et de l'éminence médiane qui ne semblent pas exprimer d'autres neuropeptides orexigènes (Takatsu Y *et al.* 2001).

L'injection ICV de GALP entraîne une augmentation de la prise alimentaire dix fois supérieure à celle induite par la Galanine (Matsumoto Y *et al.* 2002). Chez les souris *ob/ob* et les rats *fa/fa*, l'expression de GALP au niveau de l'ARC est diminuée (Jureus A *et al.* 2001). Ces caractéristiques font de GALP un peptide orexinogène particulier.

I.3.c. Les neuropeptides anorexigènes de premier ordre.

POMC et les Mélanocortines.

La « Pro-OpioMelanoCortin » (POMC) est synthétisée principalement au niveau de l'hypophyse, de l'ARC et du tractus solitaire. Le clivage de cette pro-hormone produit plusieurs peptides regroupés sous la famille des Mélanocortines, comprenant entre autres l'« α -Melanocyte-Stimulating Hormone » (α MSH) et l'hormone adrénocorticotropine (ACTH).

Le jeûne inhibe l'expression de POMC au niveau de l'ARC tandis que la prise alimentaire la stimule (Mizuno TM *et al.* 1998). L'injection centrale des mélanocortines α MSH et ACTH₍₁₋₂₄₎ induit une baisse de la prise alimentaire (Brown KS *et al.* 1998). L'injection ICV de leptine et d'insuline induit une augmentation de l'expression de POMC (Tozawa F *et al.* 1988; Schwartz MW *et al.* 1997; Cowley MA *et al.* 2001).

Les souris KO pour le récepteur de l' α MSH (MC4-R) présentent une obésité sévère. Des mutations de ce récepteur sont également retrouvées dans des cas d'obésité humaine (Vaisse C *et al.* 1998). Il est intéressant de noter que l'AgRP est un antagoniste de MC4-R.

Les « Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript » (CART).

Les CART sont un ensemble de peptides issus du clivage d'un précurseur commun (Thim L *et al.* 1999). Ils sont principalement exprimés au niveau de l'ARC, dans les mêmes neurones exprimant POMC. Le jeûne induit une baisse de l'expression de CART. L'injection de CART entraîne une baisse de la prise alimentaire et une perte de poids même chez l'obèse (Larsen PJ *et al.* 2000). Les neurones CART expriment ObRb et l'injection ICV de leptine augmente l'expression de CART au niveau de l'ARC (Kristensen P *et al.* 1998). L'injection centrale de CART induit également une augmentation des UCP-I, II et III dans le tissu adipeux et le muscle, suggérant un rôle important de CART dans la régulation de la dépense énergétique (Wang CF *et al.* 2000).

I.3.d. Les neuropeptides anorexigènes de second ordre.

La « Corticotropin-Releasing Hormone » (CRH) et les Urocortines (UCN).

CRH est en réalité une famille de neuropeptides comprenant au moins 4 membres : la CRH elle-même et les UCN-I, II et III. Au niveau de l'hypothalamus, la CRH est exprimée principalement au niveau du PVN. Chez les rongeurs, son injection centrale inhibe la prise alimentaire et induit également une modification de l'activité du système nerveux autonome ainsi qu'une augmentation de l'activité locomotrice.

Selon le statut métabolique, la leptine semble avoir des effets opposés sur la CRH. L'injection ICV de leptine inhibe l'expression de ce neuropeptide et l'activité des neurones CRH dans les périodes de jeûne. Au contraire, ce traitement stimule son expression et l'activité des neurones CRH dans les périodes de satiété (Huang Q *et al.* 1998; Uehara Y *et al.* 1998).

.

La “Thyrotropin-Releasing Hormone” (TRH).

Le clivage de la préproTRH produit plusieurs peptides regroupés sous le terme TRH. La TRH est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques dont le contrôle de la balance énergétique, la régulation de fonctions cognitives, la douleur... La TRH est fortement exprimée au niveau du PVN (Segerson TP *et al.* 1987).

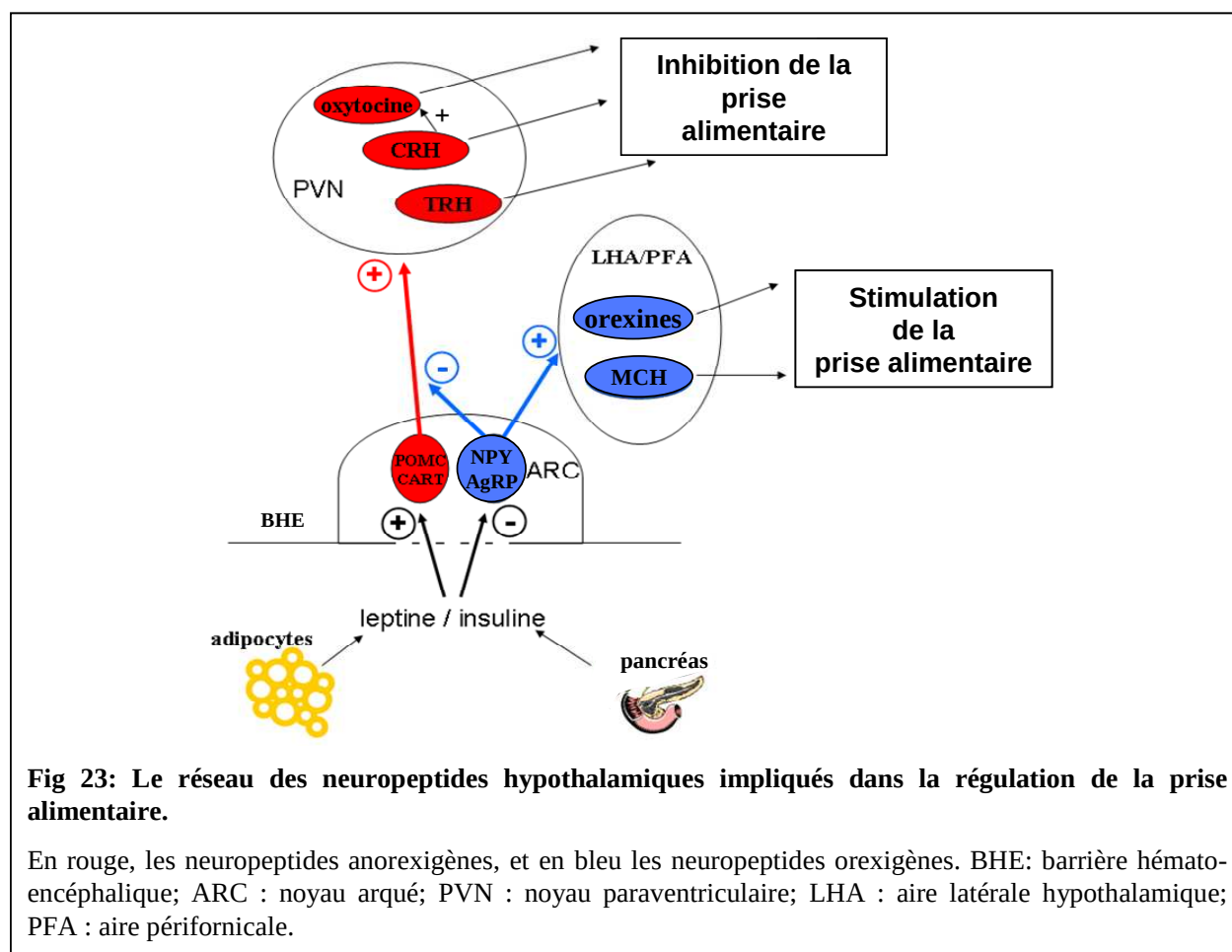
En période de jeûne, l'expression de la préproTRH dans le PVN et la sécrétion de TRH diminuent (Van Haasteren GA *et al.* 1995). L'injection ICV de TRH inhibe la prise alimentaire (Vijayan E et McCann SM 1977). En période de jeûne, l'injection centrale de leptine (mais pas d'insuline) induit une augmentation de l'expression hypothalamique de préproTRH chez le rat (Fekete C *et al.* 2006).

L'ocytocine.

L'ocytocine est exprimée dans des neurones localisés au niveau du PVN. L'ocytocine est également sécrétée en tant qu'hormone au niveau de la neurohypophyse. L'injection ICV de ce neuropeptide induit une réduction de la prise alimentaire (Olson BR *et al.* 1991a). Les neurones à ocytocine expriment ObRb (Hakansson M-L *et al.* 1998) et l'administration ICV de leptine induit une libération d'ocytocine chez le rat (Blevins JE *et al.* 2004).

L'ocytocine est également stimulée par la CRH (Bruhn TO *et al.* 1986). L'injection ICV d'antagonistes de l'ocytocine bloque également l'effet anorexigène de la CRH suggérant

que l'ocytocine est le médiateur des effets de la CRH, du moins ceux concernant la prise alimentaire (Olson BR *et al.* 1991b).



I.4 Mode d'action de la leptine sur le système des neurones orexigéniques / anorexigéniques.

I.4.a. Les neurones de premier ordre.

C'est l'ARC qui est la base de ce circuit neuronal (Tang-Christensen M *et al.* 1999). Anatomiquement, il est localisé au niveau du troisième ventricule et à proximité de la BHE. C'est d'ailleurs une des zones de passage principales de la leptine du sang vers le SNC (voir chapitre I.1). Au niveau de ce noyau hypothalamique, les neurones de premier ordre traduisent les signaux d'adiposité périphériques en signaux nerveux. La leptine et l'insuline inhibent les neurones NPY / AgRP et stimulent les neurones POMC / CART (Figure 23). Ces neurones de premier ordre communiquent ensuite les signaux nerveux aux autres noyaux hypothalamiques *via* leurs nombreuses projections neuronales.

I.4.b Les neurones de deuxième ordre.

Les axones des neurones de premier ordre localisés au niveau de l'ARC innervent les neurones de deuxième ordre au niveau du PVN, LHA et PFA. Au niveau du PVN, les axones POMC et CART stimulent les neurones et la synthèse des neuropeptides anorexigènes de deuxième ordre (CRH, TRH et ocytocine). Au niveau des LHA et PFA, les axones NPY et AgRP stimulent les neurones et la synthèse des neuropeptides orexinogènes MCH et orexines (Figure 23).

I.4c. Modérations et perspectives.

En réalité, le mécanisme de régulation de la balance énergétique présenté ci-dessus n'est qu'un modèle simplifié, voire simpliste. Il reste encore à l'heure actuelle de nombreux problèmes à élucider, concernant notamment les interconnexions entre neurones de second ordre et le possible rétrocontrôle négatif de ces neurones sur ceux de premier ordre. En effet, des axones innervant l'ARC proviennent des PVN, LHA et PFA.

Il ne faut pas sous-estimer le rôle des neurones dits de second ordre dans la régulation de la balance énergétique. En effet, ceux-ci expriment généralement les récepteurs de la leptine et de l'insuline. Ces deux hormones peuvent donc potentiellement réguler chaque neuropeptide en collaboration avec d'autres acteurs biologiques et ainsi engendrer une sélectivité dans le recrutement d'une voie neuropeptidique précise, et donc une réponse centrale adaptée à chaque état physiologique. L'observation du phénotype normal des souris doubles KO NPY et AgRP montre bien qu'en absence de ces importants neuropeptides orexigéniques, il existe des mécanismes compensatoires faisant intervenir les neuropeptides de second ordre précédemment décrits, voire même un ou plusieurs neuropeptides encore non identifiés.

L'étude minutieuse des différentes voies de signalisation activées par les signaux périphériques et les neuropeptides, ceci pour les différents types de neurones orexigènes et anorexigènes, est également nécessaire pour appréhender la complexité du contrôle de la balance énergétique au niveau central. De plus, cette démarche pourrait permettre de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et de nouveaux traitements dans les pathologies associées à un déséquilibre de l'homéostasie énergétique. L'étude des neurotransmetteurs plus « classiques » comme la sérotonine et la noradrénaline dans le contrôle de l'homéostasie énergétique est également un sujet à approfondir.

D'autre part, la leptine est également exprimée dans le cerveau et plus particulièrement au niveau de l'hypothalamus. Il existe cependant peu de données concernant le rôle précis de

cette leptine « ectopique » dans le contrôle de la balance énergétique. Néanmoins, il a été montré que son expression est diminuée pendant les périodes de jeûne, comme c'est le cas au niveau périphérique (Morash B *et al.* 1999).

Dans l'essentiel des études portant sur la régulation de la balance énergétique, l'hypothalamus est considéré comme l'élément clé. Néanmoins, les autres zones du cerveau avec lesquelles il interagit peuvent également avoir des rôles importants dans le contrôle de la balance énergétique.

La majorité des données citées précédemment ont été obtenues à partir de modèles murins. Il ne faut pas oublier que les effets de la leptine diffèrent chez l'homme. Chez le rat ou la souris, cette hormone joue réellement le rôle de facteur de satiété, activé par la prise alimentaire. Cependant, chez l'homme, la prise alimentaire individuelle ne semble pas influencer la sécrétion de leptine. Dans ce cas, cette hormone doit être plutôt considérée comme un indicateur des réserves énergétiques, représentées par la masse adipeuse (Ahima RS et Flier JS 2000).

- Le système des neurones orexigéniques et anorexigéniques -

- L'hypothalamus est le siège de la régulation de la balance énergétique. Il intègre les signaux périphériques en relation avec le statut métabolique de l'organisme (leptine, insuline, adiponectine, PYY, ghreline...) et active en retour un système complexe de neurones / neuropeptides.

- La leptine doit être transportée à travers la BHE pour accéder à l'hypothalamus. Ce transport, impliquant ObRa principalement, est un processus actif, saturable et finement régulé. Il est d'autant plus efficace que la concentration plasmatique de leptine est élevée. Cependant, dans le cas de fortes concentrations de leptine caractéristiques de la pathologie obésité, ce transport est altéré.

- Le noyau arqué (ARC) est constitué entre autres de deux populations distinctes de neurones impliqués dans le contrôle de la balance énergétique. Ces neurones sont dits de premier ordre car ils traduisent les signaux d'adiposité en signaux nerveux. Ce sont les neurones orexigènes NPY / AgRP et les neurones anorexigènes POMC / CART. Les neurones de premier ordre transmettent ensuite ces signaux nerveux aux neurones dits de second ordre.

- Les neurones orexigènes de premier ordre NPY et AgRP stimulent la prise alimentaire et inhibent la dépense énergétique. La restriction alimentaire induit une augmentation de l'expression de ces neuropeptides tandis que la leptine l'inhibe. Les rats et souris obèses sont caractérisés par une augmentation de l'expression de ces neuropeptides.

- Les neurones NPY et AgRP activent les neurones de second ordre orexigènes localisés principalement dans les aires latérales (LHA) et périfornicales (PFA) de

l'hypothalamus. Les principaux neuropeptides orexigénique de second ordre sont les orexines et la « melanin-concentrating hormone » (MCH). Ils stimulent la prise alimentaire et inhibent la dépense énergétique.

- Les neurones anorexigènes de premier ordre POMC et CART inhibent la prise alimentaire et stimulent la dépense énergétique. La restriction alimentaire induit une baisse de l'expression de ces neuropeptides tandis que la leptine la stimule.

- Les neurones anorexigènes de deuxième ordre sont localisés principalement dans le noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus. Les principaux neuropeptides anorexigéniques de deuxième ordre sont l'ocytocine, la « thyrotropin-releasing hormone » (TRH) et la « corticotropin-releasing hormone » (CRH). Ils inhibent la prise alimentaire et stimulent la dépense énergétique.

- Les deux populations de neurones de premier ordre sont interconnectées par l'AgRP qui inhibe l'activation des neurones POMC.

II. Leptine et obésité.

II.1. Le syndrome métabolique et l'obésité.

II.1.a. Définition du syndrome métabolique.

La définition du syndrome métabolique est variable selon les sources. En avril 2005, l'IDF (« The New International Diabetes Federation ») a proposé une définition consensus: l'association chez un même individu des troubles physiologiques que sont l'obésité viscérale (définie par la mesure du tour de taille), la dyslipidémie (taux sanguin de triglycérides supérieur à 150 mg/dL, taux sanguin de HDL cholestérol inférieur à 40 mg/dL), l'hypertension (pression artérielle systolique supérieure à 130 mmHg) et l'hyperglycémie (taux de glucose plasmatique après la prise alimentaire supérieur à 100 mg/dL). La présence de ces facteurs conduit à une forte augmentation des risques d'accidents cardiovasculaires et de développement d'un diabète de type II, réduisant ainsi l'espérance de vie de manière significative. De nombreux scientifiques et médecins considèrent le syndrome métabolique comme le regroupement des pathologies obésité, diabète de type II et athérosclérose ; ces trois pathologies étant bien sûr interconnectées.

II.1.b. Impacts de l'obésité et du syndrome métabolique sur la société.

La prévalence du syndrome métabolique n'a cessée de croître au cours du dernier quart de siècle, principalement à cause de l'augmentation du nombre d'individus obèses. Pour l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'obésité est une pandémie. Aux USA, les dernières données disponibles indiquent qu'environ 30% de la population est concernée par

l'obésité, avec une incidence de 45% pour les 60-70 ans. Croire que l'obésité concerne uniquement les américains consommateurs d'hamburgers ou les anglais grands buveurs de bière serait une erreur. Ainsi, en France une étude récente (enquête Obepi publiée le 18 septembre 2006) montre que 20 millions d'individus sont en surpoids et 6 millions obèses. En 9 ans, la population a grossi en moyenne de 2,1 kg et le tour de taille a augmenté de 3,4 cm. Bien que toutes les générations soient touchées, il faut noter que la population des obèses rajeunit. Il n'est plus rare que des enfants ou adolescents soient atteints par cette pathologie (15% des jeunes américains et européens). Il est facile d'imaginer les problèmes physiologiques que peuvent causer une obésité si précoce sur la santé et l'espérance de vie de ces jeunes.

Beaucoup de personnes ne voient pas l'obésité comme une réelle maladie et considèrent qu'il suffit de manger mieux et moins pour « guérir ». En oubliant les prédispositions génétiques, c'est somme toute très logique. Mais il semble alors nécessaire de rappeler les difficultés rencontrées pour se débarrasser, avant les beaux jours, des quelques kilogrammes mis en réserve durant l'hiver. Il suffit alors d'imaginer que ces quelques kilogrammes soient en réalité une cinquantaine de kilos voire plus, sans oublier bien sûr que dans ce cas, les systèmes de régulation de la balance énergétique sont altérés...

L'obésité touche aujourd'hui environ 300 millions de personnes dans le monde, et le diabète de type II environ 200 millions. Le coût financier associé au syndrome métabolique est en perpétuelle hausse et estimé entre 2 à 15% des dépenses totales de santé selon les pays ; il ne faut pas oublier non plus les problèmes sociaux engendrés par ces maladies qui se répercutent inévitablement sur d'autres paramètres économiques. Ainsi, le syndrome métabolique est un problème majeur de santé publique. Des fonds de recherche conséquents doivent donc être investis afin de mieux comprendre l'établissement de ces pathologies et ainsi découvrir des traitements cliniques efficaces. Enfin, il faut mettre en place une réelle éducation de la prise alimentaire et de la balance énergétique chez les plus jeunes, en se basant sur le modèle du Danemark par exemple, afin d'enrayer le développement du syndrome métabolique dans le futur.

- Le syndrome métabolique -

- Le syndrome métabolique est défini comme l'association chez un même individu des troubles physiologiques suivants : l'obésité viscérale, la dyslipidémie (taux sanguins de triglycérides élevés et de HDL cholestérol diminués), l'hypertension et l'hyperglycémie.

- La prévalence du syndrome métabolique est en perpétuelle hausse. L'obésité touche aujourd'hui environ 300 millions de personnes dans le monde et le diabète de type II environ 200 millions. En France, 20 millions de personnes en surpoids dont 6 millions sont obèses (15% des adolescents) sont dénombrées.

II.2. Obésité et hyperlipidémie.

II.2.a. Métabolisme lipidique suite à une prise alimentaire.

L'obésité est généralement la conséquence d'un déséquilibre de la balance énergétique, caractérisé par une prise alimentaire abondante, riche en lipides, pendant une période prolongée, associée à une faible activité physique.

Tous les repas contiennent des lipides sous la forme de triglycérides principalement, d'acides gras libres, de cholestérol et autres stérols. Suite à leur ingestion et leur progression dans le système digestif, ces lipides sont transformés en monoacylglycérol et acides gras à longue chaînes. Ceux-ci sont ensuite capturés par les entérocytes de l'intestin où ils sont transformés en triacylglycérols et esters de cholestérol. Ces composés sont alors transportés dans la circulation sanguine sous la forme de particules lipoprotéiques (chylomicrons et les différents types de LDL « Low Density Lipoprotein »). Ces lipoprotéines sont ensuite hydrolysées dans la circulation sanguine libérant acides gras non estérifiés (NEFA pour « nonesterified fatty acid ») et monoacylglycérols qui sont alors distribués dans les différents tissus.

Le devenir des acides gras varie selon les tissus. Par exemple, dans le tissu adipeux ils sont transformés en triglycérides, tandis que dans le muscle squelettique ou cardiaque ils sont oxydés pour produire de l'énergie sous forme d'ATP. Les acides gras présents dans la circulation sanguine et « non utilisés » sont de nouveau transportés sous forme de triglycérides *via* les lipoprotéines de très faible densité (VLDL pour « Very Low Density Lipoprotein »). Ce processus est régulé par le foie.

Lors des périodes de satiété, le transport dans la circulation sanguine des triglycérides à partir des entérocytes, *via* les lipoprotéines, est augmenté. Les NEFA sont principalement stockés sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux. Au contraire, lors des périodes de jeûne ou au cours de l'exercice physique, le niveau de lipoprotéines sanguines diminue et le tissu adipeux devient alors le principal fournisseur de triglycérides.

II.2.b. Métabolisme lipidique chez les individus obèses.

Dans le cas de la pathologie obésité, caractérisée par une prise alimentaire lipidique supérieure à la normale, le tissu adipeux est « saturé » et ne stocke plus correctement l'excès d'acides gras. Des triglycérides sont alors déposés et stockés dans d'autres tissus comme le cœur, le muscle squelettique, le rein et le foie entraînant un dysfonctionnement de leurs fonctions physiologiques. De plus, la saturation du tissu adipeux en triglycérides conduit à un remodelage du profil de sécrétion des hormones comme la leptine et l'adiponectine qui jouent un rôle prépondérant dans la régulation de la balance énergétique.

Le fait que le tissu adipeux ne remplisse plus son rôle de stockage provoque une lipolyse dérégulée et une élévation des NEFA et triglycérides circulants, phénomène appelé hyperlipidémie (ou dyslipidémie). Normalement, le foie participe à la régulation de ces excès lipidiques, mais chez l'individu obèse cet organe n'exerce plus correctement cette fonction. Cette concentration plasmatique en acides gras supérieure à la normale est toxique pour l'organisme (lipotoxicité) et induit notamment des phénomènes de mort cellulaire (lipoapoptose). Cette toxicité affecte les cellules β du pancréas responsable de la synthèse de l'insuline. De plus, ce surplus lipidique active la production de médiateurs de l'inflammation par le tissu adipeux et le foie, entraînant un dysfonctionnement métabolique des tissus périphériques comme le muscle squelettique et le pancréas.

En conclusion, le tissu adipeux et le foie sont les principaux responsables de l'hyperlipidémie sanguine. Le muscle squelettique, le pancréas, le cœur et les autres tissus périphériques vont alors s'adapter à cet excès lipidique, entraînant une dérégulation complète de leurs fonctions biologiques. Ce phénomène est en partie responsable du développement des pathologies associées à l'obésité et donc du syndrome métabolique. Il est important de noter que ces processus ont été principalement étudiés chez les rongeurs. Depuis quelques années, des études semblent confirmer la validité de ces informations chez l'homme.

II.2.c. Les effets anaboliques de la leptine.

En plus de son rôle dans la régulation centrale de la balance énergétique, la leptine est également impliquée dans le métabolisme lipidique en régulant notamment la capture des acides gras libres au niveau des adipocytes et des autres tissus, et en influençant les voies métaboliques intracellulaires (Unger RH 2003). La leptine est une hormone liporégulatrice et permet le stockage dans les adipocytes des acides gras non utilisés suite à une prise alimentaire. Son absence ou son inefficacité participe aux dépôts des triglycérides dans les tissus non-adipocytaires.

Chez les rats Sprague-Dawley soumis à des expériences de DIO, le contenu en triglycérides des adipocytes augmente de 150% en 20 semaines, tandis que celui des tissus non-adipocytaires augmente en moyenne de 10%. Chez les rats obèses Zucker caractérisés par une mutation du récepteur de la leptine, des triglycérides s'accumulent au niveau des muscles squelettiques et cardiaque, du foie, des reins et des îlots pancréatiques (Unger RH 2003). Cependant dans ce modèle, le rétablissement par transfection de l'expression d'ObRb sauvage au niveau du foie induit une diminution du stockage de triglycérides dans ce tissu (Lee Y *et al.* 2001).

Dans les tissus non adipocytaires, la leptine régule les voies métaboliques cellulaires, inhibe la transformation des acides gras en triglycérides et stimule leur oxydation. Elle stimule également l'oxydation des acides gras en activant enzymes et fonctions mitochondriales, principalement *via* la voie de signalisation AMPK (Zhou Y-T *et al.* 1997; Minokoshi Y *et al.* 2002; Hardie DG *et al.* 2003). Cette hormone inhibe des facteurs de transcription lipogéniques comme par exemple le « sterol regulatory element-binding protein 1c » (SREBP1c) au niveau du tissu hépatique et des îlots pancréatiques. Chez le rat, l'obésité est associée à une augmentation de l'expression de SREBP1c dans ces tissus (Kakuma T *et al.* 2000).

- Métabolisme lipidique, obésité et leptine -

- Suite à une prise alimentaire, les lipides sont hydrolysés dans l'intestin en monoacylglycérol et acides gras à longue chaîne, puis capturés et transformés en triglycérides et esters de cholestérol par les entérocytes. Ces composés sont alors transportés dans la circulation sanguine sous forme de lipoprotéines puis hydrolysés en NEFA et distribués aux différents tissus. Ces NEFA sont stockés sous la forme de triglycérides par les adipocytes et oxydés dans les autres tissus pour fournir de l'énergie.

- L'obésité est généralement la conséquence d'une alimentation riche en lipides associée à un manque d'exercice. Cette pathologie est caractérisée par une saturation du tissu adipeux en triglycérides ayant pour conséquence l'augmentation de la concentration sanguine en NEFA et triglycérides circulants (hyperlipidémie ou dyslipidémie). Cette augmentation des NEFA sanguin est toxique (lipotoxicité) et induit des phénomènes d'apoptose dans les tissus. Dans ces conditions, des triglycérides sont stockés au niveau de tissus périphériques comme le foie, les muscles squelettique et cardiaque, le pancréas, induisant des altérations de leurs fonctions. Ce phénomène participe au développement des pathologies associées à l'obésité et du syndrome métabolique.

- La leptine est une hormone liporégulatrice régulant la capture des acides gras libres au niveau des cellules et les voies métaboliques intracellulaires. Elle favorise l'accumulation de triglycérides dans le tissu adipeux et l'inhibe dans les autres tissus en favorisant l'oxydation des acides gras. Dans le cas de la résistance à la leptine associée à l'obésité, l'incapacité de la leptine à induire ses effets liporégulateurs participe au stockage de triglycérides dans les tissus non-adipocytaires.

II.3. La résistance à la leptine.

La leptine permet d'informer l'ensemble des tissus du statut métabolique de l'organisme. Elle participe à la régulation de la balance énergétique et joue également un rôle important dans le processus de liporégulation. Les niveaux plasmatiques de leptine étant proportionnels à la quantité de masse grasse, cette hormone participe au maintien des régulations physiologiques de l'organisme en cas de surpoids et permet de limiter ainsi les complications cliniques. Cependant, à partir d'une certaine concentration plasmatique en leptine (obésité sévère), cette hormone n'a plus d'effet au niveau central et périphérique. Ce phénomène, appelé résistance à la leptine, est caractéristique de la pathologie obésité. L'organisme est alors le lieu de profondes dérégulations liées en grande partie à l'inefficacité de la leptine, entraînant le développement des pathologies associées à l'obésité.

Les causes et les mécanismes d'établissement de la résistance à la leptine sont des processus encore mal définis à l'heure actuelle. A ce jour, plusieurs hypothèses sont envisagées par la communauté scientifique :

- un défaut dans le transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique,
- une diminution de l'expression de ObRb au niveau central et périphérique,
- un défaut dans les voies de signalisation activées en réponse à la leptine (c'est l'hypothèse post-récepteur donnant un rôle prépondérant aux protéines SOCS-3 et PTP1B),
- une altération du processus d'internalisation de la leptine. Ce quatrième point a été un des principaux axes d'étude au cours de mon travail de thèse et sera évoqué dans la partie Résultats – Discussion.

II.3.a. Résistance centrale à la leptine et barrière hémato-encéphalique.

Comme nous l'avons vu précédemment, le transport de la leptine à travers la BHE est un phénomène saturable. Dans le cas de l'obésité caractérisée par une forte concentration plasmatique en leptine, ce transport est diminué. Ainsi, les effets de la leptine au niveau central sont amoindris, ce qui participe au phénomène de résistance à la leptine (Banks WA *et*

al. 1999). De plus chez les souris DIO, l'injection ICV de leptine induit l'activation de STAT3 (même faible) au niveau de l'hypothalamus. Au contraire, l'injection de leptine par voie intrapéritonéale (IP) n'a pas d'effet sur l'activation hypothalamique de STAT3 (El-Haschimi K *et al.* 2000).

Néanmoins l'obésité ne semble pas associée à une diminution de l'expression de ObRa au niveau des micro-vaisseaux de la BHE, et le mécanisme par lequel le transport de la leptine à travers cette barrière est altéré dans les cas d'obésité reste inconnu (Hileman SM *et al.* 2002).

II.3.b. Résistance à la leptine et expression de ObR.

La résistance à la leptine est également la conséquence d'une diminution de l'expression du récepteur de la leptine, et plus particulièrement de l'isoforme ObRb (Widdowson PS *et al.* 1997). Il existe en effet une relation entre les taux plasmatiques de leptine et l'expression hypothalamique de ObRb, notamment au niveau de l'ARC.

Les expériences de DIO induisent progressivement l'obésité. Les états intermédiaires d'obésité sont caractérisés par : i) une augmentation de la masse grasse et une hyperleptinémie, ii) une diminution des effets de la leptine au niveau central suite à son injection périphérique uniquement, son injection ICV conservant la même efficacité. Dans cette situation, l'expression de ObRb au niveau de l'ARC est augmentée (Lin S *et al.* 2000). Cette augmentation permet de contrecarrer la baisse relative de leptine au niveau central résultant de l'altération de son transport à travers la BHE, et d'augmenter ainsi le signal physiologique de la leptine. Les états avancés de la DIO correspondant à une obésité sévère (résistance à la leptine centrale et périphérique et profond déséquilibre de la balance énergétique) sont caractérisés par une baisse hypothalamique de l'expression de ObRb qui participe au phénomène de résistance à la leptine. (Wilsey J *et al.* 2003; Tortoriello DV *et al.* 2006). Concernant les rats ou souris résistants à la DIO, des données contradictoires sont retrouvées dans la littérature, avec soit une diminution, soit une augmentation de l'expression de ObRb (Wilsey J *et al.* 2003; Tortoriello DV *et al.* 2006).

II.3.c. SOCS-3, PTP1B et résistance à la leptine.

Comme nous l'avons vu, SOCS-3 et PTP1B sont des régulateurs négatifs des voies de signalisation activées par la leptine, ceci *in vitro* et *in vivo* (Baskin DG *et al.* 2000; Zabolotny JM *et al.* 2002).

SOCS-3 :

L'expression hypothalamique de SOCS-3, notamment au niveau de l'ARC, est augmentée *in vivo* par une injection de leptine (centrale ou périphérique). De plus, son expression est également augmentée dans des modèles murins d'obésité (Bjorbaek C *et al.* 1998a) et la déficience en SOCS-3 (SOCS-3 +/-) contrecarre le développement de l'obésité induite par une alimentation riche en lipides (Howard JK *et al.* 2004). SOCS-3 joue donc un rôle primordial dans la sensibilité des cellules à la leptine, et par conséquent, dans le phénomène de résistance à la leptine.

Au niveau du muscle squelettique, SOCS-3 a participé également à la régulation de l'oxydation des acides gras *via* l'activation de la voie AMPK par la leptine. Dans les modèles murins d'obésité induite par l'alimentation, l'expression de SOCS-3 est augmentée au niveau de ce tissu (Watt MJ *et al.* 2006). Chez l'individu obèse, l'activation de la voie AMPK est altérée dans les cellules musculaires isolées, en parallèle d'une augmentation de l'expression de SOCS-3 (Steinberg GR *et al.* 2006). De plus, la surexpression de SOCS-3 dans des cellules musculaires humaines isolées conduit à un défaut de l'activation de la voie AMPK en réponse à la leptine (Steinberg GR *et al.* 2006). SOCS-3 est donc également un médiateur de la résistance à la leptine au niveau du muscle squelettique, stimulant le stockage de triglycérides de ce tissu.

Au niveau du foie, l'inhibition de SOCS-3 chez les souris obèses DIO induit une augmentation de la sensibilité à la leptine, et améliore la stéatose hépatique en normalisant le niveau d'expression de SREBP1c (Ueki K *et al.* 2004). SOCS-3 est également exprimé au niveau des îlots de Langerhans. La surexpression de SOCS-3 spécifiquement au niveau de ces cellules réduit l'effet liporégulateur de la leptine en inhibant son action sur les enzymes du métabolisme cellulaire (Shimabukuro M *et al.* 1997; Wang Z *et al.* 2000).

PTP1B :

Initialement, PTP1B était considéré comme un inhibiteur de l'action de l'insuline. Les souris PTP1B KO présentent, en plus de leur hypersensibilité à l'insuline, une résistance à l'obésité induite par une prise alimentaire riche en lipides (Elchebly M *et al.* 1999). Une étude récente a montré que les souris présentant un déficit en PTP1B spécifiquement au niveau central sont caractérisées par une perte de poids et une hypersensibilité à la leptine, alors que sa suppression au niveau périphérique (muscle et foie) n'induit aucune modification du poids total de l'animal (Bence KK *et al.* 2006). Ces auteurs suggèrent donc un rôle important de PTP1B dans l'établissement de la résistance à la leptine au niveau central. Cependant, aucune

modification dans l'expression hypothalamique de PTP1B n'a été observée dans les cas d'obésités murines ou humaine (Munzberg H, 2005). Au niveau périphérique par contre, l'expression de PTP1B est augmentée dans le foie des souris DIO, suggérant une implication de cette protéine dans le processus de résistance hépatique à la leptine (et à l'insuline) (Lam NT *et al.* 2006). A l'heure actuelle des compagnies pharmaceutiques testent des inhibiteurs de PTP1B dans le traitement de l'obésité et du syndrome métabolique (Dadke S et Chernoff J 2003).

- La résistance à la leptine -

- L'obésité est caractérisée par des niveaux plasmatiques de leptine élevés et par une absence d'effet de cette hormone. Ce phénomène, appelé résistance à la leptine, est responsable en grande partie des dérégulations physiologiques caractéristiques de l'obésité et du développement des pathologies associées. Plusieurs mécanismes sont responsables de la résistance à la leptine :

1- La diminution de l'efficacité du transport de la leptine à travers la BHE, diminuant l'action biologique de la leptine au niveau central.

2- La modification de l'expression de ObRb. Chez le rat, l'expression hypothalamique de ObRb est augmentée dans les stades précoces du développement de l'obésité, améliorant la sensibilité à leptine. Au contraire, dans les stades avancés de l'obésité, l'expression hypothalamique de ObRb est diminuée.

3- Un défaut d'activation des voies de signalisation induites par la leptine, impliquant les protéines PTP1B et SOCS-3. La surexpression au niveau central ou périphérique de ces protéines, induit une insensibilité des tissus-cibles à la leptine. L'obésité est caractérisée par une augmentation de l'expression hypothalamique de SOCS-3.

III. Leptine et fonction cardiaque

L'obésité est associée à un risque cardio-vasculaire élevé, dû en partie à la résistance à l'insuline (diabète de type II) et à l'augmentation des taux de glucose sanguins. Cet excès de glucose est toxique et conduit à l'obstruction des artères et à la crise cardiaque.

L'obésité induit également des complications au niveau du tissu cardiaque lui-même, indépendamment des problèmes de diabète ou d'hypertension. La leptine a une action anti-hypertrophique sur le cœur et le phénomène de résistance à la leptine participe à l'hypertrophie des cardiomyocytes caractéristique des cas d'obésité (Barouch LA *et al.* 2003). Cette hypertrophie participe au développement d'arythmies responsables d'arrêts cardiaques

(Zhang R et Reisin E 2000). La leptine participe également à la régulation de la contraction des cardiomyocytes, en stimulant l'activité de la « NO synthase » (NOS) (Nickola MW *et al.* 2000). Des études ont également montré que la leptine inhibe la contraction des cardiomyocytes en agissant sur le raccourcissement de ces cellules ainsi que sur les courants calciques transitoires (Ren J et Relling DP 2006).

Nous avons étudié, en collaboration avec l'équipe du Pr Bonvallet, l'impact de la leptine sur les courants électriques qui contrôlent la contraction myocytaire, dans un modèle de cardiomyocytes ventriculaires isolés à partir de rats obèses DIO (voir Résultats-Discussion, Etude I et la partie Publications).

CHAPITRE 4 : Leptine, ghréline et fonction somatotrope.

L'hormone de croissance (GH) est une cytokine synthétisée et sécrétée principalement par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse. Comme son nom l'indique, cette hormone est impliquée dans le processus de croissance des tissus. C'est en 1909 que Cushing démontra pour la première fois la relation entre glande hypophysaire et croissance corporelle. La GH a été isolée en 1944 à partir d'extraits hypophysaires de bovins (Li C et Evans H 1944). Chez les jeunes vertébrés, une sécrétion de GH plus faible que la normale induit le nanisme, tandis qu'une sécrétion de GH trop élevée conduit au gigantisme.

En plus de ce rôle initial de la GH, les études menées au cours des soixante dernières années ont permis d'élargir la fonction de cette hormone hypophysaire à d'autres processus physiologiques que la croissance et en particulier à la régulation de la balance énergétique.

I. Hypophyse et cellules somatotropes.

L'hypophyse est considérée comme la glande endocrine par référence et joue un rôle majeur dans le contrôle de nombreuses fonctions physiologiques. Elle intègre des signaux hypothalamiques et périphériques et libère en réponse les hormones hypophysaires qui agissent sur différents tissus-cibles.

Anatomiquement, cette glande est localisée dans une cavité osseuse du corps sphénoïde, la selle turcique (Figure 24). L'hypophyse est reliée à l'hypothalamus au niveau du troisième ventricule par la tige pituitaire, et ce contact anatomique reflète le concept physiologique d'axe hypothalamo-hypophysaire. Elle est composée de deux lobes principaux (antérieur et postérieur) séparés par le lobe intermédiaire. Le système circulatoire de l'hypophyse est composé des veines hypophysaires supérieures (système porte ou plexus primaire) qui forment un premier réseau de capillaires au niveau de la « pars tuberalis » où sont libérées les neurohormones produites par les neurones hypothalamiques. Au sortir de la « pars tuberalis » se forme un second réseau de capillaires (plexus secondaire) qui irriguent le lobe antérieur et se collectent en une veine hypophysaire, drainant le sang contenant les hormones hypophysaires.

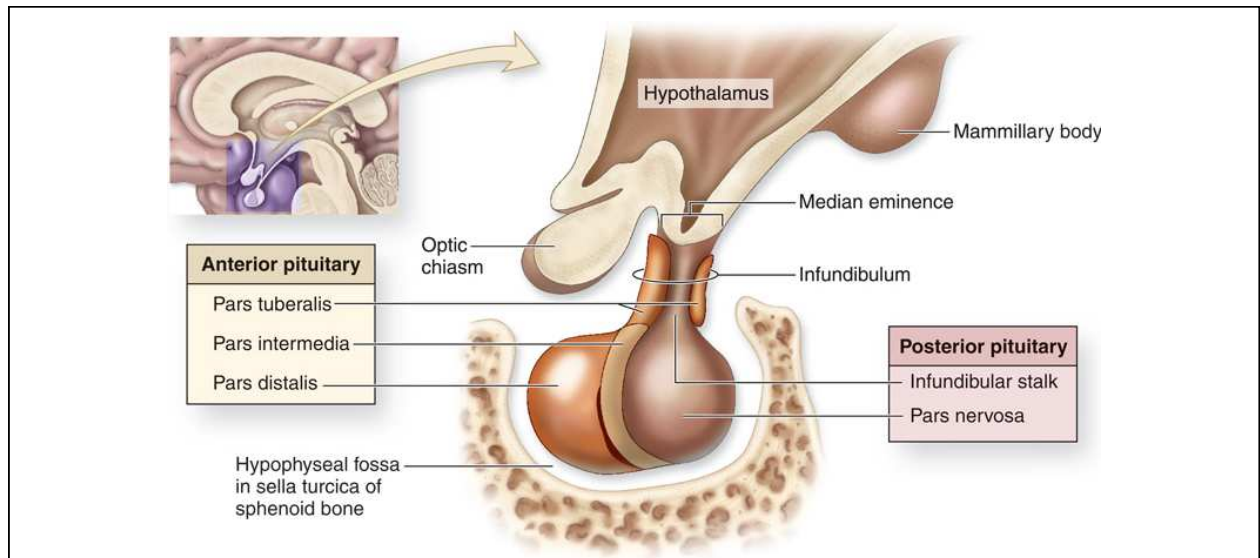


Fig 24: Anatomie de l'hypophyse.

L'hypophyse est localisée au niveau de la selle turcique de l'os sphénoïde et est reliée à l'hypothalamus au niveau du troisième ventricule par la tige pituitaire. Cette glande endocrine est composée d'un lobe antérieur (adénohypophyse) et d'un lobe postérieur (neurohypophyse) séparés par le lobe intermédiaire.

I.1. L'hypophyse.

I.1.a. La neurohypophyse.

Le lobe postérieur de l'hypophyse ou neurohypophyse est une structure de type nerveuse. Les fibres nerveuses qui la composent correspondent aux prolongements axonaux de neurones dont le corps cellulaire est localisé au niveau de l'hypothalamus. Ainsi, les neurohormones sécrétées par le lobe postérieur sont en réalité synthétisées par des cellules nerveuses hypothalamiques spécialisées. Deux hormones sont sécrétées par la neurohypophyse : i) La vasopressine, (hormone antidiurétique ADH), régule la diurèse (inhibition) et la tension artérielle (effet vasoconstricteur). ii) L'ocytocine joue un rôle primordial chez la femme enceinte en régulant les contractions utérines lors de l'accouchement. Cette hormone stimule également les contractions des cellules myoépithéliales du sein.

I.1.b. Le lobe intermédiaire.

Le lobe intermédiaire sépare les deux lobes principaux de l'hypophyse. Il est composé d'une seule population de cellules endocrines sécrétant la « Melanocyte-Stimulating Hormone » (MSH).

I.1.c. L'adénohypophyse.

Le lobe antérieur ou adénohypophyse regroupe la majorité des cellules endocrines de l'hypophyse. Il se prolonge vers la tige pituitaire par la « pars tuberalis » (Figure 25).

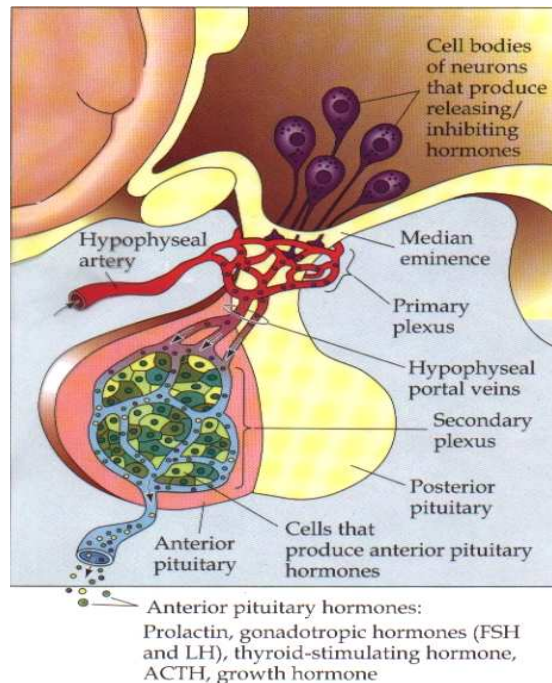


Fig 25: Anatomie de l'adénohypophyse et de son système circulatoire.

Les neurohormones hypothalamiques régulant la sécrétion des hormones adénohypophysaires sont libérées dans les veines hypophysaires supérieures composant le plexus primaire. Au sortir de la tige pituitaire, il se forme un second réseau de capillaires ou plexus secondaire qui irrigue l'adénohypophyse et se collecte en une veine hypophysaire, drainant les hormones adénohypophysaires GH, PRL, ACTH, LH/FSH et TSH.

Six hormones sont synthétisées et sécrétées par des cellules endocrines spécialisées de l'adénohypophyse, dont la GH et des hormones trophiques (trophiques car elles agissent sur d'autres glandes endocrines, contrairement à la GH qui peut agir directement sur ses tissus-cibles) : l'hormone thyroïdienne (TSH) qui régule la synthèse des hormones thyroïdiennes ; l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) qui stimule la synthèse des corticostéroïdes ; l'hormone folliculo-stimulante (FSH) qui régule la gamétogenèse; l'hormone lutéinisante (LH) qui régule la production d'androgènes et d'oestrogènes/progestérone; FSH et LH régulent la maturation du follicule ovarien ; la prolactine (PRL ou LTH) qui stimule la mammogénèse et la production de lait.

I.2. Les cellules somatotropes.

Les cellules somatotropes (cellules GH) synthétisent et sécrètent la GH, et représentent la principale source de GH plasmatique. La GH est également synthétisée par de nombreux tissus de l'organisme (synthèse ectopique) et l'expression de son récepteur GH-R est ubiquitaire.

Les cellules GH sont majoritaires au sein de l'adénohypophyse (40-60% des cellules endocrines). Une étude à laquelle j'ai participé montre que les cellules somatotropes ne sont pas distribuées aléatoirement parmi les autres types cellulaires endocrines de l'adénohypophyse ((Bonfont X *et al.* 2005) et le chapitre publications) (Figure 26) . En effet, elles sont reliées entre elles par des contacts cellulaires cellules GH / cellules GH, formant un véritable réseau tridimensionnel (3D) à grande échelle au sein de l'hypophyse (Bonfont X *et al.* 2005). Ce réseau est composé d'amas de cellules GH, ainsi que de cordons unicellulaires (alignement de plusieurs cellules GH en file indienne). Cette organisation tridimensionnelle évolue de l'embryon au stade adulte, en relation avec la sécrétion de GH. Bien que la fonction précise de ce réseau GH soit encore mal définie, une telle organisation des cellules somatotropes est nécessaire pour une sécrétion de GH optimale.

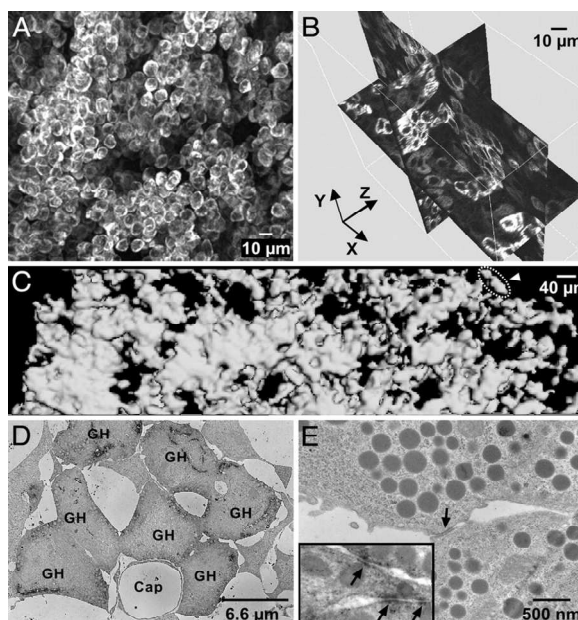


Fig 26: L'organisation 3D en réseau des cellules GH.

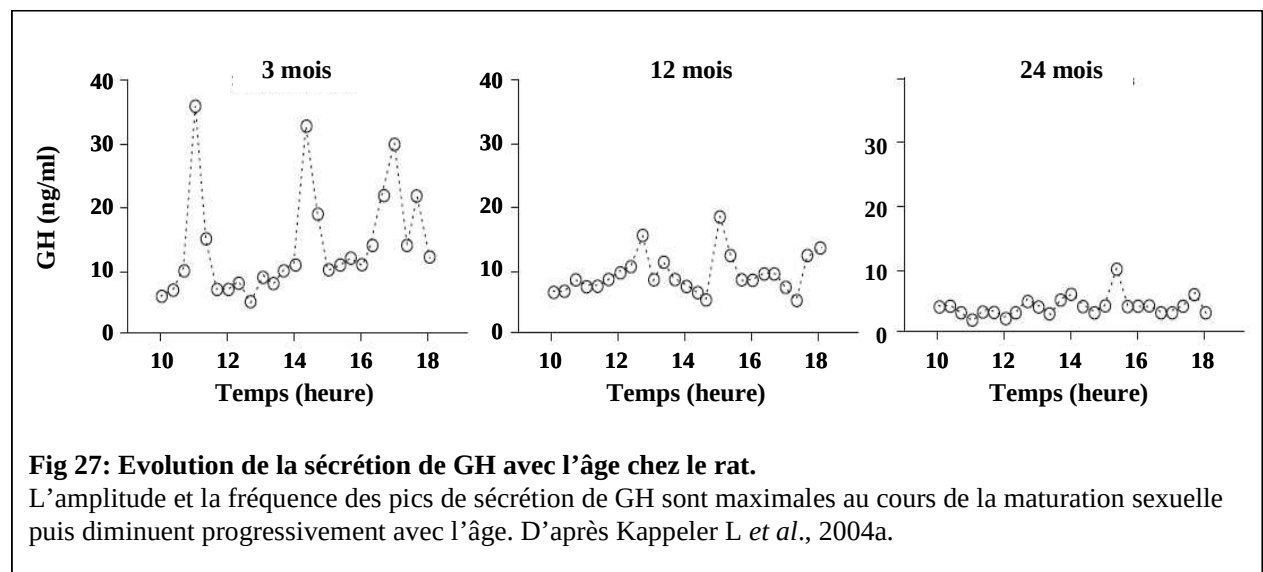
A. Image d'un « stack » de cellules GH (70 µm d'épaisseur) obtenue par microscopie bi-photonique. **B.** Le même « stack » analysé par « 3D orthogonal slicing ». **C.** Représentation à l'échelle de l'hypophyse entière de l'organisation 3D des cellules GH. **D,E.** Images de microscopie électronique montrant les contacts cellulaires entre cellules GH. D'après Bonfont X *et al.* 2005.

II. Régulation de la sécrétion de GH.

II.1. Caractéristiques de la sécrétion de GH.

Une des caractéristiques principales de la sécrétion de GH est son évolution au cours de la vie d'un individu. Bien que la GH ne semble pas impliquée directement dans la croissance du fœtus, celle-ci est synthétisée par l'hypophyse dès le stade embryonnaire (70^{ème} jour chez l'homme, E15-E16 chez la souris et le rat) (Begeot M *et al.* 1977). Chez l'homme et les rongeurs, la sécrétion de GH augmente fortement juste après la naissance, puis revient à un niveau faible jusqu'à la puberté. Pendant cette période de maturation sexuelle, la sécrétion de GH est maximale puis celle-ci diminue progressivement avec l'âge (Figure 27).

La GH sécrétée par les cellules somatotropes correspond à de la GH néo-synthétisée ou stockée dans des granules de sécrétion, permettant une libération d'hormone en grande quantité sur un temps très court. La sécrétion de GH n'est pas continue dans le temps mais pulsatile : elle est caractérisée par une sécrétion basale ponctuée par des pics de sécrétion. Le niveau plasmatique de GH reflète ces épisodes transitoires de sécrétion. Ce profil de sécrétion particulier est indispensable pour une action biologique optimale de la GH.



Les pics de sécrétion de GH ne sont pas aléatoirement distribués dans le temps, même s'il existe une variabilité entre individus (variabilité très faible chez les rongeurs dans les conditions d'élevage en animalerie). L'amplitude et la fréquence des pics de sécrétion varient en fonction de nombreux paramètres physiologiques comme l'activité physique, le sommeil, le stress, la prise alimentaire... La sécrétion de GH est finement régulée par de nombreux

acteurs périphériques et centraux, et notamment par les sécrétagogues hypothalamiques « Growth Hormone-Releasing Hormone » (GHRH) et « Somatotropin- Releasing Inhibiting Factor » (SRIF).

II.2. Les sécrétagogues hypothalamiques GHRH et SRIF.

II.2.a. GHRH.

Le GHRH ou GRF (« GH-Releasing Factor ») est synthétisé dans des neurones hypothalamiques spécialisés, localisés principalement au niveau de l'ARC, et à un moindre degré au niveau de l'hypothalamus ventro-médian (VMH) (Bloch B *et al.* 1983). Ce neuropeptide est sécrété dans le système circulatoire hypophysaire à partir de terminaisons nerveuses localisées au niveau de la pars tuberalis. Le GHRH est également synthétisé dans d'autres tissus périphériques et au niveau de l'hypophyse où il pourrait agir au niveau local (action paracrine/autocrine) sur la régulation de la sécrétion de GH (Rauch C *et al.* 1995).

In vivo, le GHRH stimule la synthèse et la sécrétion de GH, ainsi que la prolifération et la différenciation des cellules somatotropes. L'absence de GHRH entraîne la suppression de la sécrétion de GH. Le récepteur du GHRH (GHRH-R) appartient à la famille des RCPG. Son activation dans les cellules somatotropes stimule l'expression et l'activation du facteur de transcription Pit-1, impliqué notamment dans la transcription du gène *gh*. Elle provoque également la dépolarisation des cellules GH par l'activation de canaux calciques et potassiques, conduisant à l'exocytose de la GH contenue dans les grains de sécrétion (Barinaga M *et al.* 1985).

II.2.b. SRIF (ou somatostatine).

Le SRIF est synthétisé dans des neurones spécialisés, localisés principalement au niveau des noyaux péri- et paraventriculaires hypothalamiques. Il est également exprimé dans d'autres tissus comme le pancréas, l'estomac et l'intestin. Le SRIF est également, comme le GHRH, synthétisé dans l'hypophyse où il influence la sécrétion de GH par son action paracrine (Pagesy P *et al.* 1989).

Le SRIF est sécrété dans le système porte hypophysaire à partir de terminaisons nerveuses localisées au niveau de la « pars tuberalis ». *In vivo*, ce neuropeptide inhibe la sécrétion de GH mais ne semble avoir aucun effet sur la synthèse de cette hormone et sur la prolifération des cellules somatotropes (Namba H *et al.* 1989). Le récepteur de la somatostatine (stt-R) appartient à la famille des RCPG. A l'heure actuelle, cinq isoformes du

sst-R (sst-1R à sst-5R) ont été décrites, mais seules les isoformes 1, 2 et 5 sont impliquées directement dans la régulation de la sécrétion de GH. L'activation des sst-R et des voies de signalisation sous-jacentes conduit à l'inhibition de la sécrétion de GH, *via* la régulation de canaux potassiques et calciques.

II.1.c. Intégration des signaux GHRH et SRIF par les cellules somatotropes.

Le SRIF et le GHRH inhibe et stimule respectivement la sécrétion de GH, mais le SRIF régule également la réponse des cellules somatotropes au GHRH et réciproquement. Le motif pulsatile caractéristique de la sécrétion de GH est la conséquence d'un équilibre complexe entre ces deux sécrétagogues hypothalamiques.

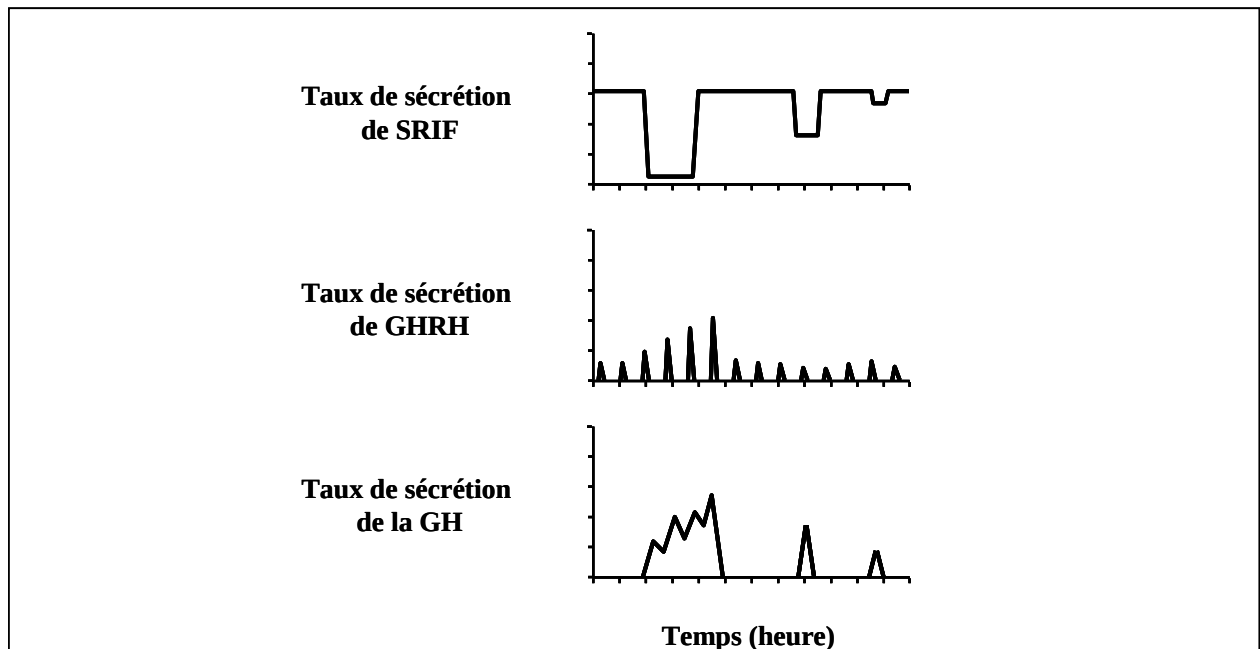


Fig 28: Intégration des signaux GHRH et SRIF par les cellules somatotropes.

Chez l'homme et les rongeurs, la génération des pics épisodiques de GH est le résultat d'une sécrétion de GHRH augmentée, associée à une diminution de la sécrétion de SRIF. Les pics de sécrétion de GH peuvent également résulter d'une sécrétion de GHRH continue, associée à une sécrétion de SRIF diminuée. D'après Harvey S *et al.* 1994.

Chez l'homme et les rongeurs, la génération des pics épisodiques de GH est le résultat d'une sécrétion de GHRH augmentée, associée à une diminution de la sécrétion de SRIF (Figure 28). Le SRIF est considéré comme le principal régulateur de la fréquence des pics de sécrétion. Ainsi un pic de GH peut résulter d'une sécrétion de GHRH continue et inchangée, associée à une sécrétion de SRIF diminuée (Figure 28). Cependant, la persistance d'une

sécrétion pulsatile en absence de SRIF et sous stimulation continue de GHRH suggère que le GHRH peut également induire des phases épisodiques de sécrétion de GH (Harvey S *et al.* 1994). Entre deux pics de sécrétion de GH, la sécrétion de GHRH est faible, tandis que la sécrétion de SRIF est élevée.

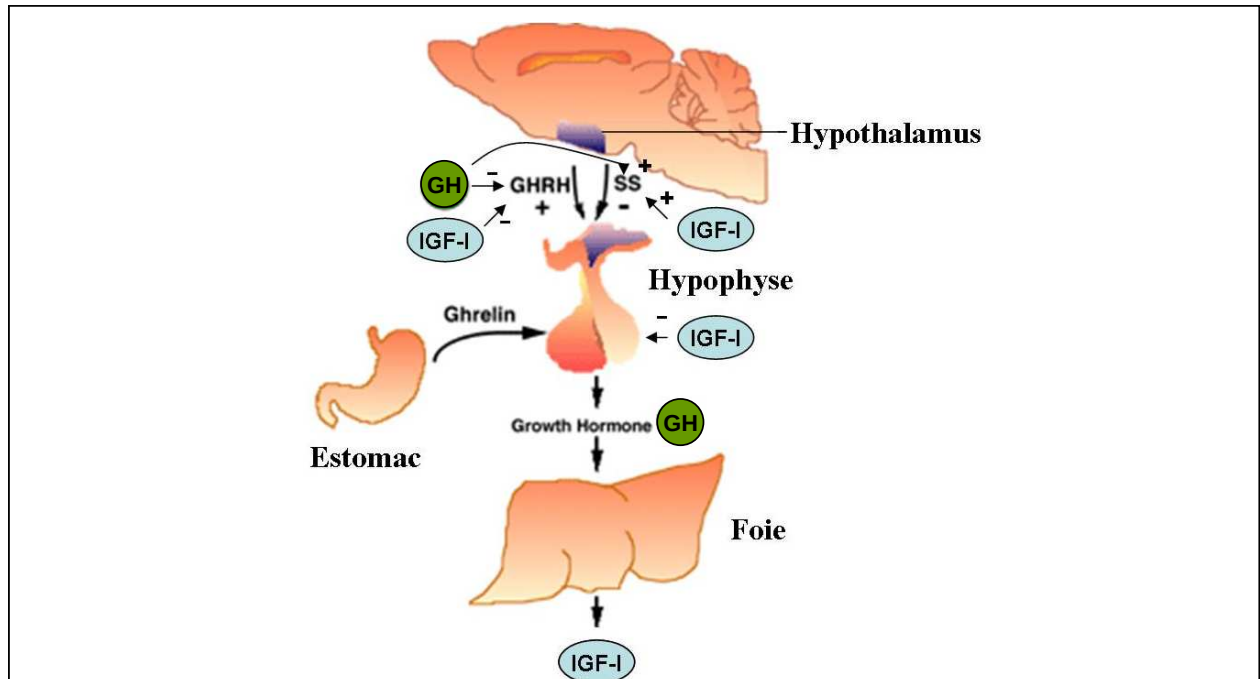


Fig 29: L'axe somatotrope et ses boucles de rétrocontrôle négatif.

Le GHRH et la somatostatine ((SS) ou SRIF) régulent la sécrétion de GH qui en retour inhibe la sécrétion de GHRH et stimule celle de SRIF. La GH stimule la production d'IGF-I qui en retour inhibe la sécrétion de GH au niveau hypophysaire, stimule la sécrétion de SRIF et inhibe celle de GHRH au niveau hypothalamique.

II.3. L'axe somatotrope et les boucles de rétrocontrôle négatif.

L'axe somatotrope (axe GH) est composé des neurones hypothalamiques GHRH et SRIF, des cellules GH et du foie qui sécrète l'«Insulin-like Growth Factor-I» (IGF-I) ou somatomédine C (Figure 29). La GH stimule la sécrétion d'IGF-I. La GH exerce ses effets biologiques directement ou *via* IGF-I, et selon les tissus-cibles la GH et IGF-I agissent en synergie ou au contraire induisent des effets opposés.

IGF-I régule la sécrétion de GH, par un processus de rétrocontrôle négatif. Ainsi, IGF-I inhibe la synthèse et la sécrétion de GH en agissant directement au niveau hypophysaire, ou en stimulant la sécrétion de SRIF et inhibant celle du GHRH au niveau hypothalamique (Sato M et Frohman LA 1993). La GH elle-même effectue une boucle de rétrocontrôle négatif au niveau hypothalamique où elle inhibe la sécrétion de GHRH et stimule celle de SRIF (Figure

29) (Giustina A et Veldhuis JD 1998). Ces systèmes de rétrocontrôle participent fortement à l'établissement de la sécrétion pulsatile caractéristique de la GH.

II.4. Les signaux périphériques.

L'axe somatotrope et la sécrétion de GH sont régulés par de nombreux signaux périphériques. Nous ne détaillerons pas ici ces différents régulateurs, qui sont très bien décrits dans l'excellente revue de Giustina et Veldhuis (Giustina A et Veldhuis JD 1998).

II.5. Nutrition, glycémie, acides gras libres et sécrétion de GH.

II.5.a. La prise alimentaire.

Le statut nutritionnel de l'organisme est l'un des régulateurs de la sécrétion de GH. Chez les rongeurs, la restriction alimentaire induit une forte réduction du taux de GH plasmatique (Janowski BA *et al.* 1993). Cependant, et c'est un point important à préciser pour comprendre les différentes études publiées sur le sujet, la sécrétion de GH est augmentée par la restriction alimentaire chez l'homme, les primates, le lapin, la vache, le porc, le mouton...

Chez l'homme, le niveau de GH plasmatique augmenté par le jeûne est le résultat d'une augmentation de la fréquence et de l'amplitude des pics sécrétion de GH, conséquence d'une augmentation de la sécrétion de GHRH associée à une réduction de celle du SRIF. Bien évidemment, les modifications de la sécrétion de ces sécrétagogues hypothalamiques sont liées aux réarrangements hormonaux et métaboliques associés à la restriction alimentaire.

II.5.b. La glycémie et l'insuline.

L'hypoglycémie stimule la sécrétion de GH chez l'homme tandis que l'hyperglycémie l'inhibe chez l'homme et le rat (Masuda A *et al.* 1985; Harvey S *et al.* 1994). Curieusement, chez la souris la glycémie ne semble pas participer à la régulation de la sécrétion de GH (Harvey S *et al.* 1994). Cet effet du glucose est médié principalement par l'hypothalamus, *via* des neurones sensibles au glucose régulant l'activité des neurones à GHRH et SRIF (Harvey S *et al.* 1994). Le glucose agit également au niveau hypophysaire en inhibant la sécrétion de GH en réponse au GHRH (mais pas la sécrétion basale) dans un modèle de culture de cellules hypophysaires de rat (Renier G et Serri O 1991).

L'insuline, en plus de son action sur la glycémie, participe directement à la régulation de la sécrétion de GH. Cette hormone pancréatique agit au niveau hypothalamique en stimulant la sécrétion de SRIF chez les rongeurs et l'homme (Harvey S *et al.* 1994). Une

action hypophysaire de l'insuline sur la sécrétion de GH reste soumise à controverse, principalement à cause des études contradictoires concernant l'expression hypophysaire du récepteur de l'insuline. Cependant des études ont détecté l'expression du récepteur de l'insuline dans l'hypophyse, et de nombreux résultats convaincants ont été obtenus dans des modèles de culture de cellules hypophysaires (Yamashita S et Melmed S 1986; Luque RM et Kineman RD 2006). Chez le rat, l'insuline augmente la quantité plasmatique d'IGF-I biologiquement active en induisant une diminution des taux plasmatiques de sa « binding-protein », et augmente ainsi la boucle de rétrocontrôle négatif de l'IGF-I sur la sécrétion de GH (Brismar K *et al.* 1994; Frystyk J *et al.* 1995).

II.5.c. Les acides gras libres (FFA).

La GH exerce un effet lipolytique sur le tissu adipeux, induisant une libération de glycérol et de FFA dans la circulation sanguine (Dieguez C et Casanueva FF 1995). Les FFA inhibent en retour la sécrétion de GH chez l'homme et les rongeurs (Imaki T *et al.* 1985; Alvarez CV *et al.* 1991). L'effet des FFA sur la sécrétion de GH est médié par une augmentation de l'expression et de la sécrétion de SRIF au niveau hypothalamique (Imaki T *et al.* 1986). Cependant les FFA agissent principalement sur la sécrétion de la GH au niveau hypophysaire (Casanueva FF *et al.* 1987; Alvarez CV *et al.* 1991).

III. GH et métabolisme.

III.1. GH et contrôle central de la balance énergétique.

GH-R est exprimé au niveau de l'hypothalamus, le site principal de la régulation de la prise alimentaire. Selon les études, l'injection de GH augmente la prise alimentaire chez les rongeurs ou n'a pas d'effet (Clark RG *et al.* 1985; Azain MJ *et al.* 1995). Cette différence peut s'expliquer par le mode d'injection de la GH et soulève la question de la différence entre les effets périphériques et centraux de la GH. La GH est également exprimée au niveau du système nerveux central et plus particulièrement de l'hypothalamus (Hojvatb H *et al.* 1982; Gossard F *et al.* 1987). Une étude récente montre que les souris transgéniques surexprimant la GH au niveau central sont caractérisées par une augmentation de la prise alimentaire conduisant à l'obésité. Ces souris sont également caractérisées par une augmentation de l'expression hypothalamique de AgRP et NPY (Bohlooly-Y M *et al.* 2005). Ces données montrent l'impact de la GH sur la régulation de la balance énergétique et l'interconnection entre cette hormone et le réseau des neuropeptides orexigènes.

Les souris GH-R KO présentent un phénotype complexe. En plus d'un défaut de croissance et d'un retard de la maturité sexuelle, leur niveau de GH plasmatique est élevé tout au long de leur vie (Zhou Y *et al.* 1997; Chandrashekar V *et al.* 1999; Coschigano KT *et al.* 2000). Ces souris sont également caractérisées par une augmentation de la prise alimentaire, des taux circulants de leptine et de la masse grasse. (Berryman DE *et al.* 2004). Chez l'homme adulte, les patients atteints par une déficience en GH sont plus sensibles à l'obésité que les individus sains ; le traitement de remplacement de la GH induit une baisse de la masse grasse chez ces malades (Bengtsson BA *et al.* 1993), et de façon contradictoire une augmentation de la prise alimentaire (Snel Y *et al.* 1995).

III.2. GH et métabolisme glucidique.

La GH a un effet anti-insuline, chez les rongeurs et chez l'homme, excepté dans certains cas particuliers (Press M 1988). Les acromégales sont même diabétiques. Tandis que l'insuline stimule la lipogenèse et l'utilisation du glucose, la GH stimule la lipolyse et participe au maintien de la concentration plasmatique en glucose.

Chez l'homme, l'injection de GH entraîne, après une action « insulin-like » transitoire (baisse du taux de glucose), une réduction de la sensibilité de l'organisme à l'insuline (par l'inhibition des substrats des récepteurs à insuline IRS1 et IRS2 et de la synthèse des transporteurs de glucose GLUT-1 et GLUT-4 (Smith TR *et al.* 1997)). Par voie de conséquence, le taux de glucose circulant augmente et l'utilisation du glucose par le muscle squelettique notamment diminue. La GH stimule également la production de glucose par le foie en stimulant la glycogénolyse, directement ou *via* la stimulation de la production de glucagon par le pancréas. Ainsi, chez l'homme, l'augmentation de la sécrétion de GH au cours du jeûne tend à prévenir la réduction des taux plasmatiques de glucose.

IGF-I a, contrairement à la GH, une action « insulin-like » permanente et est donc, en plus du médiateur de la GH dans la croissance, un modulateur des effets de la GH sur le métabolisme. Cependant, même si l'injection d'IGF-I chez l'homme réduit la résistance à l'insuline induite par la GH (Hussain M *et al.* 1994), les experts s'accordent pour dire que la quantité plasmatique d'IGF-I biologiquement active dans des conditions physiologiques standard ne semble pas suffisante pour avoir une action significative sur l'utilisation du glucose par les tissus (Harvey S *et al.* 1994).

III.3. GH et métabolisme lipidique.

La GH a une action lipolytique. L'injection de GH chez l'homme et les rongeurs entraîne une augmentation des FFA et du glycérol dans le sang (Copeland KC et Nair KS 1994). La GH inhibe en parallèle le stockage des triglycérides dans le tissu adipeux. Dans l'ensemble des tissus périphériques, elle stimule l'oxydation des FFA circulants.

Chez l'homme et les rongeurs, l'injection aiguë d'IGF-I stimule le stockage des FFA et la différenciation/prolifération adipocytaire. Cependant, l'infusion continue d'IGF-I semble avoir un effet lipolytique comme la GH, suggérant que contrairement au métabolisme glucidique, la GH et IGF-I ont une action synergique sur le métabolisme lipidique (Hussain M *et al.* 1994).

III.4. GH et métabolisme protéique.

La GH a un effet anabolique sur le métabolisme protéique. Ainsi, chez les rongeurs et chez l'homme, la GH stimule l'absorption des acides aminés par les cellules des tissus périphériques, notamment le muscle squelettique où elle stimule également l'activité transcriptionnelle. Chez les patients atteints de déficience en GH, le traitement de remplacement de la GH induit une augmentation de la synthèse protéique dans l'ensemble des tissus (Russell-Jones D *et al.* 1993).

L'administration d'IGF-I (injection aiguë ou par infusion) induit une augmentation de la synthèse protéique dans les tissus-cibles (Fryburg D 1994; Russell-Jones D *et al.* 1994). Concernant le métabolisme protéique, IGF-I et GH agissent en synergie, et l'hormone de croissance induit ses effets directement ou *via* IGF-I.

- La sécrétion de GH et son action sur le métabolisme -

- La GH est synthétisée et sécrétée principalement par les cellules somatotropes de l'adénohypophyse. Ces cellules sont organisées en un réseau 3D à grande échelle au sein du parenchyme adénohypophysaire.

- La sécrétion de GH est pulsatile et cette pulsatilité est indispensable pour son action physiologique optimale. La GH peut agir sur ses tissus cibles directement ou *via* la synthèse d'IGF-1 par le foie.

- La sécrétion de GH est régulée principalement par les sécrétagogues hypothalamiques GHRH (stimulateur) et SRIF (inhibiteur), et par de nombreux autres facteurs agissant au niveau hypothalamique sur ces sécrétagogues ou au niveau des cellules somatotropes directement.

- La GH et IGF-1 inhibent la sécrétion de GH par un mécanisme de rétrocontrôle négatif.
- La restriction alimentaire inhibe la sécrétion de GH chez les rongeurs tandis qu'elle la stimule chez l'homme. L'hypoglycémie stimule la sécrétion de GH chez l'homme tandis que l'hyperglycémie l'inhibe chez l'homme et le rat. L'insuline inhibe la sécrétion de GH chez l'homme et les rongeurs en agissant au niveau hypothalamique, hypophysaire, et en augmentant la quantité d'IGF-1 biologiquement active et son rétrocontrôle. Les acides gras libres inhibent également la sécrétion de GH chez l'homme et les rongeurs.
- La GH est impliquée dans le contrôle de la balance énergétique et régule la prise alimentaire en agissant au niveau de l'hypothalamus. Chez l'homme, la GH a effet anti-insuline et participe au maintien de la concentration plasmatique en glucose. La GH a une action lipolytique chez l'homme et les rongeurs, et inhibe le stockage des triglycérides dans le tissu adipeux. Elle favorise également l'oxydation des FFA circulants comme source d'énergie dans l'ensemble des tissus. La GH a un effet anabolique sur le métabolisme protéique, chez l'homme et les rongeurs.

IV. La leptine et l'axe somatotrope.

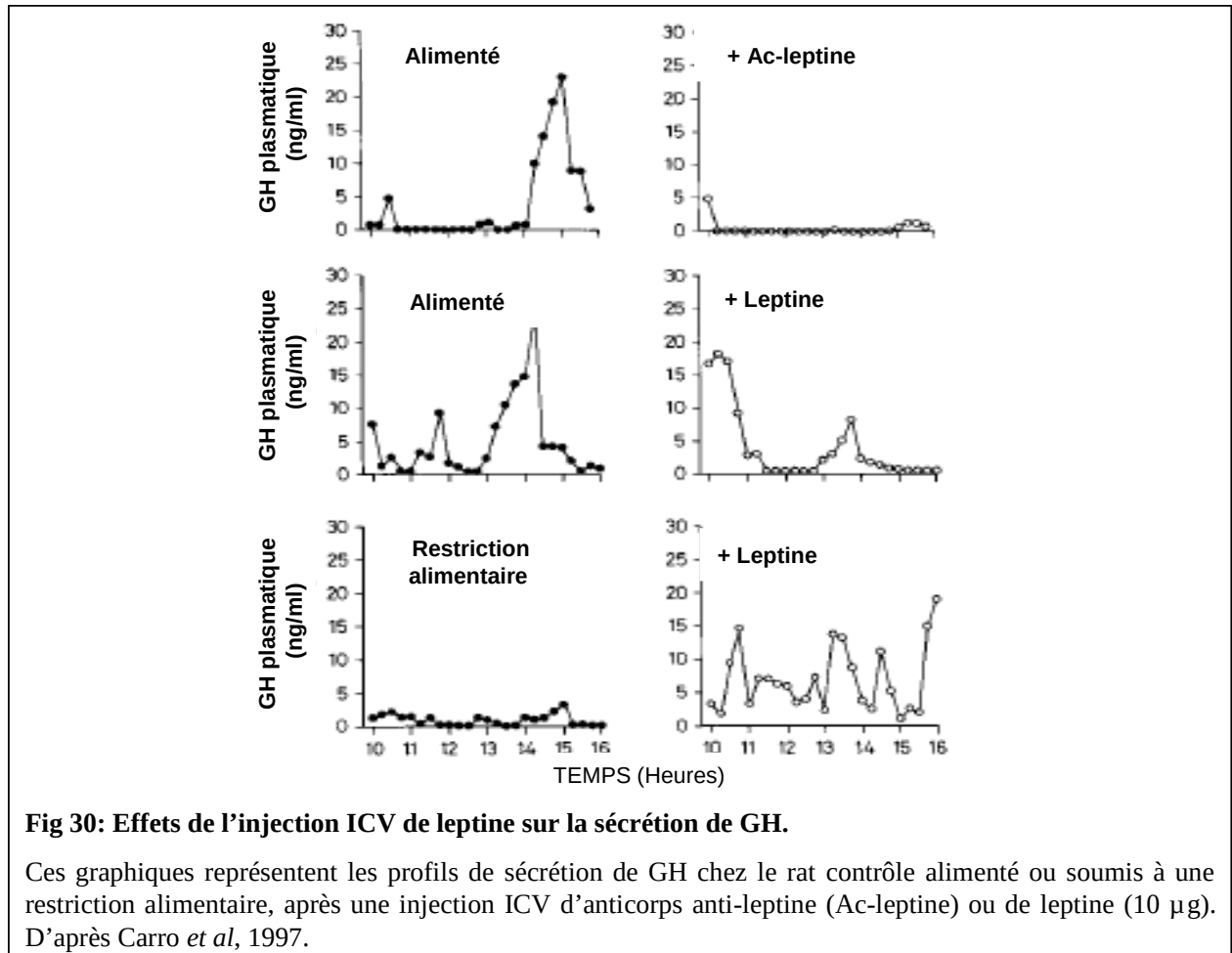
La leptine régule la sécrétion de GH, et ce fait est communément admis par l'ensemble de la communauté scientifique (Casanueva FF et Dieguez C 1999; Ahima RS et Flier JS 2000). Cependant, cette régulation est un phénomène complexe à étudier et il existe de nombreuses informations contradictoires, notamment sur le mode d'action de la leptine sur la sécrétion de GH. Les variations obtenues entre les différentes études dépendent principalement du modèle animal utilisé, des conditions nutritionnelles et du mode d'administration de la leptine

.

IV.1. Leptine et sécrétion de GH.

Chez le rat alimenté, l'infusion ICV de leptine pendant sept jours (1.2 µg/jour) augmente l'amplitude des pics de GH et la réponse au GHRH, tandis que l'injection ICV aiguë de leptine n'induit pas de modification de la sécrétion de GH (Carro E *et al.* 1997; Tannenbaum GS *et al.* 1998). Cependant, une seule injection ICV d'anticorps anti-leptine (immuno-neutralisation) induit une baisse de la sécrétion spontanée de GH (Figure 30) (Carro E *et al.* 1997). Chez le rat soumis à une restriction alimentaire de trois jours, la sécrétion de GH disparaît, mais l'injection ICV de leptine (10 µg/jour pendant les trois jours de restriction) prévient la baisse de GH (Figure 30) (Carro E *et al.* 1997; Vuagnat B *et al.* 1998). Ces

données suggèrent que la leptine stimule la sécrétion de GH chez le rat, mais que la concentration endogène de cette hormone adipocytaire exerce un effet maximal dans des conditions standard. L'action de la leptine sur la GH est donc dépendante du statut métabolique de l'animal (alimenté *versus* en restriction alimentaire).



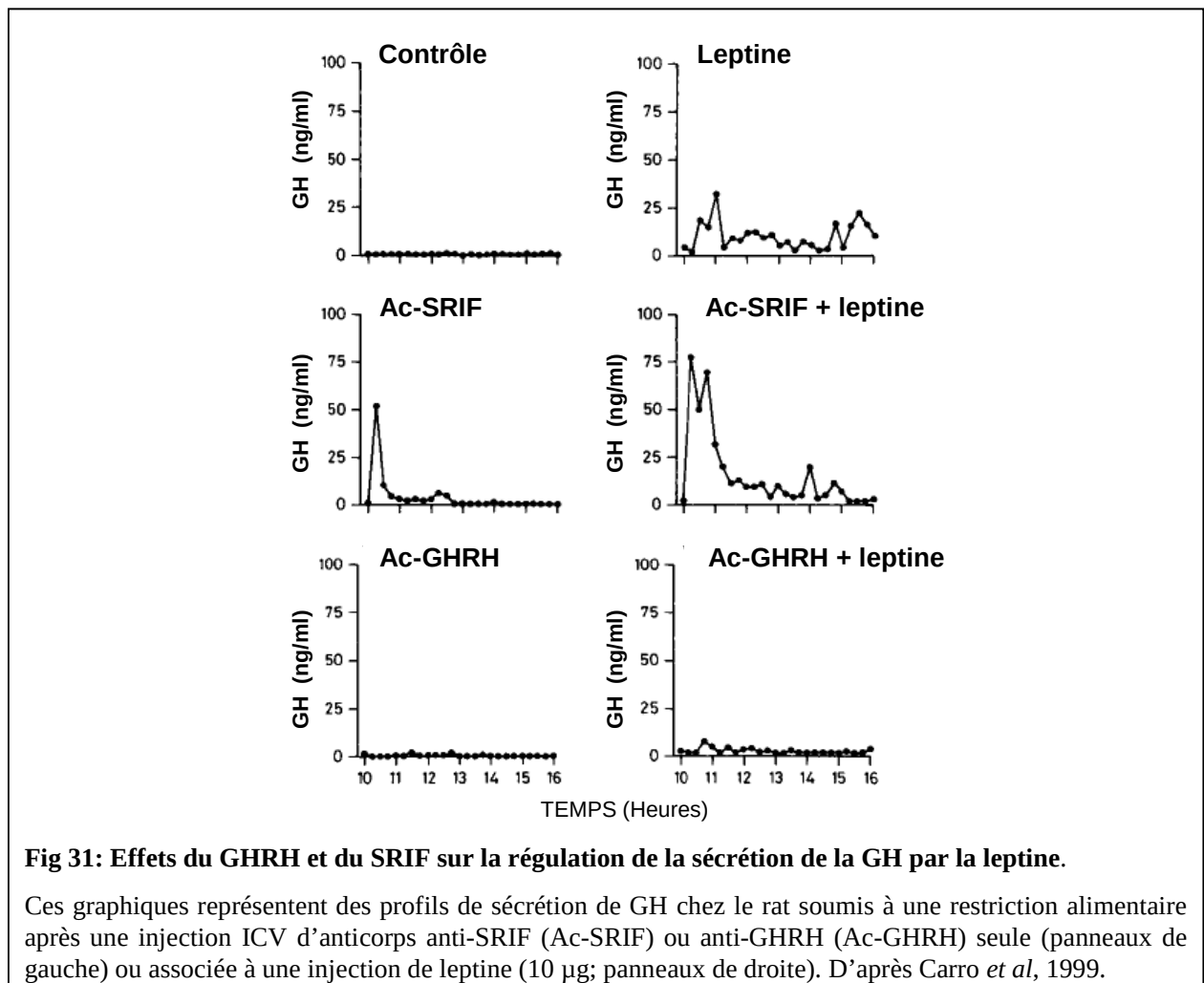
Chez l'homme, la restriction alimentaire stimule la sécrétion de GH, et logiquement la leptine semble avoir un effet inhibiteur sur sa sécrétion (Roh S-G *et al*. 2001). Cependant, la synthèse et la sécrétion de GH sont altérées chez les rongeurs et les patients atteints d'une déficience en leptine ou en récepteur de la leptine, suggérant un effet stimulateur de cette hormone adipocytaire sur la sécrétion de GH (Tannenbaum GS *et al*. 1990; Clement K *et al*. 1998; Ozata M *et al*. 1999).

IV.2. Mode d'action de la leptine sur la sécrétion de GH.

Il existe de nombreuses informations contradictoires dans ce domaine. Si l'action hypothalamique de la leptine dans la régulation de la sécrétion de GH fait consensus, un effet direct au niveau hypophysaire reste soumis à controverse.

IV.2.a. Au niveau hypothalamique.

ObRb est exprimé au niveau de l'ARC, du VMH et du PVN, où sont localisés principalement les corps cellulaires des neurones à GHRH et SRIF (Jacobowitz D *et al.* 1983; Kiyama H et Emson P 1990). Il existe logiquement un lien entre la leptine et ces deux sécrétagogues hypothalamiques.



Chez le rat soumis à une restriction alimentaire, l'injection ICV d'anticorps anti-GHRH bloque l'effet stimulateur de la leptine sur la sécrétion GH, tandis que l'injection

d'anticorps anti-SRIF le stimule (Figure 31) (Carro E *et al.* 1999). Chez les rats hypophysectomisés (absence du rétrocontrôle négatif hypothalamique de la GH), l'injection ICV de leptine induit une augmentation de l'expression du GHRH et une diminution de l'expression de SRIF (Carro E *et al.* 1999). Dans un modèle de culture primaire de neurones hypothalamiques, la leptine inhibe l'expression de SRIF et sa sécrétion (Quintela M *et al.* 1997).

Le neuropeptide NPY joue un rôle prépondérant dans la régulation de la sécrétion de GH. Comme nous l'avons vu, la leptine inhibe la synthèse et la sécrétion de NPY au niveau de l'ARC. Chez le rat alimenté, l'injection ICV de NPY induit une suppression totale ou partielle de la sécrétion de GH, mais il existe des données contradictoires dans la littérature (Rettori V *et al.* 1990; Pierroz DD *et al.* 1996). Chez le rat en restriction alimentaire, l'injection ICV de NPY inhibe l'effet de la leptine sur la sécrétion de GH (Carro E *et al.* 1998). Les neurones NPY de l'ARC sont connectés aux neurones SRIF du PVN et l'injection de NPY stimule la sécrétion de SRIF au niveau de la tige pituitaire (Hisano S *et al.* 1990; Rettori V *et al.* 1990). Il existe également un lien fonctionnel entre les neurones NPY et les neurones GHRH. L'injection ICV de NPY induit une diminution de l'expression de GHRH chez le rat et la souris contrôles (Raposinho PD *et al.* 2001). Cependant, l'expression du GHRH n'est pas altérée chez les souris *ob/ob* malgré l'expression de NPY élevée, suggérant que la relation entre NPY et GHRH est dépendante du statut métabolique (Luque RM *et al.* 2006b; Luque RM et Kineman RD 2006). Ainsi, l'inhibition des neurones NPY par la leptine induit une augmentation de la sécrétion de GH en stimulant l'expression de GHRH et en inhibant la sécrétion de SRIF.

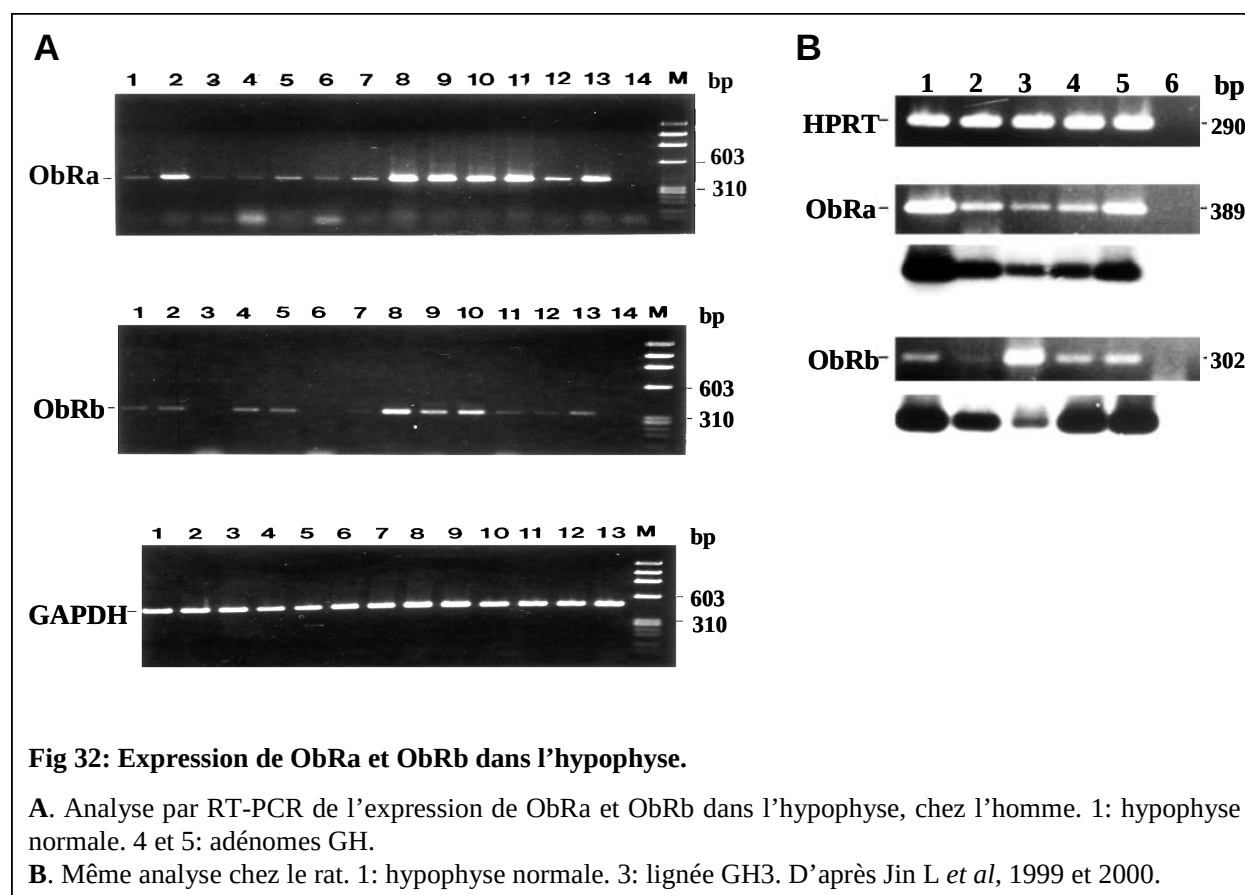
IV.2.b. Au niveau hypophysaire.

L'action de la leptine sur la sécrétion de GH, directement au niveau hypophysaire, est soumise à controverse, principalement à cause de la variété des données existantes sur l'expression hypophysaire du récepteur de la leptine. Ainsi, si l'expression de l'isoforme courte ObRa au niveau de l'hypophyse est généralement admise, la présence de ObRb dans cette glande endocrine fait débat. Dans tous les cas, il ne faut surtout pas oublier les nombreuses évidences concernant la capacité de ObRa à activer des voies de signalisation en réponse à la leptine, même si la majorité de ces études ont été réalisées *in vitro*. ObRa peut *via* la voie IRS/PI3K réguler l'activation de canaux potassiques, le système NO, ainsi que la quantité d'AMPC, des composants majeurs du processus de sécrétion de la GH. La capacité de

ObRa à induire des voies de signalisation *in vivo* dans les cellules somatotrophes n'a pas été étudiée jusqu'à présent.

Expression hypophysaire de ObR.

Chez l'homme, l'équipe de Lloyd a mis en évidence, par RT-PCR et hybridation *in situ*, l'expression de ObRa et ObRb dans l'hypophyse adulte et dans les adénomes GH (Jin L *et al.* 1999) (Figure 32). Ces résultats ont été confirmés par un autre groupe de recherche (Dieterich K et Lehnert H 1998). De façon contradictoire, l'équipe de Melmed a montré que si ObRa est exprimé dans l'hypophyse à tous les âges, ObRb n'est exprimé qu'au stade fœtal et est absent chez l'adulte, excepté dans les adénomes GH (Shimon I *et al.* 1998).



Chez le rat, ObRa et ObRb sont exprimés dans l'hypophyse fœtale et adulte (Figure 32) (Morash B *et al.* 1999; Jin L *et al.* 2000; Morash B *et al.* 2001). ObRb est exprimé dans l'adénohypophyse de souris adultes (Cai A et Hyde JF 1998). Chez la brebis et le porc, ObRb et ObRa sont exprimés au niveau hypophysaire (Dyer CJ *et al.* 1997; Lin J *et al.* 2000).

Par la technique d'immuno-marquage, en utilisant un anticorps reconnaissant l'ensemble des isoformes de ObR, l'équipe de Clarke a mis en évidence une expression d'ObR dans environ 70% des cellules GH chez le mouton (Iqbal J *et al.* 2000). Chez le rat, l'équipe de Osamura a montré l'expression de ObR dans 90% des cellules GH (Sone M *et al.* 2001).

Action directe de la leptine sur les cellules somatotropes :

Chez l'homme, la leptine stimule la sécrétion de GH dans des cultures d'hypophyses fœtales (Shimon I *et al.* 1998).

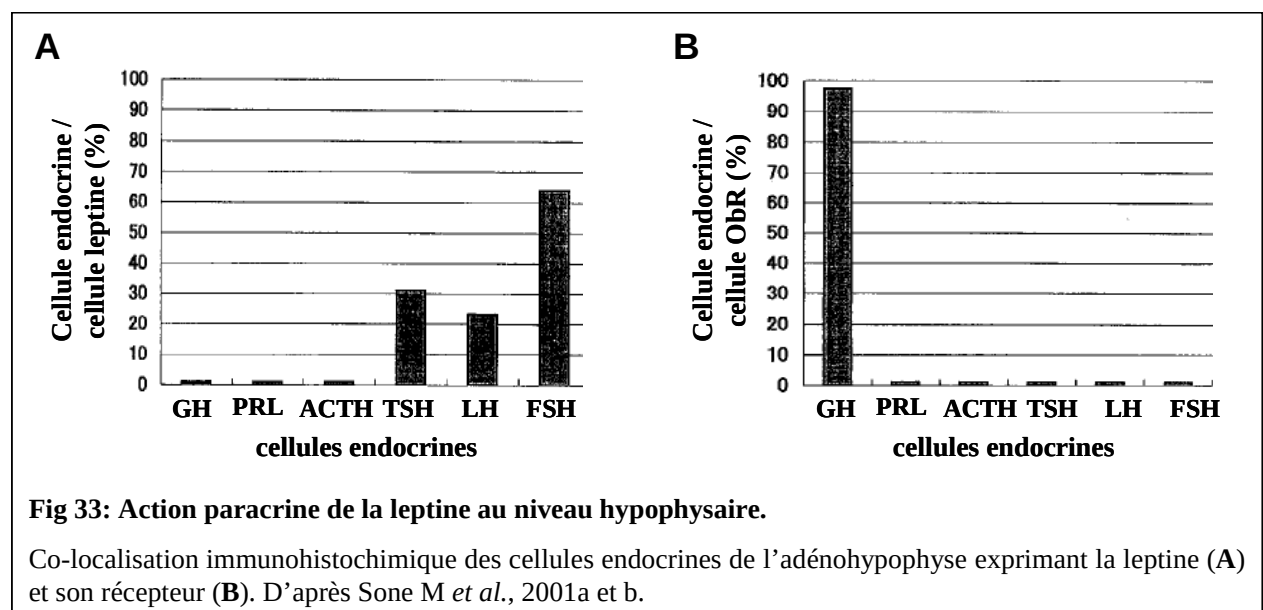
Chez le rat, la leptine (20 µg/mL) stimule la sécrétion basale de GH dans un modèle de culture primaire de cellules adénohypophysaires alors qu'une concentration de 200 µg/mL de leptine n'a aucun effet sur la sécrétion de GH. Cependant ces deux doses de leptine (20 µg/mL et 200 µg/mL) potentialisent la réponse au GHRH (Mizuno I *et al.* 1999). Chez la souris, la leptine (10 et 100 ng/ml) stimule la sécrétion de GH dans un modèle de culture primaire de cellules adénohypophysaires, mais n'a pas d'effet sur l'expression ARNm de la GH (Luque RM *et al.* 2006b).

Chez le porc, la leptine stimule la sécrétion de GH lorsqu'elle est appliquée sur des tranches d'adénohypophyses ou dans des cultures primaires de cellules hypophysaires isolées (Baratta M *et al.* 2002; Saleri R *et al.* 2004; Saleri R *et al.* 2005). A partir de ce dernier modèle d'étude, d'autres effets de la leptine ont été mis en évidence. La leptine augmente l'expression du gène *gh* et stimule la production de NO même si son action sur la sécrétion de GH semble indépendante de cette voie (Baratta M *et al.* 2002; Saleri R *et al.* 2005). De plus la leptine potentialise l'effet du GHRH sur la sécrétion de GH (Baratta M *et al.* 2002), et la stimulation par le GHRH induit une diminution de l'expression de ObRb (Lin J *et al.* 2003). Ces données suggèrent que le GHRH joue un rôle prépondérant dans la sensibilité des cellules somatotropes à la leptine, et réciproquement.

Chez la vache, dans un modèle de perfusion d'explants d'adénohypophyses obtenus à partir d'animaux alimentés, la leptine (5 ng/mL à 100 ng/mL) inhibe la sécrétion basale de GH, mais potentialise la réponse au GHRH (Zieba DA *et al.* 2003). Dans le cas d'explants d'adénohypophyses obtenus à partir d'animaux soumis à une restriction alimentaire, la sécrétion de GH augmente légèrement pour des concentrations faibles de leptine (<5 ng/mL), tandis que les fortes concentrations (>5 ng/mL) ne semblent pas avoir d'effet ; de plus, la leptine ne potentialise pas l'effet du GHRH dans ces conditions expérimentales (Zieba DA *et al.* 2003). Dans le même modèle animal, la leptine appliquée sur des cultures primaires de

cellules somatotropes (24 h de traitement à 10^{-7} M) inhibe l'expression des gènes *gh* et *ghrh-r*, et donc la réponse au GHRH (Roh S-G *et al.* 2001). Dans les mêmes conditions expérimentales, un traitement de leptine (24 h ; 10^{-7} M) stimule la sécrétion basale de GH, tandis qu'un traitement de 30 min (10^{-7} M) n'a pas d'effet (Roh S-G *et al.* 1998). Il semble donc que chez la vache, la leptine a un effet opposé sur la synthèse de la GH et sur sa sécrétion, et un effet opposé sur la sécrétion basale de GH et en réponse au GHRH.

En conclusion, malgré des données contradictoires selon les modèles animaux et les conditions expérimentales, il existe néanmoins de nombreuses preuves d'une action de la leptine sur la sécrétion de GH, directement au niveau hypophysaire.



IV.2.c. Action paracrine de la leptine hypophysaire sur la sécrétion de GH.

La leptine est exprimée au niveau de l'hypophyse chez l'homme et les rongeurs. Le rôle de cette leptine hypophysaire dans le contrôle de la sécrétion des hormones adénohypophysaires est encore mal défini (Jin L *et al.* 1999; Morash B *et al.* 1999; Jin L *et al.* 2000). La leptine semble exprimée majoritairement dans les cellules TSH et LH/FSH, même s'il existe des données contradictoires (Sone M et Osamura RY 2001) (Figure 33). Selon les mêmes auteurs, le récepteur de la leptine est exprimé dans l'hypophyse au niveau des cellules GH principalement (Sone M *et al.* 2001) (Figure 33). Ces données suggèrent l'existence d'un mécanisme paracrine entre les cellules TSH et LH/FSH produisant la leptine, et les cellules GH exprimant son récepteur. Si un tel mécanisme était vérifié, cet effet paracrine de la leptine hypophysaire pourrait participer à la régulation de la sécrétion de GH, indépendamment du

statut métabolique de l'organisme. Néanmoins, les mécanismes de régulation de la sécrétion de leptine hypophysaire sont à l'heure actuelle inconnus.

- Action de la leptine sur la sécrétion de GH -

- La leptine stimule la sécrétion de GH. Cependant la concentration endogène de leptine semble exercer une action maximale sur la GH dans des conditions standard.

- La leptine agit au niveau hypothalamique en stimulant l'expression de GHRH et en inhibant celle de SRIF. La leptine régule également l'expression de ces sécrétagogues hypothalamiques en agissant *via* les neurones NPY dont l'activation inhibe l'expression de GHRH et stimule celle de SRIF.

- Une action de la leptine directement au niveau hypophysaire reste soumise à controverse. Cependant plusieurs études ont montré que ObRa et ObRb sont exprimés dans l'hypophyse, chez l'homme et les rongeurs. De plus la leptine stimule la sécrétion de GH basale et en réponse au GHRH dans des modèles de cultures primaires d'adénohypophyse.

V. Ghréline et axe somatotrope.

V.1. Découverte de la ghréline.

En plus du GHRH et du SRIF, il existe un acteur majeur de la régulation de la sécrétion de GH : les sécrétagogues de la GH (GHS) (Bowers CY *et al.* 1980; Bowers CY 1998). Les GHS ont été découverts au cours d'études pharmacologiques visant à développer des molécules stimulant la sécrétion de GH, et ils correspondaient à l'origine à des peptides synthétiques dont les plus connus sont le GHRP-6 (« GH-Releasing Peptide-6 ») et l'hexaréline. L'injection intraveineuse de ces peptides stimulent la sécrétion de GH chez l'homme et chez le rat et ils sont encore couramment utilisés dans les laboratoires et en tests cliniques.

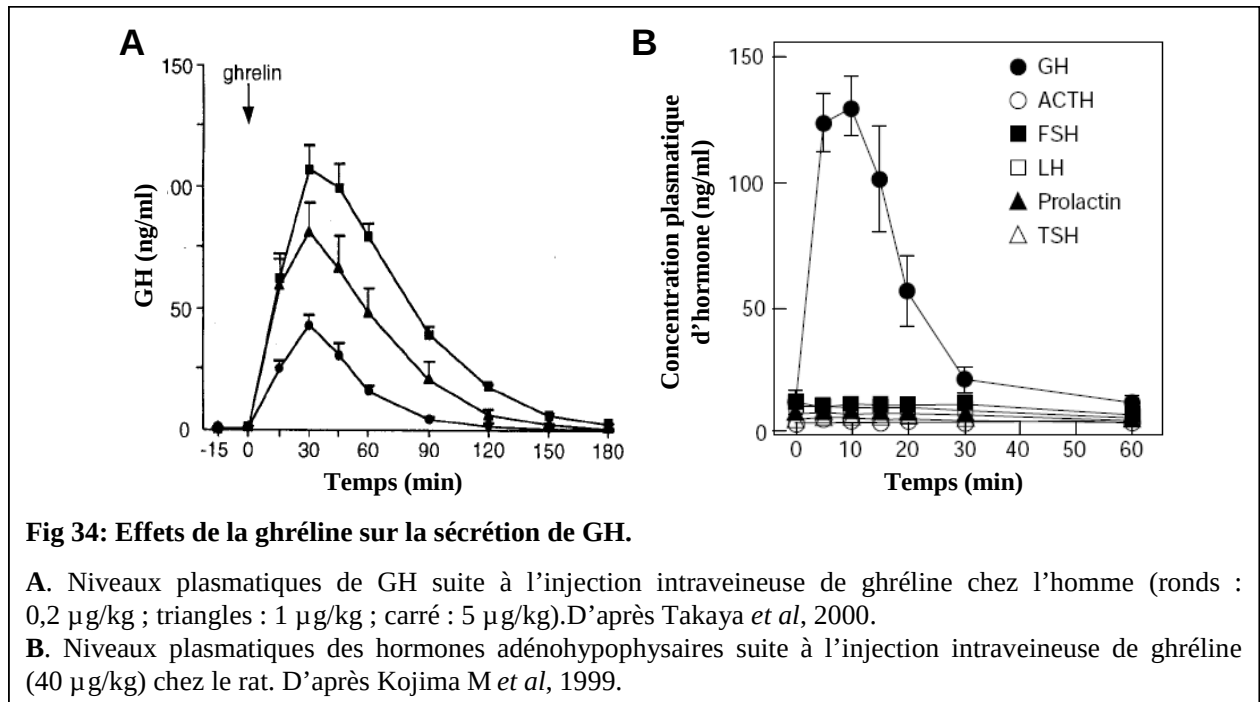
Ce n'est qu'en 1996 que le récepteur des GHS (GHS-R) a été découvert et cloné (Howard AD *et al.* 1996). Le GHS-R appartient à la famille des RCPG et est exprimé principalement au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus (Guan X-M *et al.* 1997). Deux isoformes de ce récepteur ont été décrites, GHS-R1a et 1b, mais seul GHS-R1a semble impliqué dans les effets biologiques de la ghréline. Dans ce manuscrit, nous généraliserons la nomenclature en nommant GHS-R l'isoforme 1a.

Le ligand endogène du GHS-R a été isolé en 1999 et baptisé ghréline (Kojima M *et al.* 1999). Il s'agit d'une hormone synthétisée principalement par l'estomac. A l'origine, cette hormone était uniquement considérée comme un régulateur de la sécrétion de GH. *In vivo*, chez l'homme, la ghréline a comparativement plus d'effet sur la sécrétion de GH que le GHRH (Arvat E *et al.* 2001). Suite à la découverte de la ghréline, la communauté scientifique a rapidement réalisé que cette hormone stomacale joue également un rôle prépondérant dans la régulation de la balance énergétique. La ghréline est également impliquée dans d'autres fonctions biologiques comme la motilité gastrique, l'activité pancréatique, le sommeil ou la fonction cardiovasculaire (pour références : (Horvath TL *et al.* 2001)).

V.2. Ghréline et sécrétion de GH.

L'injection intraveineuse de ghréline induit une augmentation de la sécrétion de GH chez l'homme et le rat (Figure 34) (Kojima M *et al.* 1999; Takaya K *et al.* 2000). Chez ce dernier, l'effet de la ghréline sur la GH est très rapide, se traduisant par une augmentation de la concentration plasmatique de GH cinq minutes après l'injection de ghréline, suivie d'un retour à une concentration initiale au bout d'une heure (Kojima M *et al.* 1999). Néanmoins, il est nécessaire de préciser que chez la souris, l'importance accordée à la ghréline endogène dans la régulation de l'axe GH est diminuée par les données montrant que les souris n'exprimant pas la ghréline ne présentent pas d'altération de la croissance corporelle et des taux circulants d'IGF-I (Sun Y *et al.* 2003). De même, les souris GHS-R KO ne présentent pas d'altération majeure de leur croissance corporelle (Sun Y *et al.* 2004).

L'action de la ghréline sur la GH dépend du profil de sécrétion de cette hormone hypophysaire. Ainsi, l'injection de ghréline n'a que peu d'effet sur la sécrétion basale de GH, mais stimule fortement l'amplitude de ses pics de sécrétion, suggérant une forte relation de la ghréline avec les sécrétagogues hypothalamiques GHRH et SRIF (Tannenbaum GS *et al.* 2003). Le récepteur de la ghréline GHS-R est exprimé dans les cellules somatotropes de l'hypophyse, dans l'ARC, le PVN et le VMH, suggérant une action de la ghréline au niveau hypophysaire et hypothalamique (Guan X-M *et al.* 1997; Gualillo O *et al.* 2003). De plus, chez les patients atteints d'une connexion hypothalamo-hypophysaire altérée, la sécrétion de GH en réponse à l'injection intraveineuse de ghréline est diminuée (Popovic V *et al.* 2003; Casanueva F et Dieguez C 2005).



V.2.a. Action hypothalamique de la ghréline.

Chez le rat, l'injection ICV de ghréline induit une augmentation de la sécrétion GH avec un effet dose-dépendant (Date Y *et al.* 2000). Chez l'homme et le rat, l'action de la ghréline sur la GH est dépendante d'un système GHRH totalement fonctionnel (Pandya N *et al.* 1998). Ainsi chez le rat, l'immuno-neutralisation du GHRH atténue la réponse de la GH à la ghréline (Tannenbaum GS *et al.* 2003). De plus, les neurones GHRH expriment le GHS-R, et l'injection centrale de ghréline chez le rat induit l'activation de *c-fos* (marqueur d'activation neuronale) dans ces neurones (Dickson SL et Luckman SM 1997). Le SRIF est également impliqué dans la médiation des effets de la ghréline sur la GH (Tolle V *et al.* 2001). Cependant, l'équipe de Bowers a montré que, chez le rat, la ghréline semble agir indirectement sur les neurones SRIF, ceci malgré les données montrant l'expression du GHS-R dans ces neurones (Tannenbaum GS *et al.* 2003).

Chez le rat alimenté ou en restriction alimentaire, l'injection ICV de ghréline n'induit pas de modification de l'expression des sécrétagogues hypothalamiques GHRH et SRIF (Seoane LM *et al.* 2003). Cependant, la GH régulant également l'expression de GHRH et SRIF (boucle de rétrocontrôle négatif), il est possible que l'impact de l'injection ICV de ghréline sur l'augmentation de la GH plasmatique masque les effets de la ghréline sur l'expression de ces neuropeptides. En utilisant le rat Dwarf comme modèle d'étude, rat caractérisé par une déficience en GH et donc par une absence de son rétrocontrôle, l'équipe de Dieguez a montré que la ghréline stimule l'expression de SRIF au niveau du PVN (Seoane

LM *et al.* 2003). La ghréline stimulant la sécrétion de GH, et le SRIF l'inhibant, ce résultat peut sembler surprenant, mais le modèle animal utilisé est un cas particulier (absence de GH et donc faible expression basale de SRIF). Il faut simplement retenir que la ghréline peut agir sur l'expression hypothalamique de SRIF et nous reviendrons plus en détails sur ce résultat dans le chapitre V.4.

L'action hypothalamique de la ghréline sur la sécrétion de GH apparaît minime compte tenu des travaux de l'équipe de Wakabayashi. En effet, les rats dont l'expression du GHS-R est inhibée spécifiquement (RNAi) au niveau de l'ARC ne présentent pas de modification significative de l'axe somatotrope. Néanmoins, ces rats sont caractérisés par une baisse de la prise alimentaire et un déséquilibre du métabolisme en général (Shuto Y *et al.* 2002).

V.2.b. Action de la ghréline sur les cellules somatotropes.

La ghréline stimule la sécrétion de GH avec un effet dose-dépendant, dans un modèle de culture primaire de cellules hypophysaires de rat (Kojima M *et al.* 1999). Au niveau des cellules somatotropes, il existe une forte synergie entre ghréline et GHRH, la ghréline potentialisant l'effet du GHRH sur la sécrétion de GH (Cunha SR et Mayo KE 2002). Inversement, la ghréline exerce des actions antagonistes à celles de SRIF et réciproquement (Tannenbaum GS *et al.* 2003).

En plus de son rôle dans le contrôle de la sécrétion de GH, la ghréline régule l'activation du facteur de transcription Pit-1 dans les cellules somatotropes, facteur jouant un rôle prépondérant dans la synthèse de GH et dans la différenciation et la prolifération des cellules GH (Garcia A *et al.* 2001).

V.3. Ghréline et prise alimentaire.

V.3.a. Régulation de la sécrétion de ghréline par la prise alimentaire.

Chez l'homme et les rongeurs, la restriction alimentaire (24 – 48 h) stimule la production de ghréline au niveau de l'estomac (Cummings DE *et al.* 2001; Toshinai K *et al.* 2001). Au contraire, la prise alimentaire est associée à une réduction des taux plasmatiques de ghréline chez ces deux espèces, et la sécrétion de ghréline au cours de la journée est liée aux événements de prise alimentaire chez l'homme (Tschop M *et al.* 2001a). Les niveaux circulants de ghréline augmentent juste avant la prise alimentaire, puis diminuent (Figure 35). Cette augmentation préprandiale suivie de la baisse postprandiale suggère que la ghréline joue

un rôle important dans l'initiation de la prise alimentaire (Cummings DE *et al.* 2001). Mais la différence entre les concentrations plasmatiques de ghréline maximales et minimales est faible (rapport de 2 au maximum), et de nombreux scientifiques s'interrogent sur la valeur physiologique d'une si faible variation, notamment en ce qui concerne l'action hypothalamique de la ghréline (Horvath TL *et al.* 2001).

Il existe une étroite relation entre les taux plasmatiques de ghréline et de leptine. Ces deux hormones sont caractérisées par des rythmes de sécrétion diurnes qui sont superposables (Cummings DE *et al.* 2001) (Figure 35). La leptine stimule la synthèse de ghréline au niveau de l'estomac, même s'il existe des données contradictoires dans ce domaine (Toshinai K *et al.* 2001; Ariyasu H *et al.* 2002).

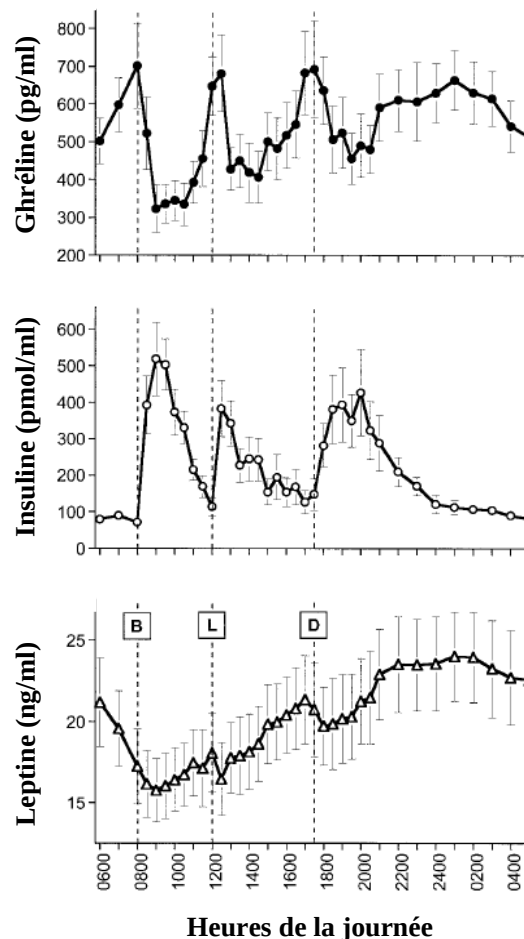


Fig 35: Profils plasmatiques de leptine, insuline et ghréline sur 24 heures chez l'homme.

B : petit déjeuner ; L : déjeuner ; D :diner. D'après Cummings DE *et al.*, 2001.

V.3.b. Ghréline et neuropeptides orexigènes.

L'injection centrale ou périphérique de ghréline stimule la prise alimentaire et le gain de poids chez les rongeurs et l'homme (Tschop M *et al.* 2000), qui peut même conduire à l'obésité chez le rat (Wren AM *et al.* 2001).

La ghréline induit ses effets orexigènes en stimulant au niveau central l'expression des neuropeptides AgRP et NPY principalement (Kamegai J *et al.* 2001b; Nakazato M *et al.* 2001). Bien que l'injection ICV de ghréline ne semble pas réguler l'expression des neuropeptides orexigènes MCH et orexines (Seoane LM *et al.* 2003), elle stimule cependant l'activation des neurones orexines directement, indépendamment du NPY et de l'AgRP (Toshinai K *et al.* 2003; Yamanaka A *et al.* 2003).

L'augmentation de l'expression des neuropeptides NPY et AgRP, induite par l'injection de ghréline, est observée aussi bien chez des rats alimentés ou soumis à une restriction alimentaire. Ceci suggère que l'action de la ghréline sur la régulation de l'expression de NPY/AgRP est en partie indépendante du statut métabolique de l'organisme, bien que l'effet de la ghréline sur ces neuropeptides soit plus important chez les rats soumis à une restriction alimentaire (Seoane LM *et al.* 2003).

La ghréline est également synthétisée au niveau du SNC, dans des neurones hypothalamiques accolés au troisième ventricule (Cowley MA *et al.* 2003). Ces neurones émettent des projections axonales vers d'autres noyaux hypothalamiques et établissent notamment des connexions synaptiques avec les neurones NPY (Cowley MA *et al.* 2003).

V.3.c. Relation entre leptine et ghréline : effets sur la régulation de la balance énergétique.

Les effets de la ghréline et de la leptine sur la prise alimentaire sont opposés, contrairement à ceux observés sur la sécrétion de GH. En plus de cette simple opposition de fonction, ces deux systèmes endocrines interagissent dans la régulation de la balance énergétique. L'injection ICV de leptine inhibe l'expression du GHS-R au niveau des neurones de l'ARC, et supprime leur activation en réponse à la ghréline (Hewson AK *et al.* 2002; Nogueiras R *et al.* 2004). Or l'activation des neurones de l'ARC induite par la ghréline ou les GHS synthétiques est plus importante chez les rats soumis à une restriction alimentaire, associée à des taux plasmatiques de leptine faibles (Hewson AK *et al.* 2002). Ces données suggèrent que la leptine est un inhibiteur de l'action orexigène de la ghréline (Nogueiras R *et al.* 2004). Inversement, l'injection centrale de ghréline active les neurones de l'ARC inhibés par la leptine (Traebert M *et al.* 2002).

V.4. Effets différentiels de la ghréline sur la sécrétion de GH et la prise alimentaire.

La ghréline stimule à la fois la sécrétion de GH et la prise alimentaire. Cependant ces deux systèmes de régulation peuvent être considérés comme partiellement indépendants. En absence d'un système GH fonctionnel (rat Dwarf), la ghréline stimule la production de SRIF, ce qui va à l'encontre de l'effet stimulateur de cette hormone stomacale sur la sécrétion de GH (chapitre V.2.a) (Seoane LM *et al.* 2003). Un tel résultat peut être expliqué par l'action de la ghréline sur la prise alimentaire. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, il existe une relation entre les neurones NPY et SRIF, le NPY stimulant la sécrétion de SRIF (Hisano S *et al.* 1990; Rettori V *et al.* 1990). Cette activation de SRIF par la ghréline chez le rat Dwarf pourrait résulter de l'activation des neurones NPY. Ainsi, l'action de la ghréline sur la prise alimentaire (NPY) semble inhiber la sécrétion de GH (du moins dans un modèle d'étude caractérisé par une absence de GH plasmatique). En utilisant des combinaisons d'antagonistes/agonistes du GHS-R, l'équipe de Thorner a montré que l'effet orexigène de la ghréline peut être dissocié de son effet stimulateur sur la sécrétion de GH. Ces auteurs émettent alors l'hypothèse de l'existence de différents sous-types de GHS-R, exprimés différemment entre les acteurs cellulaires de l'axe GH et ceux de la prise alimentaire (Horvath TL *et al.* 2001; Thorner MO 2001).

De plus, il est possible d'envisager que les effets de la ghréline au niveau hypothalamique soient principalement reliés à la balance énergétique, tandis que ses effets au niveau hypophysaire soient principalement reliés à la sécrétion de GH (voir chapitre V.2.a (Shuto Y *et al.* 2002)). Le fait que la leptine et la ghréline agissent en synergie sur la sécrétion de GH mais de façon antagoniste sur la balance énergétique est également un élément de réflexion pour différencier l'effet orexigénique et stimulateur de la sécrétion de GH de la ghréline. L'existence d'une synthèse endogène de ghréline au niveau de l'hypothalamus, jouant un rôle primordial dans la régulation de la balance énergétique, pose la question de l'importance relative de la ghréline stomacale dans la régulation centrale de la prise alimentaire (Cowley MA *et al.* 2003).

L'ensemble de ces données montre la séparation entre les actions de la ghréline sur la balance énergétique et sur la sécrétion de GH. Cependant, un système GH fonctionnel est nécessaire pour l'action orexigène de la ghréline. Ainsi, les souris GH-R KO sont à l'action de ghréline exogène sur la prise alimentaire (Nass R *et al.* 2004; Egecioglu E *et al.* 2006). De

même, si l'injection ICV de ghréline induit une augmentation de l'expression du GHS-R dans l'ARC, cette augmentation est dépendante de la GH (Nogueiras R *et al.* 2004).

- Effets de la ghréline sur la sécrétion de GH et la régulation de la balance énergétique -

- La ghréline stimule la sécrétion de GH en agissant au niveau hypothalamique sur l'équilibre des sécrétagogues GHRH et SRIF, et directement au niveau hypophysaire. La ghréline stimule l'expression de la GH et régule la différenciation et la prolifération des cellules somatotropes.

- La ghréline stimule également la prise alimentaire en agissant *via* les neuropeptides orexigènes NPY et AgRP. La leptine inhibe l'action orexigène de la ghréline et régule négativement l'expression de GHS-R au niveau de l'ARC.

- La leptine et la ghréline agissent en synergie sur la sécrétion de GH mais de façon antagoniste sur la balance énergétique. Les effets de la ghréline sur la prise alimentaire et sur la sécrétion de GH peuvent être dissociés.

VI. GH et obésité.

Il existe chez l'homme et les rongeurs une corrélation négative entre l'indice de masse corporelle et la sécrétion de GH, en terme de fréquences et d'amplitudes des pics de sécrétion (Veldhuis JD *et al.* 1995; Vahl N *et al.* 1997). L'obésité est ainsi associée à une sécrétion de GH réduite (Tannenbaum GS *et al.* 1990; Veldhuis JD *et al.* 1991). Dans cette pathologie, la sécrétion de GH en réponse aux différents stimuli connus, dont le GHRH et la ghréline, est également altérée (Vanderschueren-Lodeweyck M 1993; Tschop M *et al.* 2001b). De plus, la demi-vie de la GH est réduite chez les patients obèses (Veldhuis JD *et al.* 1995; Vahl N *et al.* 1997). Etant donné l'action lipolytique et anabolique de la GH, une telle altération de sa sécrétion participe à la dégradation de la pathologie obésité, en un « cercle vicieux ».

La diminution de la sécrétion de GH associée à l'obésité est la conséquence de nombreuses modifications endocrines et métaboliques, agissant de concert par des mécanismes complexes et encore mal définis.

VI.1. GH, obésité et les sécrétagogues hypothalamiques GHRH et SRIF.

La sécrétion de GH est contrôlée en partie par les sécrétagogues hypothalamiques GHRH et SRIF (voir chapitre II.2.). Logiquement, l'insuffisance en GH caractéristique de

l'obésité est associée à un déséquilibre de ces deux sécrétagogues. Cependant, la contribution relative du GHRH et du SRIF dans ce déséquilibre est mal définie. Il existe de nombreux résultats contradictoires concernant les caractéristiques des sécrétagogues GHRH et SRIF dans la pathologie obésité, et l'ensemble de ces données est décrit dans les revues suivantes (Harvey S *et al.* 1994; Maccario M *et al.* 2000; Scacchi M *et al.* 2000).

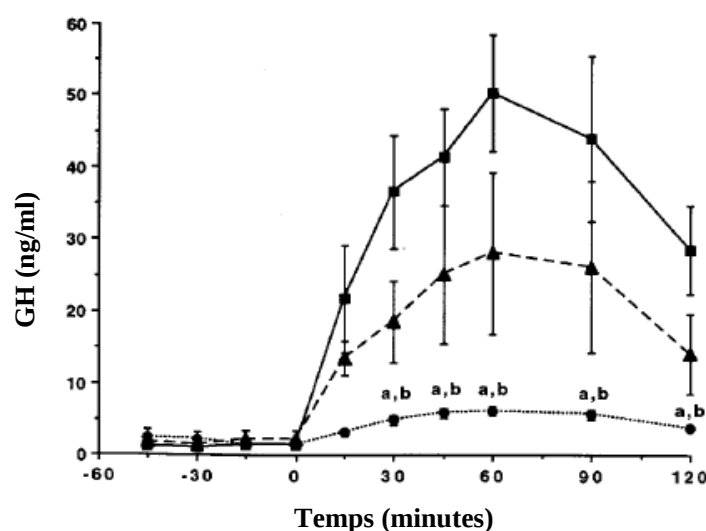


Fig 36: Sécrétion de GH en réponse au GHRH chez les patients obèses.

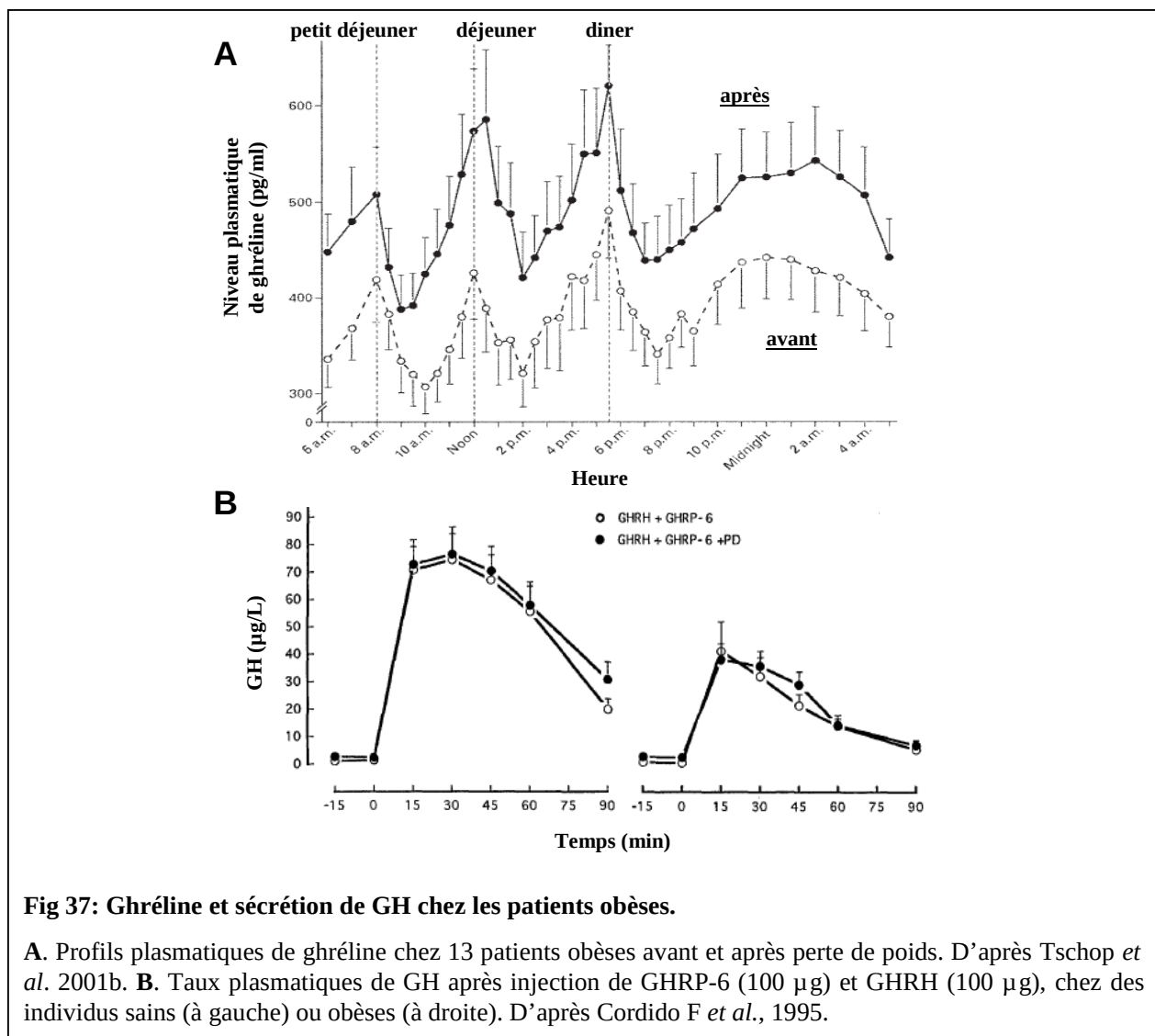
Profil plasmatique de GH suite à une injection intraveineuse de GHRH (1 µg/kg). Individus sains: carrés, Individus obèses: ronds, Individus obèses ayant suivi un régime: triangles. D'après Williams T *et al.*, 1984.

Chez les patients obèses, la sécrétion de GH, en réponse à une injection intraveineuse de GHRH chronique ou à une infusion intraveineuse de GHRH de huit jours, est altérée suggérant un défaut d'action du GHRH au niveau des cellules somatotropes (Figure 36) (Williams T *et al.* 1984; Ghigo E *et al.* 1993). Cependant chez l'homme, l'insuffisance en GH associée à l'obésité semble plus due à une augmentation de l'activité de SRIF qu'à une déficience en GHRH (Van Vliet G *et al.* 1986; Harvey S *et al.* 1994).

Les rats obèses Zucker sont caractérisés par une synthèse de GHRH altérée et une synthèse de SRIF inchangée (Tannenbaum GS *et al.* 1990). Cependant, chez les souris obèses *ob/ob* et DIO, l'expression de ces deux sécrétagogues hypothalamiques n'est pas modifiée, suggérant l'importance de l'hypophyse dans la diminution de la sécrétion de GH (Luque RM et Kineman RD 2006). En parallèle, l'expression hypophysaire du GHRH-R est diminuée chez les souris DIO (Luque RM et Kineman RD 2006).

VI.2. GH, obésité et ghréline.

Les niveaux de masse adipeuse et ghréline plasmatique sont négativement corrélés chez les rongeurs et l'homme, et l'obésité est associée à une diminution de la sécrétion de ghréline par l'estomac (Tschop M *et al.* 2001b) (Figure 37A). La ghréline stimulant la prise alimentaire, cette diminution tend à contrecarrer l'établissement de la pathologie obésité. Mais la ghréline étant également un puissant stimulateur de la sécrétion de GH, la diminution des taux de ghréline peut au contraire participer à l'établissement de l'obésité, en réduisant l'action lipolytique et anabolique de la GH.



L'expression du GHS-R est diminuée dans l'hypothalamus des rats obèses DIO et dans l'hypophyse des souris obèses *ob/ob* et DIO (Levin BE *et al.* 2003; Luque RM et Kineman RD 2006). Ainsi, la diminution des taux plasmatiques de ghréline associée à cette

diminution d'expression de son récepteur participe à l'altération de la sécrétion de GH caractéristique de l'obésité.

Cependant chez les patients obèses, l'importance accordée à l'hypoactivité du système ghréline sur la diminution de la sécrétion de GH est atténuée par le fait que l'injection intraveineuse de GHRP-6 et d'hexaréline induit une augmentation de la sécrétion de GH, même si celle-ci reste inférieure à celle observée chez les individus sains ayant subi le même traitement (Cordido F *et al.* 1993; Loche S *et al.* 1995; Maccario M *et al.* 2000). L'injection combinée de GHRH et de GHRP-6 induit également une augmentation de la sécrétion de GH mais inférieure à celle observée chez les individus sains (Cordido F *et al.* 1995) (Figure 37B).

VI.3. GH, obésité et les FFA.

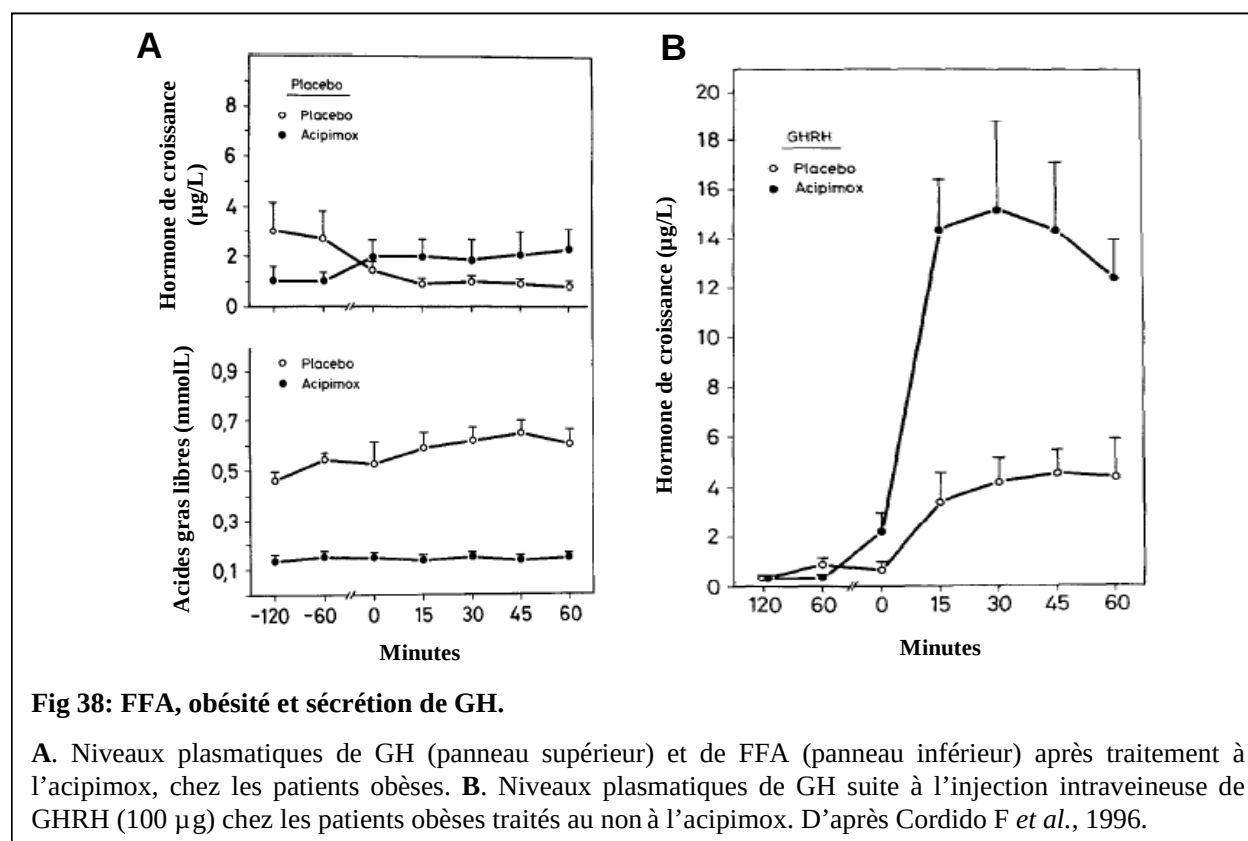


Fig 38: FFA, obésité et sécrétion de GH.

A. Niveaux plasmatiques de GH (panneau supérieur) et de FFA (panneau inférieur) après traitement à l'acipimox, chez les patients obèses. **B.** Niveaux plasmatiques de GH suite à l'injection intraveineuse de GHRH (100 µg) chez les patients obèses traités au non à l'acipimox. D'après Cordido F *et al.*, 1996.

Les FFA inhibent la sécrétion de GH en agissant principalement au niveau hypophysaire (Casanueva FF *et al.* 1987). Si leur mécanisme d'action est encore mal défini, les FFA induisent une baisse de l'expression de GHRH-R et GHS-R au niveau hypophysaire chez les primates (Luque RM *et al.* 2006a). L'élévation des taux plasmatiques de FFA caractéristique de l'obésité est un des principaux éléments responsables de la diminution de la

sécrétion de GH associée à cette pathologie (Figure 38A). En effet, l'administration par voie orale d'acipimox à des patients obèses induit une diminution des FFA circulants et une forte augmentation de la sécrétion de GH en réponse au GHRH et GHRP-6, bien que la sécrétion basale de GH ne soit pas améliorée (Cordido F *et al.* 1996) (Figure 38A.B).

VI.4. GH, obésité, glycémie et insuline.

Chez l'homme, l'hypoglycémie stimule la sécrétion de GH tandis que l'hyperglycémie l'inhibe. Chez les patients obèses, l'effet de l'hypoglycémie sur la sécrétion de GH est altérée (Kopelman P *et al.* 1985). De même l'hyperglycémie n'inhibe plus la sécrétion de GH basale et en réponse au GHRH (Bonora E *et al.* 1990).

Chez l'homme, l'insuline exerce un effet négatif sur la sécrétion de GH et l'obésité est caractérisée par une hyperinsulinémie (Polonsky K *et al.* 1988). En plus de son action sur les niveaux plasmatiques d'IGFBP-1 et sur la sécrétion de SRIF, l'insuline induit une diminution de l'expression de GHRH-R et GHS-R dans un modèle de culture d'adénohypophyse de rat (Luque RM et Kineman RD 2006) (Figure 39). Cependant il semble que l'hyperinsulinémie associée à l'obésité ne soit pas une des causes principales de la diminution de la sécrétion de GH caractéristique de cette pathologie. En effet, la normalisation des niveaux plasmatiques d'insuline chez les patients obèses n'est pas accompagnée par la restauration de la sécrétion de GH (Chalew S *et al.* 1992).

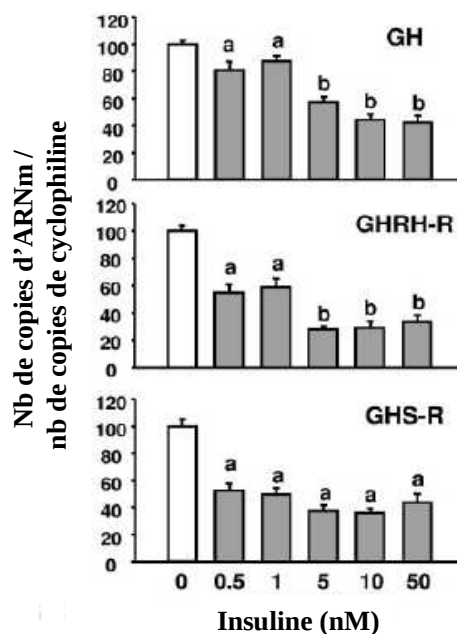


Fig 39: Insuline et sécrétion de GH.

Expression ARNm de la GH, du GHRH-R et du GHS-R suite à une stimulation par l'insuline (de 0 à 50 nM) dans un modèle de culture primaire de cellules hypophysaires de souris. D'après Luque R M *et al.*, 2006b.

VI.5. GH, obésité et IGF-I.

Il existe des résultats contradictoires concernant l'augmentation ou la diminution des niveaux plasmatiques d'IGF-I chez les patients obèses (Scacchi M *et al.* 2000). Cependant l'obésité semble caractérisée par une quantité plasmatique d'IGF-I libre augmentée, pouvant être expliquée par le fait que l'hyperinsulinémie induit une diminution de l'IGFBP-1 plasmatique (Brismar K *et al.* 1994; Frystyk J *et al.* 1995). Ainsi, l'augmentation de la quantité plasmatique d'IGF-I libre peut, *via* son rétrocontrôle négatif, induire une diminution de la sécrétion de GH. De plus, IGF-I induit une baisse d'expression de GHRH-R et GHS-R au niveau de l'hypophyse chez les primates (Luque RM *et al.* 2006a). Cette quantité d'IGF-I libre accrue pourrait expliquer la croissance relativement normale des enfants obèses, malgré l'altération de la sécrétion de GH.

VI.6. GH, obésité et leptine.

La leptine stimule la sécrétion de GH. L'obésité est caractérisée par un taux plasmatique de leptine élevé et une résistance aux effets biologiques de cette hormone adipocytaire. Ainsi, la résistance à la leptine contribue à l'altération de la sécrétion de GH en induisant un déséquilibre du système GHRH/SRIF. La leptine régule l'expression du GHS-R au niveau hypothalamique, et les actions hypothalamiques de la ghréline et de la leptine sont inter-dépendantes (Nogueiras R *et al.* 2004).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre IV, l'action de la leptine au niveau hypophysaire reste mal définie. La résistance hypophysaire à la leptine pourrait participer à l'altération de la sécrétion de GH, notamment en diminuant la réponse de la GH au GHRH (Mizuno I *et al.* 1999; Baratta M *et al.* 2002). L'éventuelle résistance hypophysaire à la leptine a été étudiée au cours de cette thèse, en utilisant comme modèle d'étude le rat DIO et en examinant l'expression du récepteur de la leptine au niveau des cellules somatotropes.

- Sécrétion de GH et obésité -

- L'obésité est caractérisée par une altération de la sécrétion de GH, conséquence de nombreuses modifications endocrines et métaboliques agissant de concert.

- L'obésité est caractérisée par un déséquilibre de l'expression / synthèse du GHRH et du SRIF. La réponse de la sécrétion de GH au GHRH est également affectée.

- Chez l'homme et les rongeurs, l'obésité est associée à une diminution de la sécrétion de ghréline. L'expression hypothalamique du GHS-R est également diminuée chez les rats DIO. L'injection intraveineuse de GHRP-6 induit une augmentation de la sécrétion de GH inférieure chez les patients obèses par comparaison aux individus sains.
- L'élévation des taux plasmatiques de FFA, inhibant la sécrétion de GH, caractéristique de l'obésité est un des principaux responsables de l'altération de la sécrétion de GH associée à cette pathologie. Chez les primates, les FFA induisent une baisse de l'expression de GHRH-R et GHS-R au niveau hypophysaire.
- L'insuline exerce un effet négatif sur la sécrétion de GH et l'obésité est caractérisée par une hyperinsulinémie. Cette hormone pancréatique induit également une diminution de l'expression de GHRH-R et GHS-R au niveau hypophysaire.
- L'obésité est caractérisée par une quantité plasmatique d'IGF-I libre augmentée (conséquence de l'hyperinsulinémie), qui *via* son rétrocontrôle négatif entraîne une diminution de la sécrétion de GH. De plus, IGF-I induit une baisse de l'expression hypophysaire de GHRH-R et GHS-R chez les primates.
- La leptine stimule la sécrétion de GH, et le phénomène de résistance à la leptine associé à l'obésité pourrait participer à l'altération de la sécrétion de GH caractéristique de cette pathologie.

Résultats - Discussion.

Etude 1 : Action de la leptine sur les cellules somatotropes des rats obèses DIO.

La GH, en plus de son action sur la croissance, a un rôle prépondérant dans la régulation du métabolisme énergétique. Cette hormone sécrétée par les cellules somatotropes de l'hypophyse possède notamment un effet lipolytique, prévenant l'accumulation de triglycérides dans les tissus et favorisant l'utilisation des acides gras libres de la circulation sanguine comme principale source d'énergie.

L'obésité est caractérisée par une altération de la sécrétion de GH (Tannenbaum GS *et al.* 1990; Veldhuis JD *et al.* 1991), ayant pour conséquence une aggravation de cette pathologie. Les causes de cette altération sont encore mal définies à l'heure actuelle. Comme nous l'avons vu dans la partie Introduction Bibliographique, la leptine stimule la sécrétion de GH. L'obésité étant associée à un phénomène de résistance à la leptine, nous nous sommes intéressés dans cette étude à l'action de la leptine sur les cellules somatotropes, en utilisant comme modèle expérimental d'obésité les rats DIO.

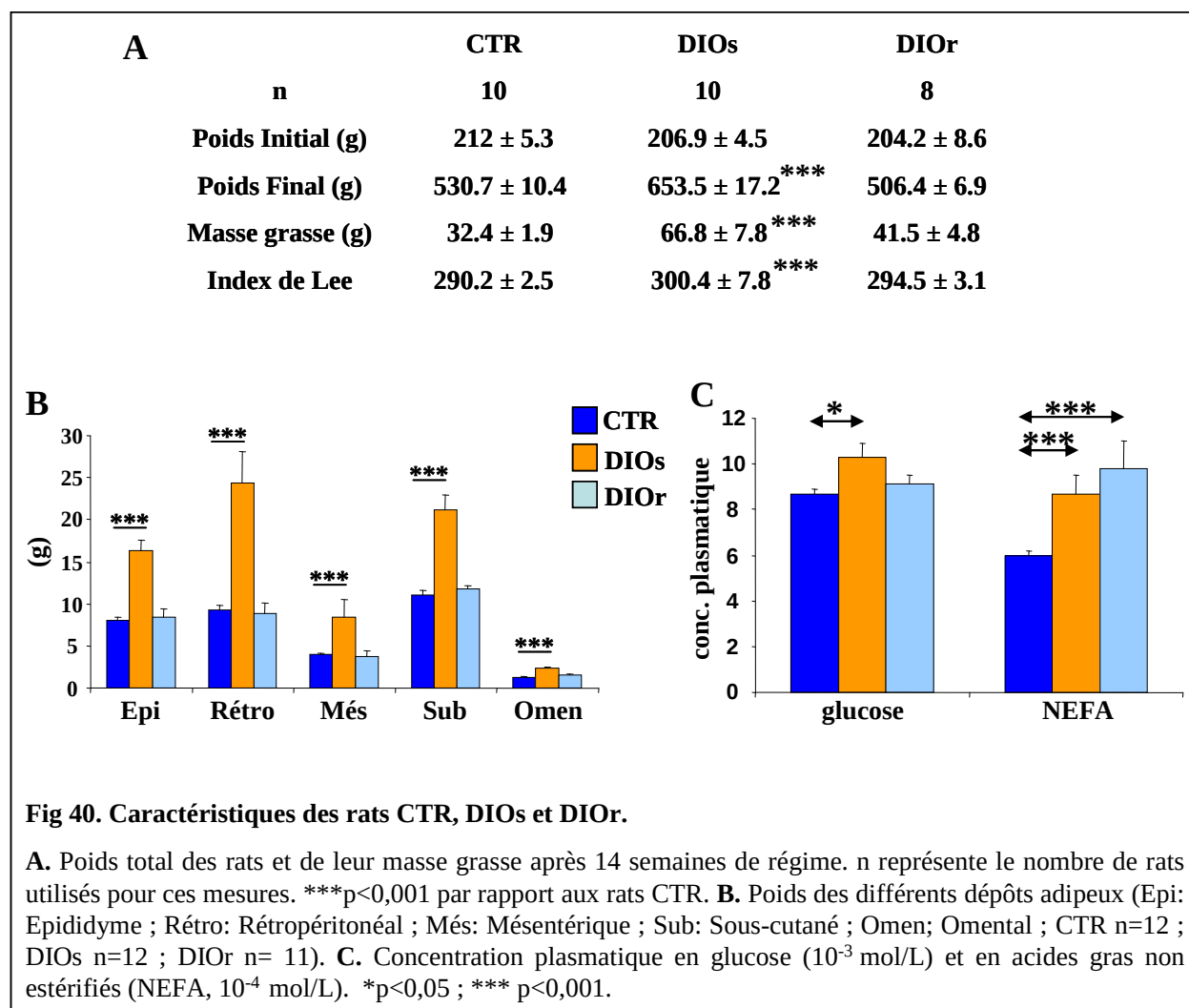
Les rats DIO sont rendus obèses par une alimentation hypercalorique riche en lipides. Ce modèle a été développé initialement par l'équipe de Levin (Levin BE *et al.* 1983), et est particulièrement intéressant de par les nombreuses caractéristiques communes avec l'obésité humaine qu'il présente. Comme chez l'homme, les rats utilisés dans ce modèle ne sont pas égaux face à l'alimentation hypercalorique, certains devenant obèses et d'autres non. Les causes de la résistance à la leptine associée à l'obésité sont mal définies. Au niveau central et dans certains tissus périphériques, une diminution de l'expression du récepteur de la leptine et une augmentation de l'expression de SOCS-3 ont été décrites (voir Introduction – Chapitre 3 II.4.b et II.4.c). Nous avons donc étudié ces paramètres au niveau des cellules somatotropes des rats DIO.

I. Résultats.

I.1. Caractéristiques des rats DIO.

Des rats Sprague Dawley CD (SD) âgés de 6 semaines ont été soumis pendant 14 semaines à une alimentation classique (rats CTR pour contrôles) ou hypercalorique (rats DIO). Les rats ayant reçu l'alimentation hypercalorique sont classés, selon le protocole de Levin, en fonction de leur poids final comme obèses (DIOs pour DIO sensibles), résistants à

l'obésité (DIO_r pour DIO résistants) et intermédiaires (Levin BE *et al.* 1983). Les rats intermédiaires ont été écartés de l'étude. Dans nos conditions expérimentales, parmi les rats SD ayant suivi les 14 semaines de régime hypercalorique, 27% sont devenus DIOs et 31% DIO_r.



Le poids moyen des rats DIOs est significativement supérieur à celui des rats CTR après 4 semaines de régime. Après 14 semaines de régime, le poids des rats DIOs est augmenté de 23,1% par rapport aux rats CTR (Figure 40.A). Après 3 semaines de régime hypercalorique, le poids moyen des rats DIO_r reste inférieur à celui des rats CTR, mais cette différence n'est toutefois pas significative à l'âge de 20 semaines (Figure 40.A).

Après 14 semaines de régime hypercalorique, le poids total du tissu adipeux blanc est significativement supérieur chez les rats DIOs en comparaison avec les rats CTR (Figure 40.A). Les poids des dépôts adipeux epididymal, rétropéritonéal, mésentérique, sous-cutané et

omental sont augmentés de 104%, 162%, 110%, 90% et 77% respectivement chez les rats DIOs par rapport aux rats CTR (Figure 40.B). L'index de Lee (racine carré de la masse corporelle en gramme divisée par la longueur naso-anale en millimètres) est significativement supérieur chez les rats DIOs par comparaison aux rats CTR (Figure 40.A). Le poids des dépôts adipeux et l'index de Lee ne sont pas significativement différents entre les rats DIOr et les rats CTR.

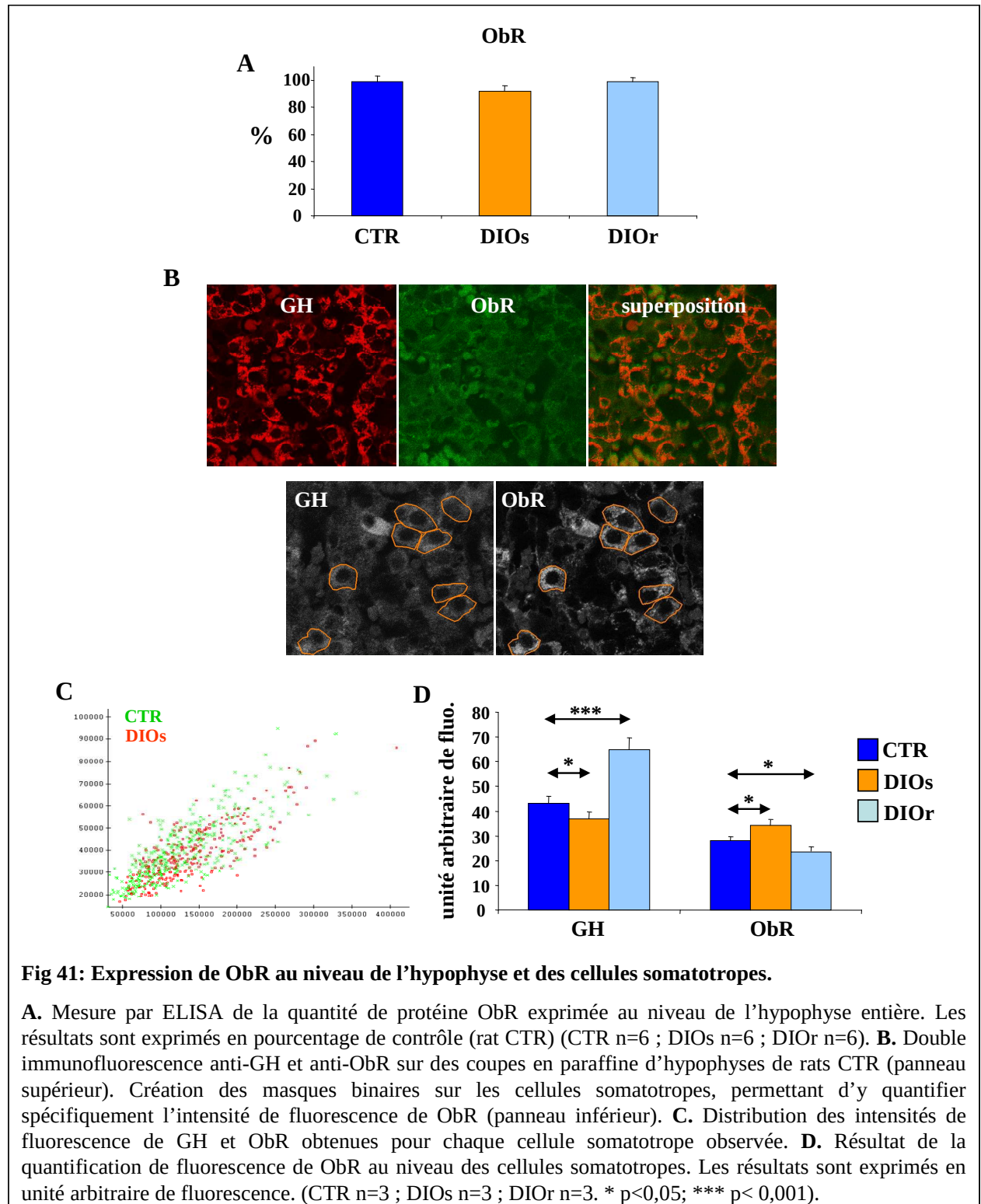
Les taux plasmatiques de glucose et d'acides gras non estérifiés (NEFA) sont significativement supérieurs chez les rats DIOs. Seul les taux plasmatiques de NEFA sont significativement supérieurs chez les rats DIOr par rapport aux rats CTR (Figure 40.C).

I.2 Expression de ObR au niveau des cellules somatotropes.

Dans toutes les expériences réalisées pour cette étude, les rats ont été euthanasiés à la même heure de la journée (12 h +/- 30 min). La quantité de protéine ObR (toutes isoformes membranaires confondues) exprimée au niveau de l'hypophyse a été mesurée par un kit commercial ELISA (R&D system). Aucune différence significative n'a été observée entre rats CTR, DIOs et DIOr (Figure 41.A).

Nous avons étudié la quantité de protéine ObR exprimée au niveau des cellules somatotropes en utilisant la technique de quantification de fluorescence. Brièvement, une double immunofluorescence anti-GH et anti-ObR est réalisée sur des coupes en paraffine d'hypophyses de rats CTR, DIOs et DIOr. La fluorescence GH permet la création d'un masque binaire recouvrant les cellules somatotropes (Figure 41.B). La fluorescence correspondant à ObR est alors quantifiée uniquement dans ce masque. La distribution homogène de la fluorescence sur l'ensemble des cellules somatotropes étudiées (n=300-350) permet une analyse statistique (Figure 41.C).

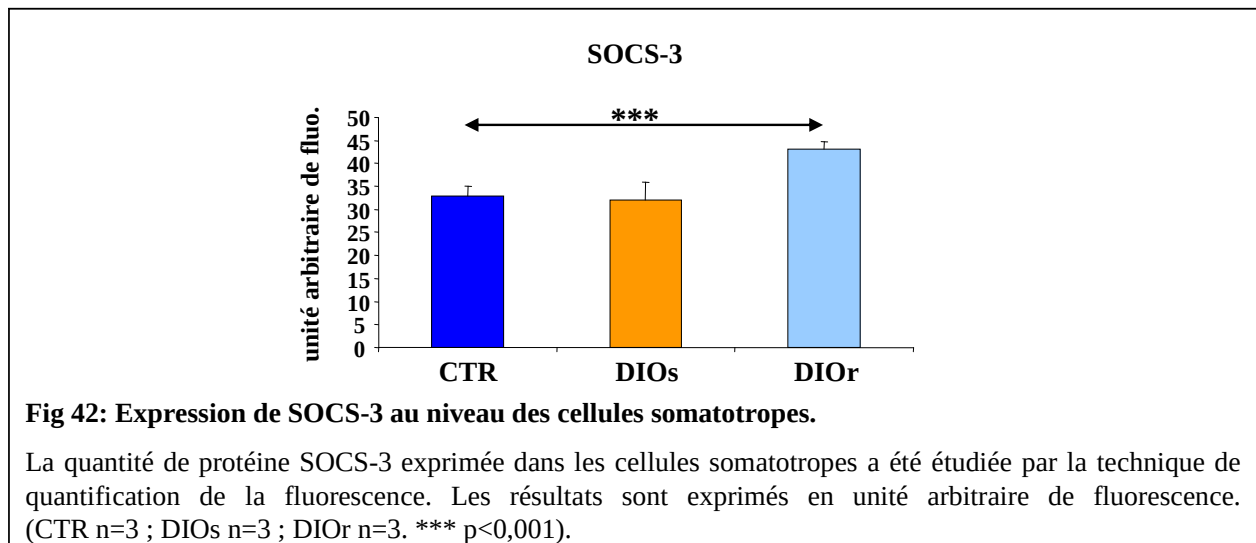
Nos résultats montrent que l'expression de ObR au niveau des cellules somatotropes est significativement supérieure (14%) chez les rats DIOs et significativement inférieure (13%) chez les rats DIOr, par comparaison aux rats CTR (Figure 41.D). Le contenu protéique en GH des cellules somatotropes est significativement inférieur (12%) chez les rats DIOs et significativement supérieur (51%) chez les rats DIOr, par rapport aux rats CTR (Figure 41.D).



I.3. Expression de SOCS-3 au niveau des cellules somatotropes.

La quantité de protéine SOCS-3 exprimée au niveau des cellules somatotropes a été mesurée par la technique de quantification de fluorescence. L'expression de SOCS-3 chez les

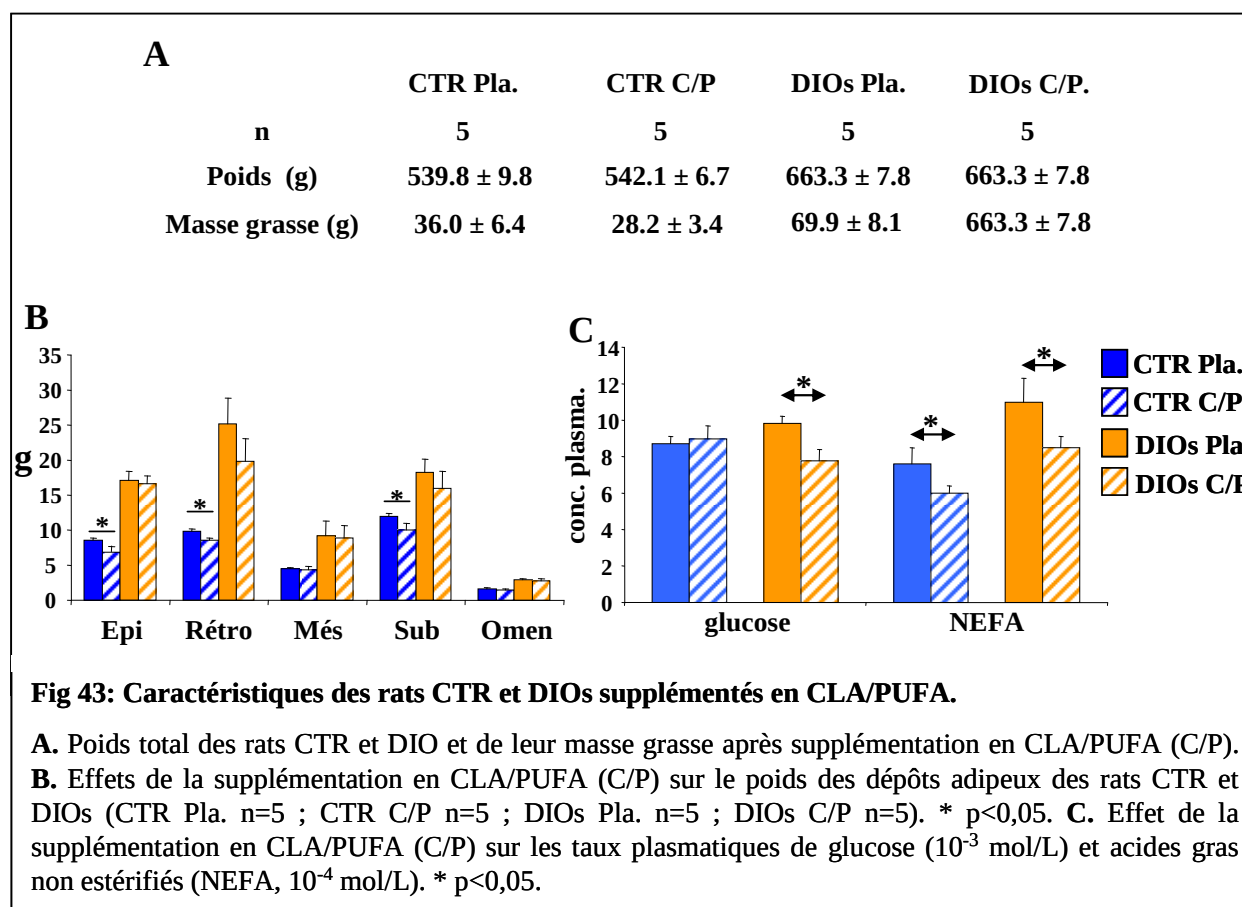
rats DIOs n'est pas modifiée par les 14 semaines de régime hypercalorique, mais est significativement supérieure (30%) chez les rats DIO_r par rapport aux rats CTR.



I.4. Effets de la supplémentation en CLA/PUFA sur les caractéristiques des rats DIOs.

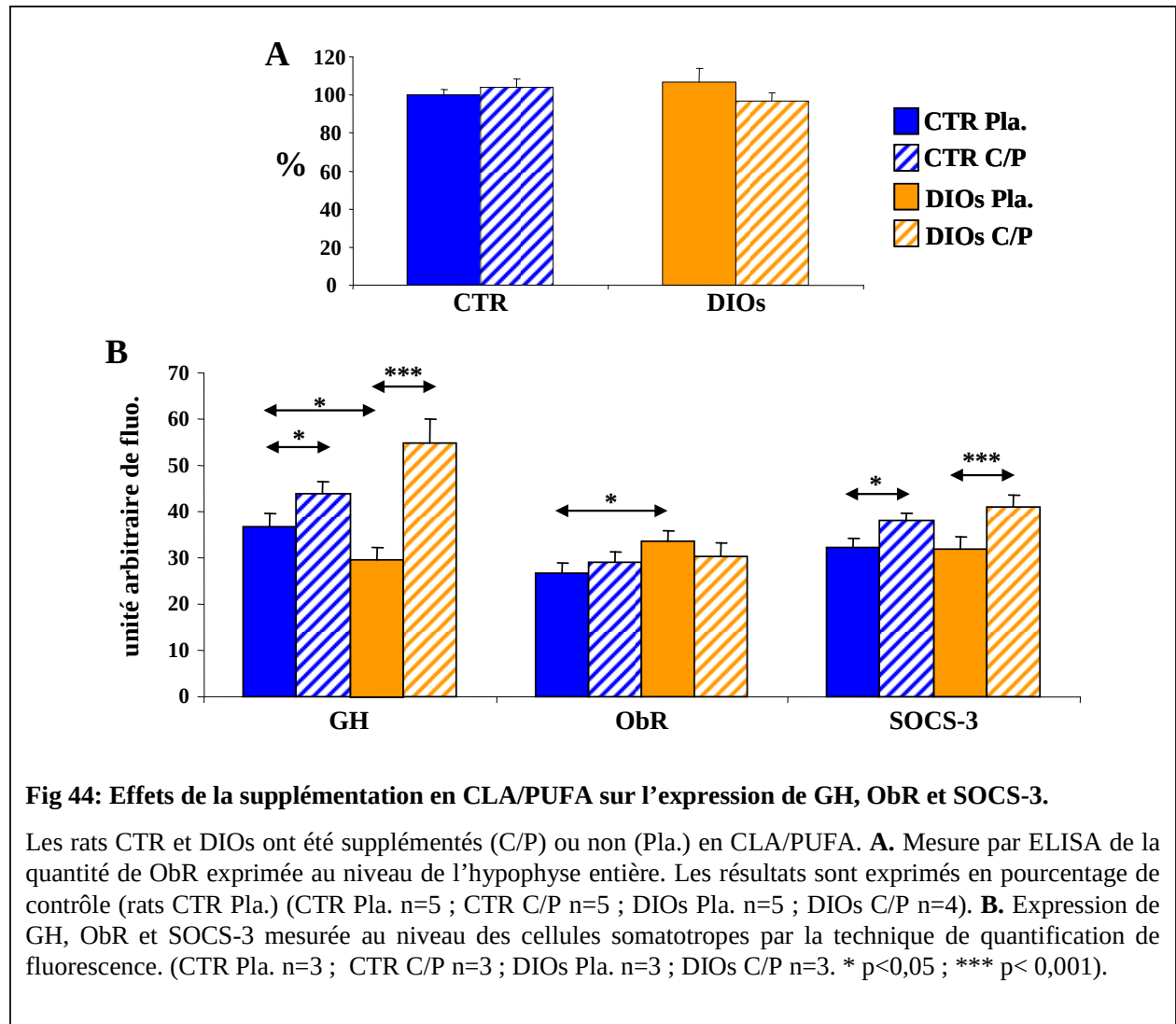
Après les 14 semaines de régime hypercalorique, les rats DIOs ont reçu pendant 21 jours supplémentaires la même alimentation hypercalorique, mais supplémentée ou non (DIOs Pla. pour DIOs placebo) en acide linoléique conjugué / acides gras polyinsaturés n-3 (DIOs C/P pour DIOs CLA/PUFA). Les rats CTR ont également reçu pendant la même durée, une supplémentation en CLA/PUFA avec leur nourriture standard (CTR C/P) ou non (CTR Pla.).

Le poids total et la masse adipeuse totale des rats DIOs et CTR ne sont pas significativement modifiés par la supplémentation en CLA/PUFA. Cependant le poids des dépôts adipeux rétro-péritonéal et sous-cutané est significativement diminué (13% et 17% respectivement) par la supplémentation en CLA/PUFA chez les rats CTR, mais n'est pas modifié chez les rats DIOs. Les taux plasmatiques de glucose sont significativement diminués (20%) chez les rats DIOs C/P par rapport aux rats DIOs Pla., et deviennent comparables aux taux plasmatiques de glucose des rats CTR, qui ne sont pas modifiés par la supplémentation en CLA/PUFA. Les taux plasmatiques de NEFA sont significativement diminués chez les rats CTR C/P (21%) et DIOs C/P (23%) par rapport à leurs contrôles.



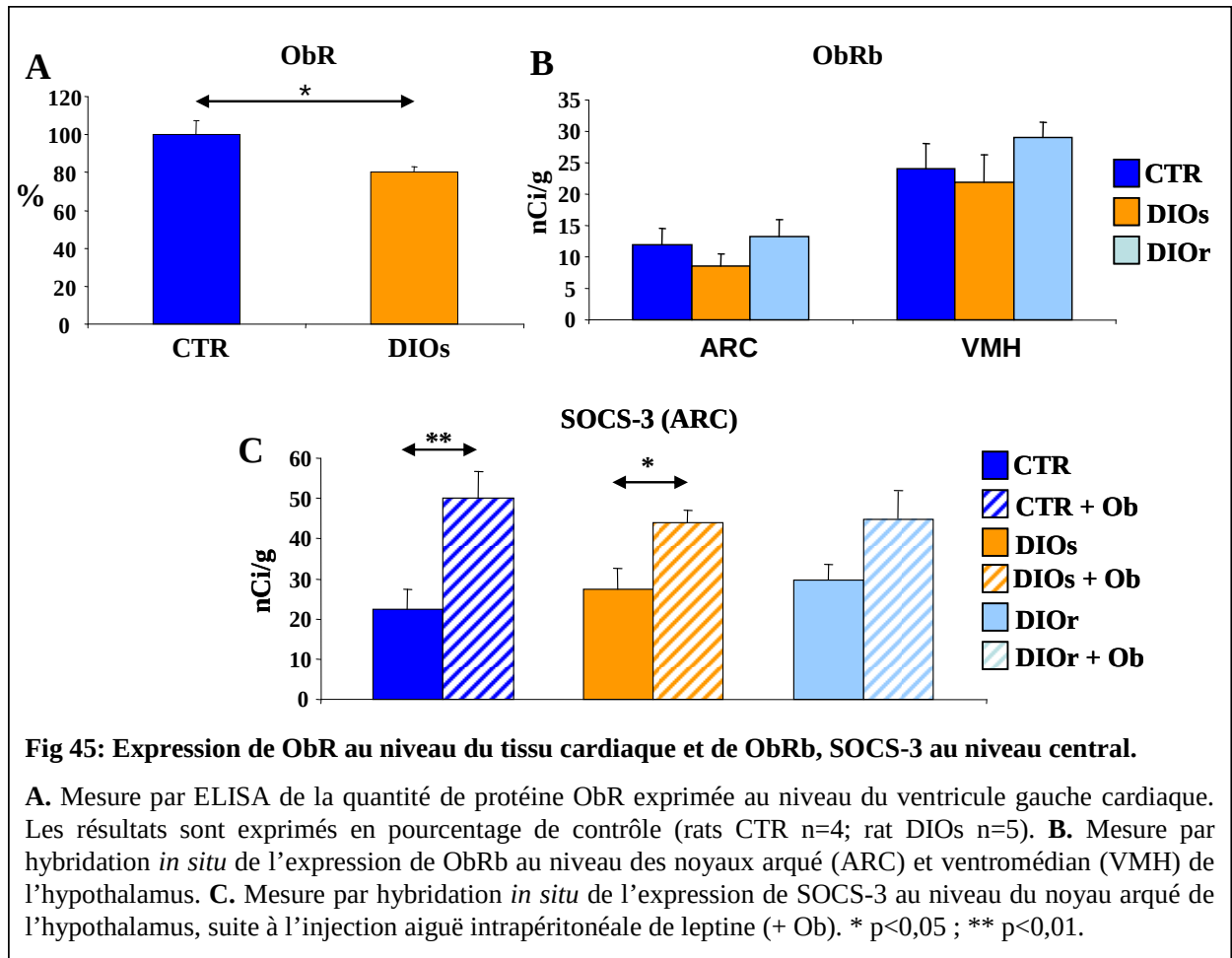
I.5. Effet de la supplémentation en CLA/PUFA sur l'expression de GH, ObR et SOCS-3.

Par les techniques d'ELISA et de quantification de fluorescence, nous avons montré que l'expression de ObR (toutes isoformes membranaires confondues) au niveau de l'hypophyse entière (Figure 44.A) ou au niveau des cellules somatotropes (Figure 44.B) n'est pas modifiée par la supplémentation en CLA/PUFA, aussi bien chez les rats CTR que DIOs. Le contenu en GH des cellules somatotropes est significativement augmenté par la supplémentation en CLA/PUFA, chez les rats CTR (22%) et les rats DIOs (75%) (Figure 44.B). La quantité de protéine SOCS-3 exprimée dans les cellules somatotropes est également significativement augmentée par la supplémentation en CLA/PUFA chez les rats CTR (15%) et les rats DIOs (32%).



I.6. Expression de ObR dans le cœur et l'hypothalamus des rats DIOs.

Par la technique d'ELISA, nous avons montré que la quantité de protéine ObR (toutes isoformes membranaires confondues) exprimée au niveau du ventricule gauche cardiaque est significativement inférieure chez les rats DIOs comparés aux rats CTR (Figure 45.A). L'expression de ObRb au niveau des noyaux hypothalamiques arqué et ventromédian est comparable entre les rats CTR, DIOs et DIOr (Figure 45.B). L'expression de SOCS-3 au niveau du noyau arqué est également comparable entre les rats CTR, DIOs et DIOr. Suite à l'injection aiguë intrapéritonéale de leptine, l'expression de SOCS-3 au niveau du noyau arqué est significativement augmentée chez les rats CTR et DIOs, mais pas chez les rats DIOr (Figure 45.C). Les expressions hypothalamiques de ObRb et SOCS-3 ont été étudiées par l'équipe de LM Williams, en utilisant la technique d'hybridation *in situ*.



II. Discussion - conclusion.

Nos résultats montrent que le contenu protéique en GH des cellules somatotropes est inférieur chez les rats obèses DIOs, ce qui est en accord avec une sécrétion de GH altérée dans la pathologie obésité. Chez les rats DIOr, le contenu protéique en GH des cellules somatotropes est largement supérieur à celui des rats CTR. Etant donné les actions lipolytique et anabolique de la GH, cette forte augmentation participe très certainement à la résistance à l'obésité induite par le régime hypercalorique, en réduisant notamment le stockage de triglycérides dans le tissu adipeux. Cependant, il est important de préciser qu'il ne faut pas confondre expression hypophysaire de GH et sécrétion de GH, et nous n'avons pas pu pour différentes raisons établir de profils plasmatiques de GH chez les rats DIOs et DIOr.

La supplémentation en CLA/PUFA, malgré son inefficacité sur le poids total et la masse adipeuse totale des rats, induit un retour à une glycémie normale et une diminution des NEFA circulants chez les rats DIOs. Ces modifications sont associées à une augmentation de la synthèse de GH au niveau hypophysaire, comme nous l'avons montré par la technique de

quantification de fluorescence. Les mécanismes biologiques conduisant à cet effet des CLA/PUFA sur la GH restent à élucider, mais étant donné l'action anti-obésité de la GH, un tel traitement (si son efficacité sur la GH était avérée chez l'homme) pourrait se révéler bénéfique pour les patients obèses. Cependant, la supplémentation en CLA/PUFA induit également une augmentation de l'expression de SOCS-3 dans les cellules somatotropes, chez les rats CTR et DIOs, suggérant une moins grande sensibilité à la leptine de ces cellules.

Nous avons émis l'hypothèse que la résistance à la leptine pouvait être une des raisons de l'altération de la sécrétion de GH caractéristiques de l'obésité. L'action de la leptine sur la sécrétion de GH, directement au niveau hypophysaire, reste soumise à controverse. Cependant, de nombreuses données plaident en faveur d'un effet hypophysaire direct de la leptine (voir Introduction – Chapitre 4 IV.2 et Résultats – Etude 2). Nos résultats montrent que l'expression de ObR au niveau des cellules somatotropes est augmentée chez les rats DIOs et diminuée chez les rats DIOr. Ce résultat est surprenant et contradictoire avec de précédentes études, utilisant le même modèle animal d'obésité, montrant une expression hypothalamique de ObRb diminuée chez les rats DIOs (Wilsey J *et al.* 2003). Concernant l'expression de SOCS-3 au niveau des cellules somatotropes, nos résultats montrent que celle-ci n'est pas différente entre rats CTR et DIOs, mais augmentée chez les rats DIOr. Ce résultat est également surprenant, car l'obésité et la résistance à la leptine sont généralement caractérisées par une augmentation de l'expression de SOCS-3 (Bjorbaek C *et al.* 1998a; Steinberg GR *et al.* 2006; Watt MJ *et al.* 2006). De plus, cela sous-entend que les cellules somatotropes des rats DIOr sont moins sensibles aux effets biologiques de la leptine (expression de SOCS-3 augmentée et de ObR réduite) alors que cela devrait plutôt être le cas des cellules somatotropes des rats DIOs. Toutefois, la mesure de l'expression hypophysaire de SOCS-3 est difficile à mettre en relation avec les effets biologiques de la leptine, étant donné le rôle central de l'hypophyse et le nombre important de cytokines activant SOCS-3 et ayant pour cibles les cellules somatotropes.

Comment expliquer nos résultats particuliers obtenus chez les rats DIOs ?

Concernant notre modèle animal, les poids des dépôts adipeux des rats DIOs sont en adéquation avec les autres études utilisant le même modèle, et sont même supérieurs à ceux obtenus par l'équipe de Levin (Levin BE *et al.* 1983). De la même manière, nos données mettent en évidence une accumulation intra-abdominale de tissu adipeux chez les rats DIOs, ce qui est une des caractéristiques du syndrome métabolique humain (Eckel *et al.* 2005). De plus, la concentration plasmatique de glucose chez les rats DIOs est supérieure à celle des rats

CTR, signe d'une hyperglycémie et d'une probable résistance à l'insuline (même faible). Aussi, au vu de leurs caractéristiques, les rats DIOs développés dans notre étude semblent constituer un bon modèle d'étude des modifications physiologiques associées à l'obésité.

Nous avons montré, en collaboration avec l'équipe du Pr R. Bonvallet, que le cœur des rats DIOs utilisés dans cette étude n'est pas caractérisé par une hypertrophie ventriculaire comme c'est le cas dans les modèles génétiques d'obésité (Barouch LA *et al.* 2003; Ricci E *et al.* 2006). La densité des courants ioniques contrôlant la contraction des myocytes cardiaques n'est pas affectée par les 14 semaines de régime hypercalorique. Néanmoins, l'expression de ObR au niveau du ventricule gauche des rats DIOs est réduite, et la leptine n'inhibe plus l'activation du courant I_{NCX} chez les rats DIOs, au contraire des rats CTR (Ricci E *et al.* 2006). Ce résultat est le signe d'une résistance à l'action biologique de la leptine, même partielle, au niveau des myocytes cardiaques.

Les expériences réalisées par l'équipe de LM Williams (communication personnelle) sur le même modèle expérimental que le nôtre, montrent que les expressions de ObRb et SOCS-3 au niveau de l'ARC ne sont pas modifiées chez les rats DIOs. De plus, l'injection intrapéritonéale de leptine induit une augmentation de l'expression de SOCS-3 chez les rats DIOs. Ainsi, les rats DIOs ne possèdent pas les caractéristiques d'une résistance à la leptine au niveau central, même si l'étude de l'activation hypothalamique de STAT3 en réponse à une injection de leptine (périphérique et centrale) est nécessaire pour être catégorique.

Comme nous l'avons vu dans la partie Introduction Bibliographique, les expériences de DIO induisent progressivement l'obésité. Les états intermédiaires de la DIO sont caractérisés par une augmentation de la masse grasse, une hyperleptinémie, une augmentation de l'expression de ObRb (du moins au niveau central) et une résistance partielle à la leptine (Lin S *et al.* 2000). Au contraire, les états plus tardifs de la DIO, correspondant à une obésité sévère, sont caractérisés par une baisse de l'expression de ObRb (au niveau central) et par une résistance totale à la leptine (Wilsey J *et al.* 2003; Tortoriello DV *et al.* 2006). Aux vues de nos résultats sur l'expression hypophysaire de ObR, légèrement augmentée chez les rats DIOs, et l'expression hypothalamique de ObRb, comparable entre rats DIOs et CTR, il est possible d'envisager qu'après les 14 semaines de régime hypercalorique nous nous trouvons, dans nos conditions expérimentales, entre l'état intermédiaire et l'état tardif de la DIO, après la phase d'augmentation maximale de l'expression de ObR mais avant la phase de diminution complète de son expression.

Ainsi, étant donné le grand investissement nécessaire pour obtenir un nombre d'animaux obèses adéquat avec les expériences rigoureuses pratiquées (l'hypophyse étant un

petit tissu), étant donné également la durée du régime hypercalorique, et devant les premiers résultats obtenus dans cette étude, nous avons décidé de nous concentrer principalement sur les études 2 et 3 exposées dans la partie Résultat. De plus, une étude sérieuse, publiée quelques mois après le début de ma thèse par l'équipe de Casanueva, a montré que chez l'homme, l'altération de la sécrétion de GH associée à l'obésité n'est pas la conséquence des taux plasmatiques de leptine élevés, ni de la résistance à la leptine, contredisant notre hypothèse initialement formulée (Ozata M *et al.* 2003).

Etude 2 : Régulation de l'axe GH chez le rat Lou/C.

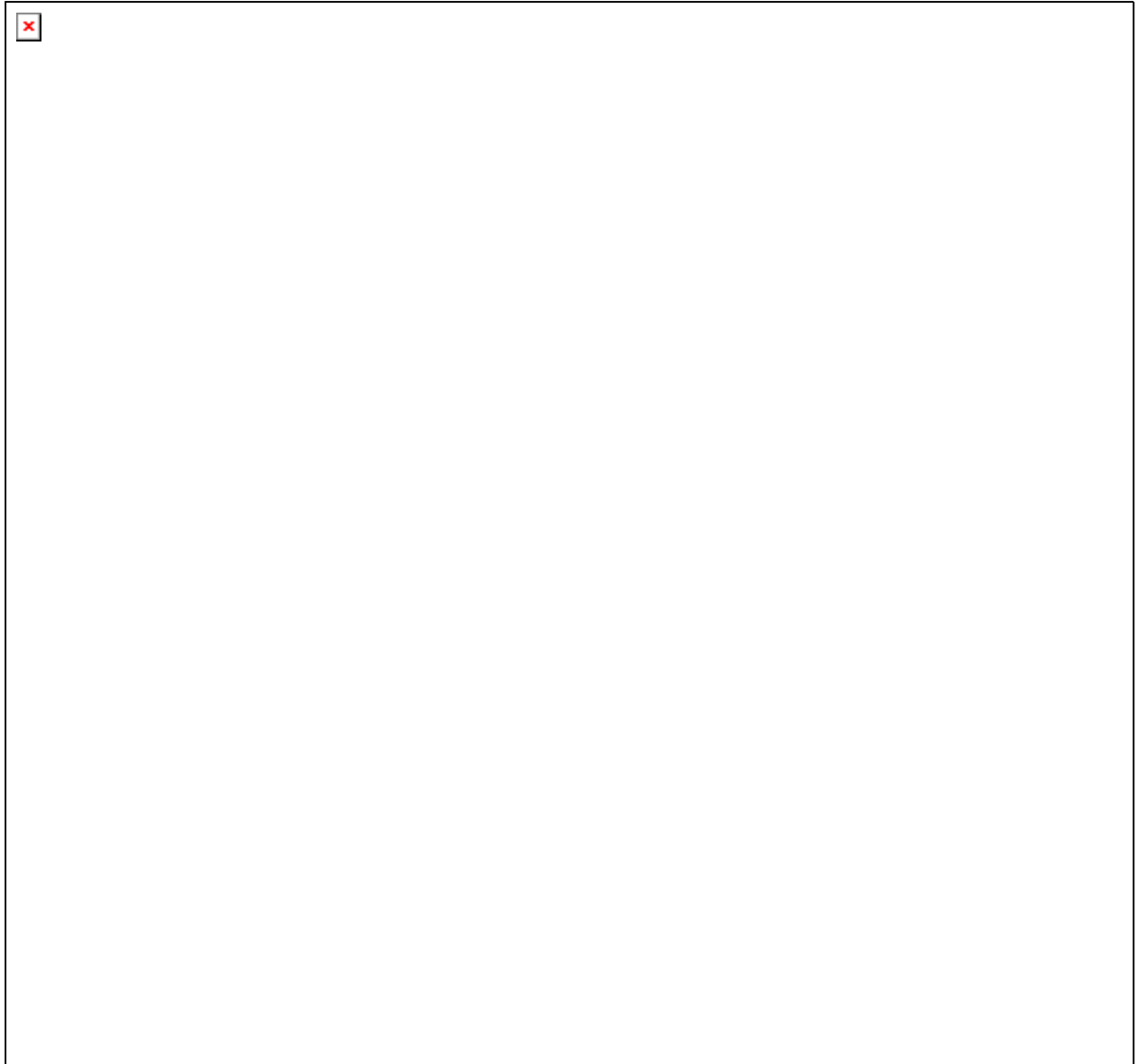
La souche de rat Lou/C est issue de la souche Wistar. Initialement, le rat Lou/C a été utilisé comme modèle de vieillissement sain ; tandis que 50% des rats Wistar sont morts à 24 mois, ce chiffre passe à 30 mois pour les rats Lou/C (Alliot J *et al.* 2002). Le rat Lou/C présente un poids total et une prise alimentaire spontanée réduits, ainsi qu'une résistance à l'obésité avec l'âge, au contraire du rat Wistar (Boghossian S *et al.* 2000; Couturier K *et al.* 2002). Cependant, la mesure de la prise alimentaire normalisée par le poids total des rats n'est pas significativement différente entre rats Lou/C et Wistar (sauf à 24 mois). Toujours en prenant en compte la normalisation par rapport au poids total des rats, le rat Lou/C est caractérisé par une dépense énergétique accrue (Perrin D *et al.* 2003). Les rats Wistar ingérant la même ration calorique que les rats Lou/C présentent une adiposité supérieure (Couturier K *et al.* 2002).

Les taux plasmatiques de leptine sont inférieurs chez le rat Lou/C et restent relativement constant avec l'âge, contrairement à ceux du rat Wistar qui augmentent fortement (Perrin D *et al.* 2003). Les taux plasmatiques d'insuline sont également inférieurs chez le rat Lou/C et constant avec l'âge. Le rat Lou/C ne développe pas de résistance à l'insuline avec l'âge, contrairement au rat Wistar (Couturier K *et al.* 2002; Perrin D *et al.* 2003; Kappeler L *et al.* 2004b).

Concernant les neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique, une première étude réalisée au niveau de l'hypothalamus entier n'a relevé aucune différence significative entre rats Lou/C et Wistar dans l'expression de AgRP, NPY, α MSH, CART, Galanine, MCH et CRH, (Kappeler L *et al.* 2004b). L'équipe de LM Williams a étudié l'expression de ces neuropeptides dans les noyaux spécifiques de l'hypothalamus, et observé une expression de AgRP et NPY supérieure dans l'ARC chez le rat Lou/C (Mitchell SE *et al.* 2006). Ce résultat surprenant montre que les mécanismes responsables de la faible adiposité du rat Lou/C sont complexes. Cette dernière étude a été réalisée sur les mêmes rats utilisés au cours de cette thèse et apporte donc des informations importantes pour l'exploitation de nos résultats.

La sécrétion de GH décroît progressivement avec l'âge. Cependant chez le rat Lou/C, cette diminution est ralentie en comparaison avec le rat Wistar, même si à 3 mois la sécrétion de GH est identique entre ces deux souches de rats (Kappeler L *et al.* 2004a) (Figure 46). Etant donné l'importance de la GH sur le métabolisme énergétique (actions lipolytique et

anabolique), la sécrétion de GH accrue chez les rats Lou/C âgés participe à la résistance à l'obésité. L'étude de la régulation de la sécrétion de GH chez le rat Lou/C est donc particulièrement intéressante. Nous avons donc examiné ici l'expression des principaux composants de l'axe GH chez les rats Lou/C et Wistar (âgés de 3 mois).



I. Résultats.

I.1. Caractéristiques des rats Lou/C.

I.1.a. Poids des rats, des dépôts adipeux et prise alimentaire.

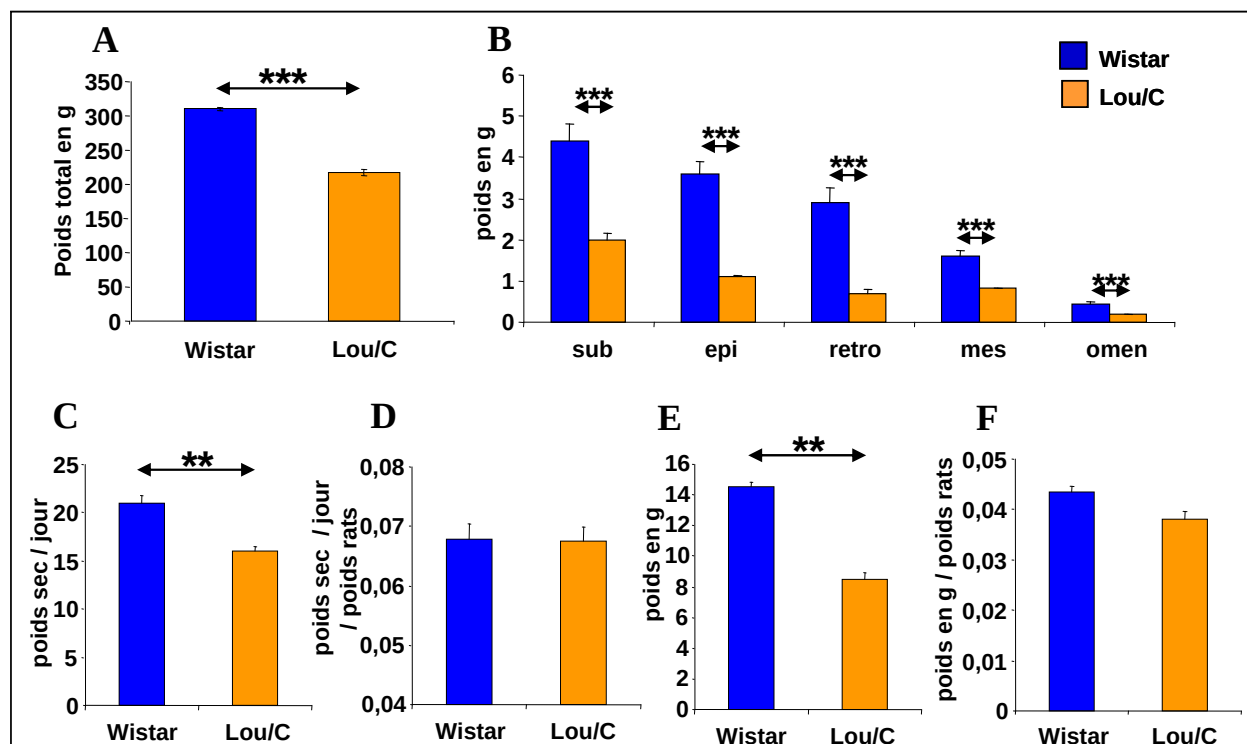


Fig 47: Caractéristiques des rats Lou/C.

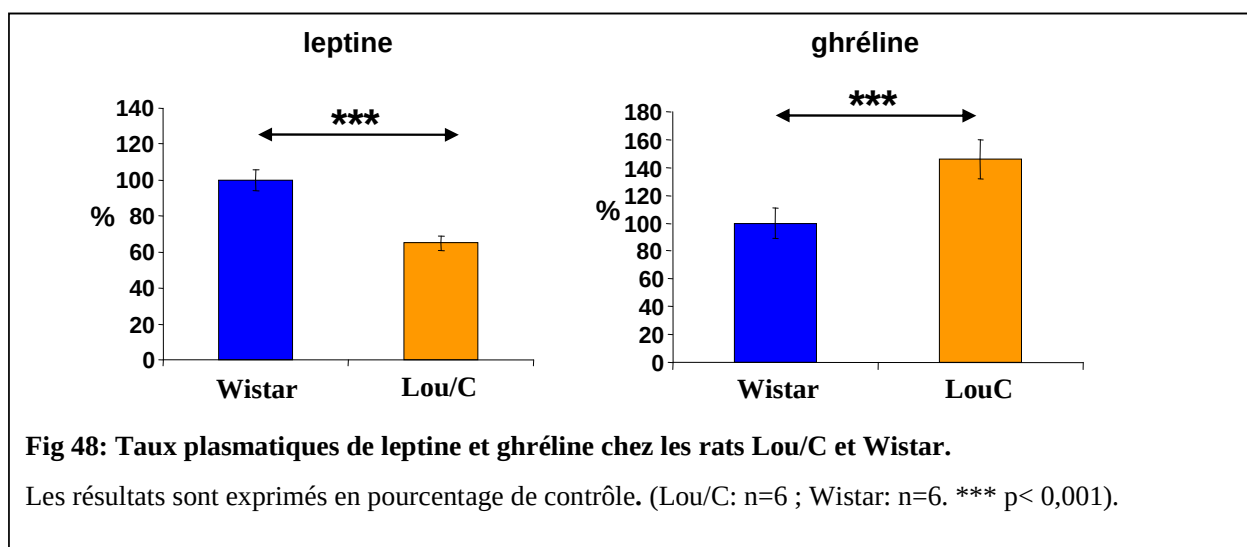
A. Poids total (g) des rats Lou/C et Wistar âgés de 3 mois. **B.** Poids (g) des différents dépôts adipeux chez les rats Lou/C et Wistar. (sub: sous-cutané ; epi: epididyme ; retro: rétropéritonéal ; mes: mésentérique ; omen: omental. **C.** Poids (g) de la masse grasse des rats Lou/C et Wistar. **D.** Poids de la masse grasse normalisée par le poids total des rats Lou/C et Wistar. **E.** Prise alimentaire des rats Lou/C et Wistar, mesurée en poids sec de nourriture ingérée par jour. **F.** Prise alimentaire normalisée par le poids total des rats Lou/C et Wistar. (Lou/C: n=6 ; Wistar: n=6. ** p< 0,01; *** p< 0,001).

A l'âge d'étude (3 mois), le poids total des rats Lou/C (237 ± 2.1 g) est significativement inférieur au poids total des rats Wistar (310 ± 4.3 g) (Figure 47.A). La masse grasse totale de l'organisme (Figure 47.C) et le poids des différents dépôts adipeux (Figure 47.B) sont significativement inférieurs chez les rats Lou/C (masse grasse totale : 21,3 g / 16,9 g ; sous-cutané : 4,4 g / 2 g ; epididyme : 3,6 g / 1,1 g ; rétropéritonéal 2,9 g / 0,7 g ; mésentérique : 1,6 g / 0,83 g ; omental 0,43 g / 0,2 g). Cependant, une fois normalisée par le poids total des rats, la masse grasse n'est pas significativement différente entre les rats Lou/C et Wistar (Figure 47.D). La prise alimentaire, mesurée en poids sec de nourriture ingérée par jour, est significativement inférieure chez les rats Lou/C en comparaison aux rats Wistar

(Figure 47.E), mais comparable une fois normalisée par le poids total des rats (Figure 47.F). Les mesures de masse grasse et de prise alimentaire ont été réalisées par l'équipe de LM.Williams.

I.1.b. Niveaux plasmatiques de leptine et de ghréline.

A trois mois, les taux plasmatiques de leptine sont inférieurs (30%) chez les rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar. Au contraire, les taux plasmatiques de ghréline sont supérieurs (50%) chez les rats Lou/C (Figure 48).



I.2. Expression des sécrétagogues hypothalamiques GHRH et SRIF et de leurs récepteurs.

Nous avons mesuré par PCR quantitative en temps réel, réalisée à partir d'ARN extraits de l'hypothalamus entier, l'expression de GHRH et SRIF. Celle-ci n'est pas significativement différente entre les rats Lou/C et Wistar (Figure 49.A). Au niveau hypophysaire, toujours en utilisant la technique de PCR quantitative en temps réel, aucune différence significative n'a été observée dans l'expression des récepteurs du GHRH (GHRH-R) et du SRIF (isoformes sst-1R, sst-2R, sst-5R), entre les rats Lou/C et Wistar (Figure 49.B).

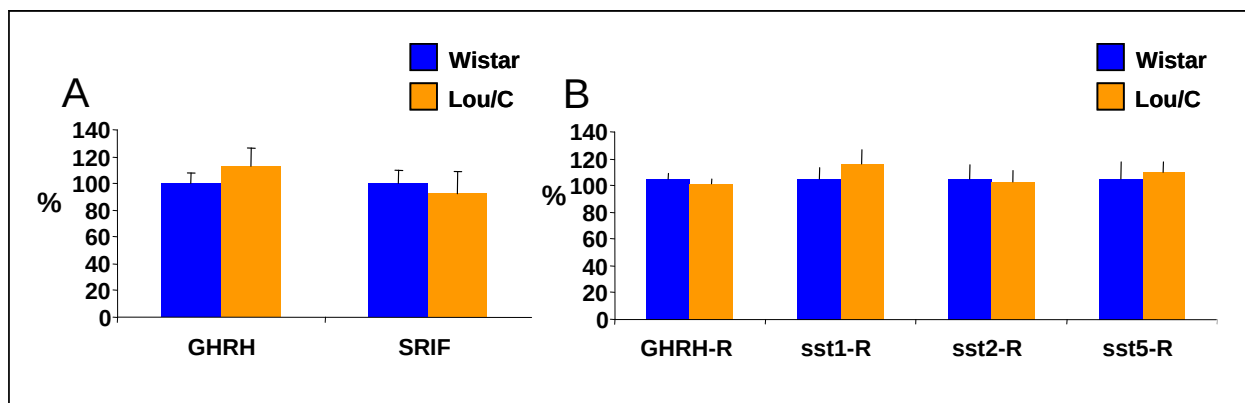


Fig 49: Le système des sécrétagogues GHRH et SRIF chez les rats Lou/C.

A. Etude par PCR quantitative en temps réel de l'expression hypothalamique du GHRH et du SRIF chez les rats Lou/C et Wistar. **B.** Etude par PCR quantitative en temps réel de l'expression hypophysaire des récepteurs du GHRH (GHRH-R) et du SRIF (isoformes sst1-R, sst2-R, sst5-R). Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle (rats Wistar). (Lou/C: n=6 ; Wistar: n=6).

I.3. Expression des récepteurs de la leptine et de la ghréline.

I.3.a. Au niveau hypophysaire.

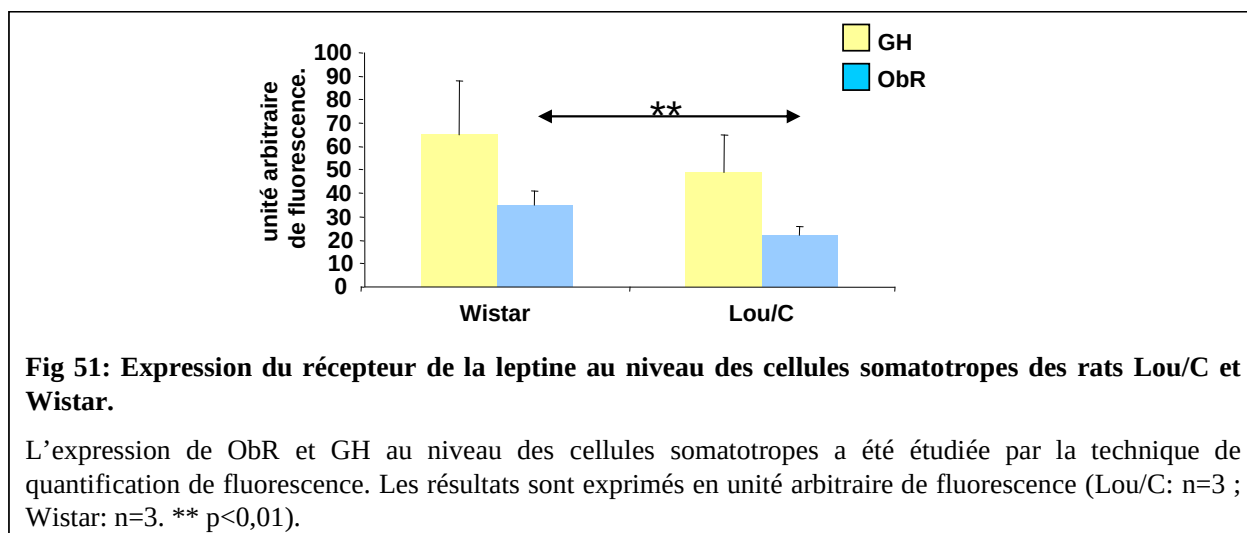
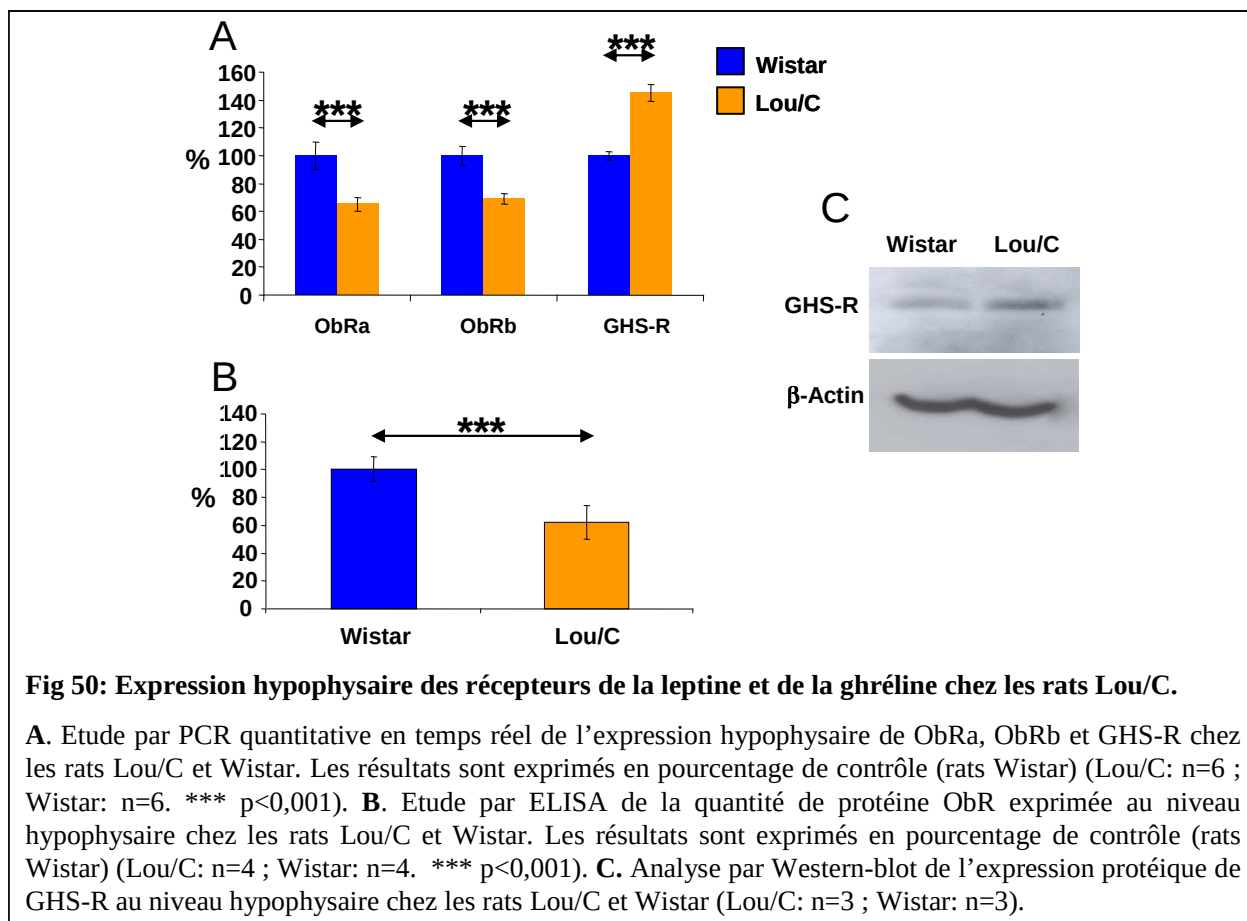
Par PCR quantitative en temps réel, nous avons mis en évidence une expression hypophysaire de ObRa et ObRb inférieure (35 - 40%) chez les rats Lou/C, par comparaison aux rats Wistar (Figure 50.A). Suite à l'utilisation d'un kit commercial ELISA (R&D system), nous avons observé une quantité de protéine ObR (toutes isoformes membranaires confondues) exprimée dans l'hypophyse inférieure (38%) chez les rats Lou/C (Figure 50.B).

L'utilisation de la technique de PCR quantitative en temps réel nous a permis de mettre en évidence une expression hypophysaire de GHS-R supérieure (40%) chez les rats Lou/C, par comparaison aux rats Wistar (Figure 50.A). Au niveau de la protéine, nous avons également observé par la technique de Western-blot, une augmentation de GHS-R au niveau de l'hypophyse chez les rats Lou/C (Figure 50.C).

I.3.b. Au niveau des cellules somatotropes.

Quantification de fluorescence.

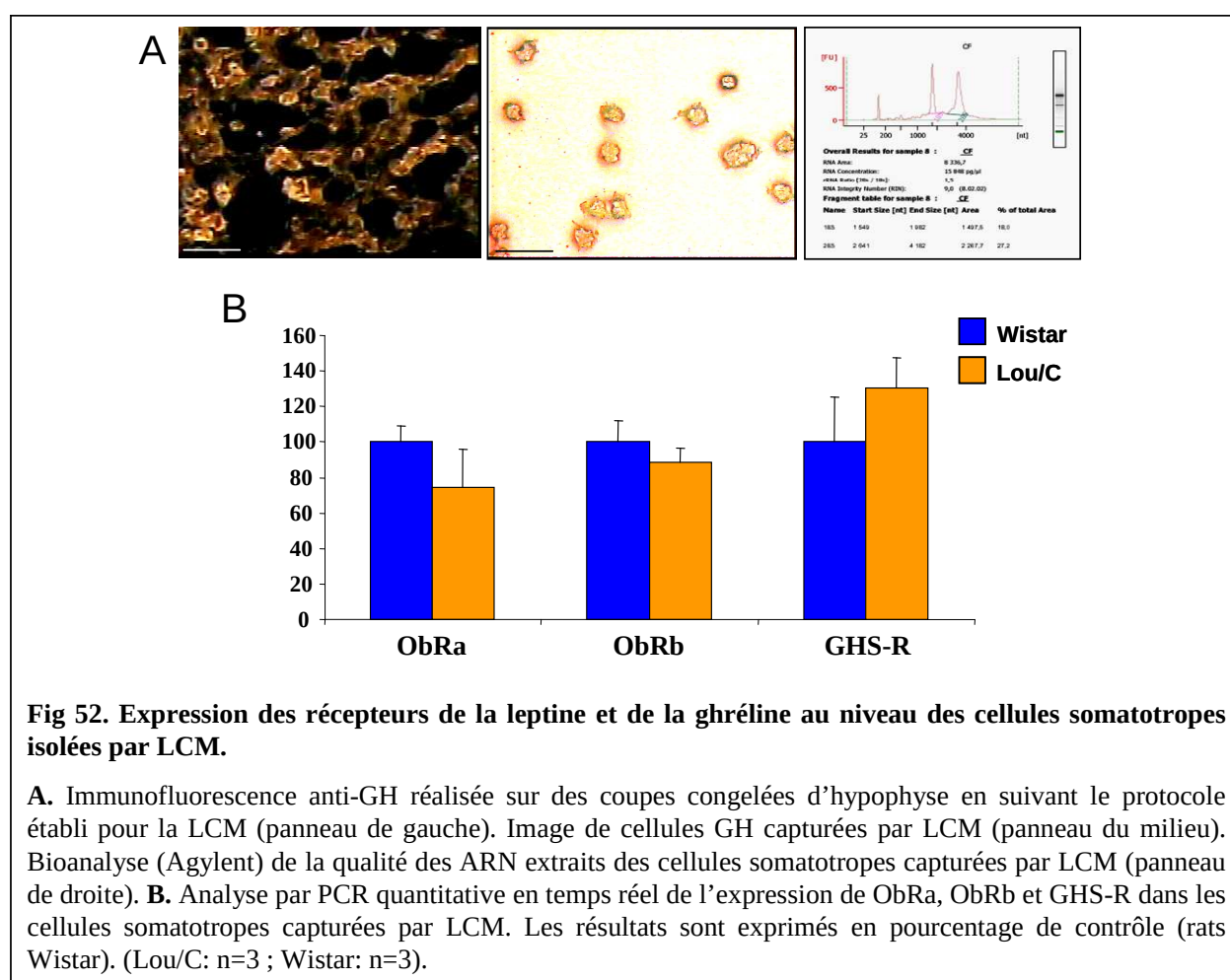
Par la technique de quantification de fluorescence, nous avons mis en évidence une quantité de protéine ObR exprimée au niveau des cellules somatotropes significativement inférieure (40%) chez les rats Lou/C, par comparaison aux rats Wistar (Figure 51). La quantité de protéine GH contenue dans les cellules somatotropes est, quant à elle, comparable entre rats Lou/C et Wistar (Figure 51).



« Laser Capture Microdissection » (LCM)

Nous avons utilisé la technique de LCM afin d'isoler les cellules GH, identifiées par une immunofluorescence réalisée sur des coupes d'hypophyse congelées (Figure 52.A. panneau de gauche). La technique de LCM ne permettant pas, avec les appareils commercialisés à l'heure actuelle, de microdisséquer une seule cellule, nous avons tiré

avantage du fait que les cellules somatotropes sont organisées entre elles en un véritable réseau tridimensionnel à grande échelle au sein de l'hypophyse (voir Introduction - chapitre 4 I.2). Au sein de ce réseau, les cellules GH sont regroupées en amas de plusieurs cellules, permettant leur isolation par la technique de LCM (Figure 52.A panneau central). L'analyse de la qualité des ARN extraits à partir des cellules somatotropes capturées n'a révélé aucune dégradation (Figure 52.A. panneau de droite). Après amplification des ARNm, nous avons réalisé une analyse par PCR quantitative en temps réel de l'expression de ObRa ,ObRb et GHS-R et n'avons observé aucune différence significative entre rats Lou/C et Wistar (Figure 52.B).



I.4. Effets de l'injection de leptine.

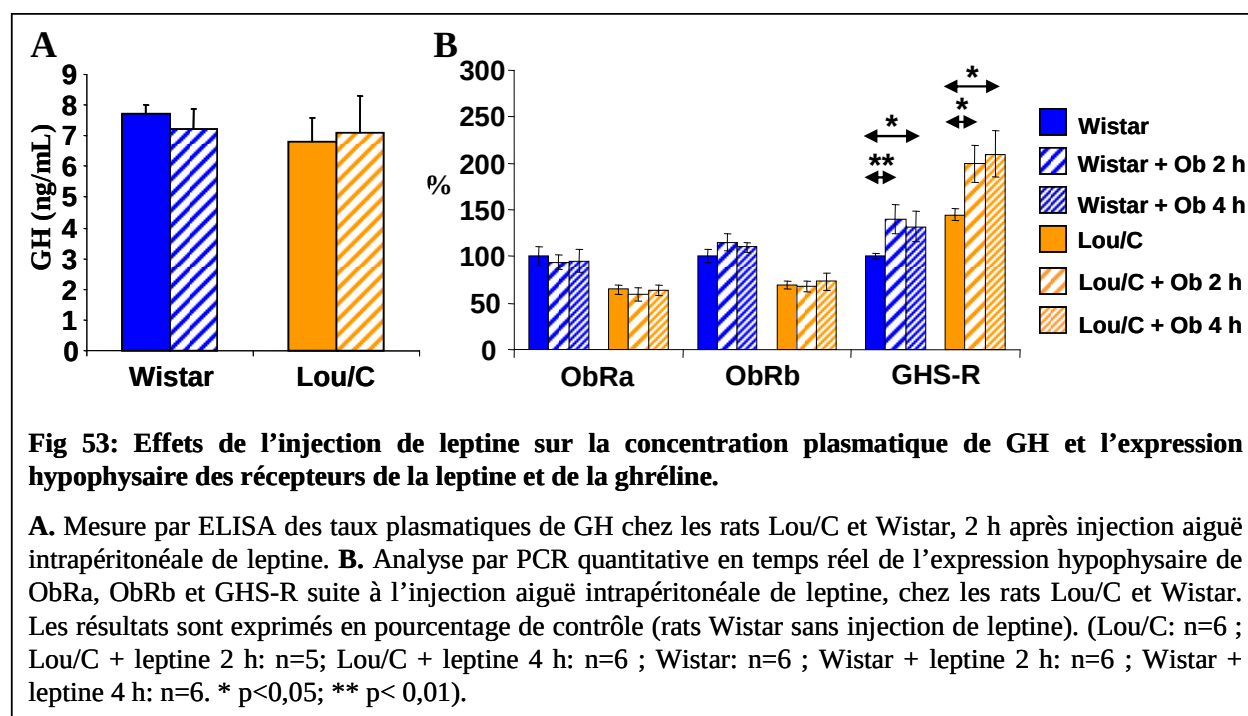
I.4.a. Sur la concentration plasmatique de GH.

Suite à l'injection intrapéritonéale aiguë de leptine (leptine de rat, 2 mg/kg), nous avons mesuré la concentration plasmatique de GH dans les prélèvements sanguins réalisés au

moment de l'euthanasie des rats, à l'aide d'un kit ELISA (ELISA GH rat, Spibio). Aucune différence significative entre la concentration plasmatique de GH des rats Lou/C et Wistar, avant ou après injection de leptine, n'a été observée (Figure 53.A).

I.4.b. Sur l'expression des récepteurs de la leptine et de la ghréline au niveau hypophysaire.

L'injection aiguë intrapéritonéale de leptine (leptine de rat, 2 mg/kg) n'induit pas de modification significative de l'expression hypophysaire de ObRa et ObRb, étudiée par PCR quantitative en temps réel, entre les rats Lou/C et Wistar (Figure 53.B). L'expression de GHS-R est augmentée significativement chez ces deux souches de rats, aussi bien 2 heures que 4 heures après l'injection de leptine (Figure 53.B).



I.4.c. Sur l'expression des récepteurs de GHRH et SRIF.

Dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, les expressions hypophysaires des différentes isoformes du récepteur de SRIF ne sont pas modifiées par l'injection de leptine, aussi bien chez les rats Lou/C que chez les rats Wistar (Figure 54). L'expression hypophysaire de GHRH-R suite à l'injection de leptine n'est pas modifiée chez les rats Wistar, mais est significativement diminuée (24%) chez les rats Lou/C, 2 heures après injection (Figure 54).

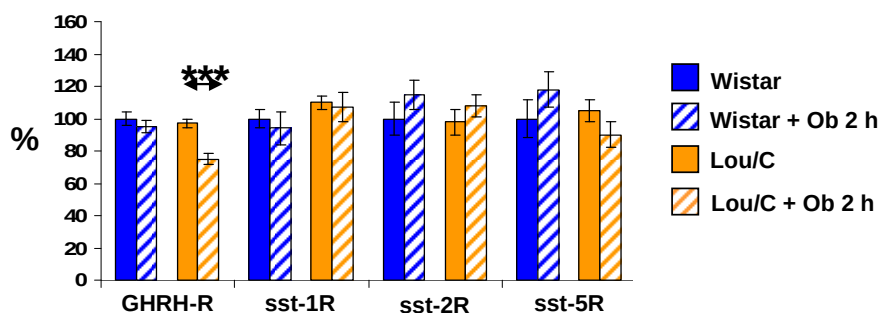


Fig 54: Effets de l'injection de leptine sur l'expression hypothysaire des récepteurs de GHRH et SRIF.

Analyse par PCR quantitative en temps réel de l'expression hypothysaire de GHRH-R, sst-1R, sst-2R, sst-5R, suite à l'injection aiguë intrapéritonéale de leptine, chez les rats Lou/C et Wistar. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle (rats Wistar sans injection de leptine). (Lou/C: n=6 ; Lou/C + leptine: n=5; Wistar: n=6 ; Wistar + leptine: n=6. *** p< 0,001).

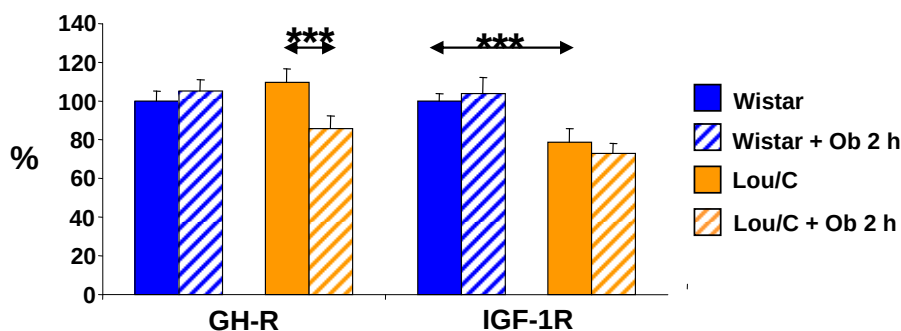


Fig 55: Effets de l'injection de leptine sur l'expression hypothysaire des récepteurs de la GH et d'IGF-1.

Analyse par PCR quantitative en temps réel de l'expression hypothysaire de GH-R et IGF-1R suite à l'injection aiguë intrapéritonéale de leptine, chez les rats Lou/C et Wistar. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle (rats Wistar sans injection de leptine). (Lou/C: n=6 ; Lou/C + leptine: n=5; Wistar: n=6 ; Wistar + leptine: n=6. *** p< 0,001).

I.5. Les rétrocontrôles négatifs de l'axe somatotrope chez les rats Lou/C.

L'étude de l'expression hypothysaire du récepteur de la GH (GH-R) par PCR quantitative en temps réel n'a révélé aucune différence entre rats Lou/C et Wistar. Cependant, suite à l'injection intrapéritonéale de leptine, l'expression de GH-R est significativement diminuée (26%) chez les rats Lou/C (Figure 55). L'expression hypothysaire du récepteur de IGF-1 (IGF-1R) est significativement inférieure (21%) chez les rats Lou/C par comparaison

aux rats Wistar. L'injection intrapéritonéale de leptine n'induit pas de modification significative de l'expression hypophysaire de IGF-1R chez les deux souches de rats (Figure 55).

I.6. SOCS-3.

Au niveau de l'hypophyse, l'analyse par PCR quantitative en temps réel montre que l'expression de SOCS-3 est significativement supérieure (42%) chez les rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar. L'injection aiguë intrapéritonéale de leptine induit une augmentation significative (29%) de l'expression de SOCS-3 chez les rats Wistar (Figure 56). Par la technique de quantification de fluorescence, nous avons observé que la quantité de protéine SOCS-3 exprimée dans les cellules somatotropes est comparable chez les rats Lou/C et Wistar (Figure 56).

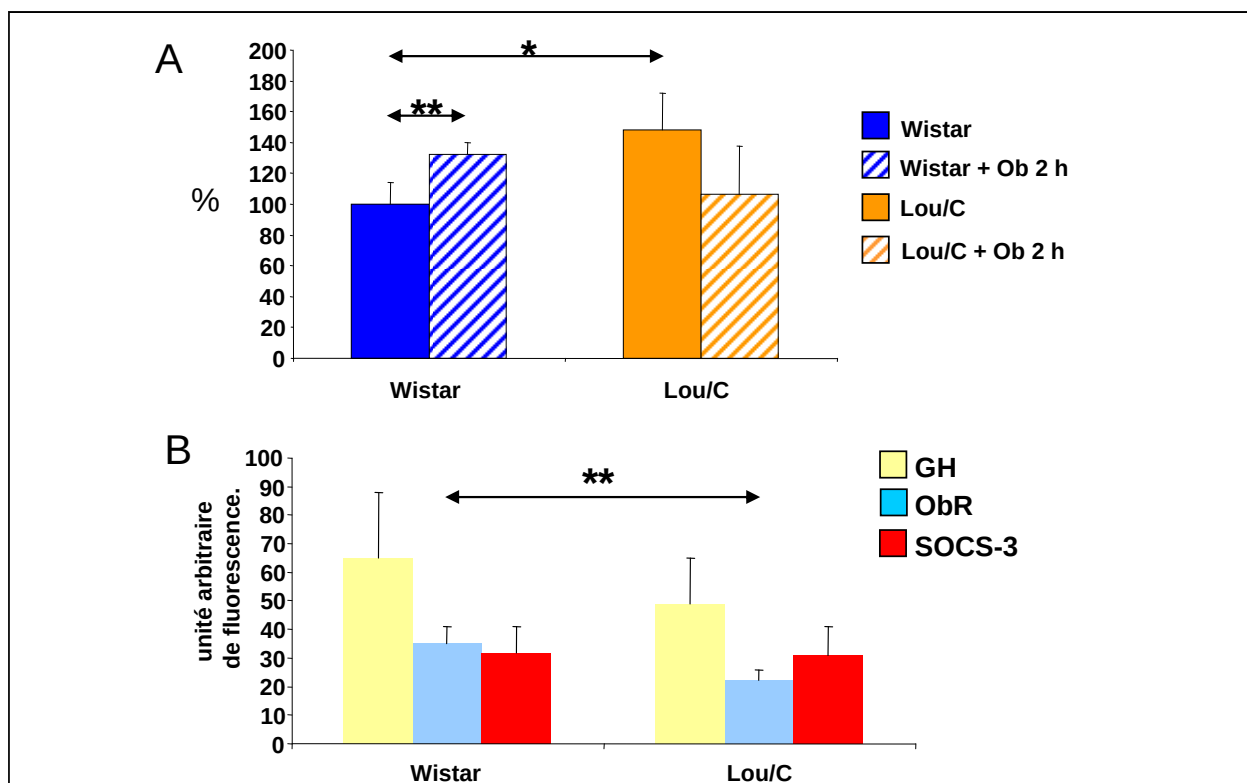


Fig 56: Expression de SOCS-3 chez les rats Lou/C.

A. Analyse par PCR quantitative en temps réel de l'expression hypophysaire de SOCS-3, suite à une injection aiguë intrapéritonéale de leptine, chez les rats Lou/C et Wistar. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle (rats Wistar sans injection de leptine). (Lou/C: n=6 ; Lou/C + leptine 2 h: n=5; Wistar: n=6 ; Wistar + leptine 2 h: n=6. * p<0,05; ** p<0,01). **B.** Analyse de la quantité de protéine SOCS-3 exprimée dans les cellules somatotropes par la technique de quantification de fluorescence. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire de fluorescence. (Lou/C: n=3 ; Wistar: n=3. ** p<0,01).

I.7. Action autocrine/paracrine de la leptine et de la ghréline.

Par PCR quantitative en temps réel nous avons étudié l'expression des hormones leptine et ghréline au niveau de l'hypophyse. L'expression hypophysaire de la leptine est significativement inférieure (32%) chez les rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar. L'expression hypophysaire de la ghréline est elle comparables entre les deux souches de rats (Figure 57).

L'injection aiguë intrapéritonéale de leptine induit une diminution significative de l'expression hypophysaire de la leptine chez les rats Lou/C et Wistar (4 h après injection) (28% et 27% respectivement), mais n'influence pas l'expression hypophysaire de la ghréline (Figure 57).

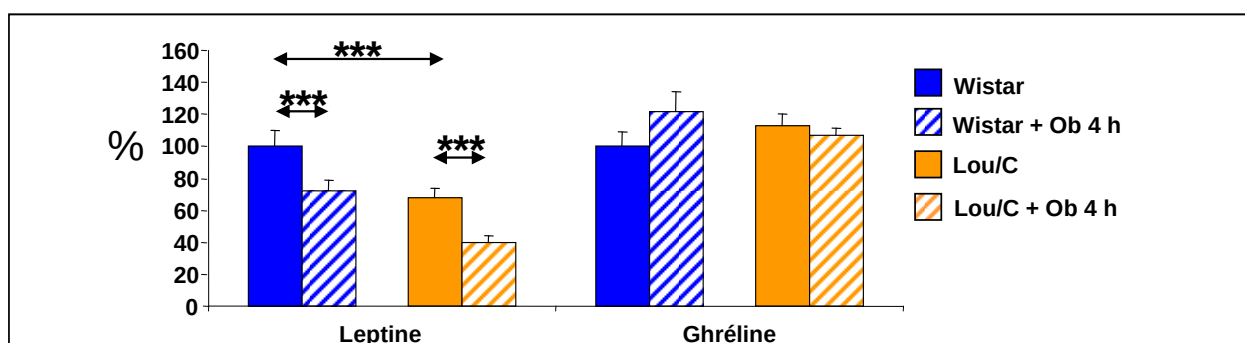


Fig 57: Expression hypophysaire de la leptine et de la ghréline.

Analyse par PCR quantitative en temps réel de l'expression hypophysaire de la leptine et de la ghréline, suite à une injection aiguë intrapéritonéale de leptine, chez les rats Lou/C et Wistar. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle (rats Wistar sans injection de leptine). (Lou/C: n=6 ; Lou/C + leptine 4 h: n=6; Wistar: n=6 ; Wistar + leptine 4 h: n=6. *** p< 0,001).

II. Discussion.

La sécrétion de GH diminue progressivement avec l'âge, mais cette diminution est moins importante chez les rats Lou/C par comparaison au rat Wistar. Néanmoins à l'âge de 3 mois, la sécrétion de GH est comparable entre ces deux souches de rats, aussi bien en terme d'amplitude et de fréquence des pics de sécrétion qu'en terme de contenu hypophysaire en GH (Kappeler L *et al.* 2004a). Cependant nos résultats montrent que les taux plasmatiques de leptine et ghréline varient entre rats Lou/C et Wistar âgés de 3 mois. Ces deux hormones participant à la régulation de la sécrétion de GH, comment expliquer alors que cette sécrétion soit comparable entre les rat Lou/C et Wistar ?

II.1. Le système GHRH / SRIF.

Afin de répondre à cette question, nous avons étudié le système des sécrétagogues hypothalamiques GHRH et SRIF qui sont parmi les principaux régulateurs de la sécrétion de GH. Nos données montrent que l'expression hypothalamique de GHRH et SRIF ainsi que l'expression hypophysaire de leurs récepteurs sont comparables entre rats Lou/C et Wistar. Ceci suggère que le système GHRH / SRIF n'est pas affecté chez les rats Lou/C, même s'il ne faut pas confondre expression et sécrétion des sécrétagogues. Ces résultats sont en accord avec une sécrétion de GH comparable entre ces deux souches de rats, à l'âge de 3 mois.

Néanmoins, les expressions de GHRH et SRIF notamment sont régulées par la leptine et la ghréline entre autres. Ainsi la variation des taux plasmatiques de ces deux hormones chez les rats Lou/C devrait se répercuter sur le système GHRH / SRIF.

II.1.a. Régulation de l'expression du GHRH et de SRIF.

Une expression hypothalamique de GHRH comparable entre rats Lou/C et Wistar a également été mise en évidence par une autre équipe de recherche (Kappeler L *et al.* 2004a). Les neurones à GHRH sont localisés principalement au niveau de l'ARC, et à un moindre degré au niveau du VMH (Bloch B *et al.* 1983). Dans ces noyaux hypothalamiques, l'expression de GHS-R est inférieure chez les rats Lou/C utilisés dans cette étude (Mitchell SE *et al.* 2006), ce qui pourrait compenser l'effet stimulateur sur l'expression hypothalamique de GHRH des taux plasmatiques de ghréline élevés caractéristiques de cette souche de rats (Dickson SL et Luckman SM 1997; Tannenbaum GS *et al.* 2003). Au niveau de l'ARC et du VMH, l'expression de ObRb est également inférieure chez les rats Lou/C utilisés dans cette étude (Mitchell SE *et al.* 2006), qui sont donc caractérisés par des taux plasmatiques de leptine et une expression hypothalamique de son récepteur inférieurs. Ainsi, l'effet stimulateur de la leptine sur l'expression de GHRH (Carro E *et al.* 1999) est plus faible chez les rats Lou/C, par comparaison aux rats Wistar.

Le SRIF est synthétisé principalement par des neurones hypothalamiques localisés au niveau du PVN (Harvey S *et al.* 1994). Aucune information n'est disponible dans la littérature sur l'expression de ObRb et GHS-R au niveau de ce noyau hypothalamique, chez les rats Lou/C. Cependant, l'action hypothalamique de la leptine et de la ghréline sur la sécrétion de GH est médiée en partie par les neurones NPY. L'injection ICV de NPY stimule la sécrétion de SRIF au niveau de la tige pituitaire (Hisano S *et al.* 1990; Rettori V *et al.* 1990) et induit une suppression totale ou partielle de la sécrétion de GH (Rettori V *et al.* 1990; Pierroz DD *et*

al. 1996). Malgré une expression de SRIF comparable entre rats Lou/C et Wistar, l'expression de NPY au niveau de l'ARC est supérieure chez les rats Lou/C utilisés dans cette étude (Mitchell SE *et al.* 2006). L'expression de SRIF est également stimulée par l'insuline chez l'homme et les rongeurs (Harvey S *et al.* 1994), et les taux plasmatiques d'insuline sont inférieurs ou comparables chez les rats Lou/C âgés de 3 mois (Perrin D *et al.* 2003; Kappeler L *et al.* 2004b; Mitchell SE *et al.* 2006).

En conclusion, l'expression hypothalamique de GHRH et SRIF est comparable entre rats Lou/C et Wistar même si les nombreux facteurs contrôlant leur expression varient entre les deux souches de rats, facteurs qui au final se compensent entre eux. Ce cas de figure est également retrouvé dans une étude montrant que chez les souris obèses DIO l'expression de GHRH et SRIF n'est pas modifiée, malgré des taux plasmatiques de ghréline diminués, une hyperleptinémie, une hyperglycémie et une modification de l'expression de NPY (Luque RM et Kineman RD 2006).

L'expression du GHRH est comparable entre rats Lou/C et Wistar tout au long de leur vie (Kappeler L *et al.* 2004a), suggérant que la sécrétion de ce sécrétagogue hypothalamique n'est pas responsable de la plus faible diminution de la sécrétion de GH avec l'âge, caractéristique des rats Lou/C. Aucune donnée concernant l'évolution de l'expression et de la sécrétion de SRIF avec l'âge n'est disponible dans la littérature. En conclusion, l'équilibre GHRH/SRIF n'étant pas affecté chez les rats Lou/C, le niveau hypophysaire de la régulation de la sécrétion de GH prend donc toute son importance.

II.1.b. Régulation de l'expression hypophysaire des récepteurs de GHRH et SRIF.

Concernant l'expression hypophysaire du récepteur de GHRH (GHRH-R) et des différentes isoformes du récepteur de SRIF (sst-1R, sst-2R, sst-5R), aucune différence entre rats Lou/C et Wistar n'a été observée. Cependant, l'hypophyse étant composée de plusieurs populations de cellules endocrines, cela ne veut pas dire que l'expression de ces récepteurs n'est pas modifiée au niveau des cellules somatotropes.

Dans le cas du récepteur de SRIF, seules les isoformes sst-1R, sst-2R et sst-5R sont exprimées dans l'hypophyse, et ce sont sst-2R et sst-5R qui sont principalement impliquées dans le contrôle de la sécrétion de GH chez le rat (Raynor K *et al.* 1993; Shimon I *et al.* 1997). Mais le SRIF participe également, *via* sst-2R et sst-5R, à la régulation de la sécrétion des hormones hypophysaires TSH, PRL et LH (Shimon I *et al.* 1997) et le récepteur de SRIF (toutes isoformes confondues) est localisé dans l'ensemble des cellules endocrines de

l'adénohypophyse (Morel G *et al.* 1985). Ainsi notre étude de l'expression hypophysaire du récepteur de SRIF ne nous donne malheureusement qu'une information incomplète concernant l'impact de SRIF sur la régulation de la sécrétion de GH chez le rat Lou/C.

Le GHRH-R étant exprimé spécifiquement au niveau des cellules somatotropes (Morel G *et al.* 1999), l'expression de ce récepteur au niveau de l'hypophyse entière reflète précisément son expression au niveau de ce type cellulaire. L'expression de GHRH-R est comparable entre rats Lou/C et Wistar âgés de 3 mois, malgré les nombreux facteurs contrôlant son expression qui varient entre ces deux souches de rats.

Ainsi, l'expression de GHRH-R est inhibée par l'insuline (Luque RM et Kineman RD 2006) et IGF-1 (Luque RM *et al.* 2006a). Malgré une sécrétion de GH comparable, les taux plasmatiques d'IGF-1 sont inférieurs chez les rats Lou/C âgés de 3 mois (Kappeler L *et al.* 2004a; Kappeler L *et al.* 2004b). Cependant aucune information n'est disponible sur les taux plasmatiques d'IGF-1 biologiquement actif chez les rats Lou/C et Wistar.

Les FFA, qui sont de puissants inhibiteurs de la sécrétion de GH (Casanueva FF *et al.* 1987; Alvarez CV *et al.* 1991), inhibent l'expression hypophysaire de GHRH-R (Luque RM *et al.* 2006a). Cependant les taux plasmatiques de FFA sont comparables entre rats Lou/C et Wistar âgés de 3 mois (Couturier K *et al.* 2002).

Les hormones Thyroxine (T4) et Triiodothyroxine (T3), sécrétées par la glande thyroïde en réponse à la TSH, stimulent la sécrétion de GH et l'expression hypophysaire de GHRH-R (Miki N *et al.* 1995; Korytko A et Cuttler L 1997). Chez les rats Lou/C utilisés dans cette étude, les taux plasmatiques de TSH et T4 sont inférieurs, tandis que les taux de T3 semblent inchangés (Mitchell SE *et al.* 2006). Cependant, chez les rats Lou/C, le système des hormones thyroïdiennes ne semble pas être un facteur prédominant de la régulation de l'expression hypophysaire de GHRH-R, ceci est dû au fait qu'il n'existe pas de corrélation entre l'évolution de l'expression de GHRH-R avec l'âge et l'évolution des taux plasmatiques de T4 (Veyrat-Durebex C *et al.* 2005).

La leptine et la ghréline régulent également l'expression hypophysaire de GHRH-R mais cette action n'est pas encore clairement définie. La leptine, malgré son action stimulatrice sur la sécrétion de GH, semble inhiber l'expression hypophysaire de GHRH-R, du moins dans un modèle de culture primaire de cellules adénohypophysaires de vache (Roh S-G *et al.*, 2001). La ghréline semble également, de façon encore plus surprenante, inhiber l'expression hypophysaire de GHRH-R dans un modèle de culture primaire de cellules hypophysaires de porc (Luque RM *et al.* 2004).

L'altération de la sécrétion de GH avec l'âge est associée à une diminution de l'expression hypophysaire de GHRH-R et de la réponse des cellules somatotropes au GHRH (Lefrancois L *et al.* 1995; Girard N *et al.* 1999). Cependant, chez les rats Lou/C, l'expression hypophysaire de GHRH-R est relativement constante dans le temps et comparable entre rats âgés (24 mois) et jeunes (3 mois) (Veyrat-Durebex C *et al.* 2005). Sachant que l'évolution avec l'âge de l'expression hypothalamique de GHRH est comparable entre rats Lou/C et Wistar (Kappeler L *et al.* 2004a), l'expression constante de GHRH-R prend toute son importance dans la plus faible diminution de la sécrétion de GH chez les rats Lou/C âgés.

II.2. Expression des récepteurs de la leptine et de la ghréline.

Les taux plasmatiques de ghréline et de leptine étant différents entre rats Lou/C et Wistar, l'étude de l'expression hypophysaire de leurs récepteurs est primordiale pour appréhender la régulation de l'axe GH chez le rat Lou/C. Rappelons ici que les expressions de ObRb et de GHS-R au niveau de l'ARC et du VMH sont inférieures chez les rats Lou/C utilisés dans cette étude (Mitchell SE *et al.* 2006).

II.2.a. Expression hypophysaire de GHS-R.

Comme nous l'avons vu, il faut dissocier les effets orexigéniques et ceux sur la sécrétion de GH de la ghréline. L'action de la ghréline sur la sécrétion de GH semble médiée principalement par l'hypophyse, son effet sur la balance énergétique étant lié à l'hypothalamus (Howard AD *et al.* 1996; Shuto Y *et al.* 2002). De plus, le système GHRH/SRIF n'étant pas affecté chez les rats Lou/C, l'impact des taux plasmatiques de ghréline supérieurs, caractéristiques de cette souche de rats, sur la sécrétion de GH doit donc être examiné au niveau hypophysaire.

Si, chez le rat, l'injection centrale de ghréline stimule la sécrétion de LH, GH, PRL et ACTH (Korbonits M *et al.* 2004; Iqbal J *et al.* 2006), l'injection intraveineuse de ghréline n'influence pas la sécrétion des hormones hypophysaires autres que la GH (Kojima M *et al.* 1999). Cela suggère que GHS-R est exprimé très majoritairement au niveau des cellules somatotropes, ce qui a été confirmé (Smith RG *et al.* 1997; Korbonits M *et al.* 2004). L'expression de GHS-R dans l'hypophyse entière reflète donc son expression dans les cellules somatotropes. Nos résultats obtenus par PCR quantitative en temps réel montrent que l'expression hypophysaire de GHS-R est supérieure chez les rats Lou/C. En conclusion, malgré une synthèse et une sécrétion de GH comparables entre rats Lou/C et Wistar, l'action

de la ghréline est supérieure chez les rats Lou/C (taux de ghréline plasmatique et expression hypophysaire de GHS-R plus élevés). Ceci suggère également, chez les rats Lou/C, un meilleur effet de potentialisation de la ghréline sur la réponse des cellules somatotropes au GHRH dont le taux est similaire entre les deux souches de rats étudiés.

L'expression hypophysaire de GHS-R est inhibée par la GH (Kamegai J *et al.* 1998), les FFA (chez les primates du moins (Luque RM *et al.* 2006a)) et stimulée par le GHRH (Kineman RD *et al.* 1999)), autant de facteurs qui ne varient pas entre rats Lou/C et Wistar âgés de 3 mois. L'expression hypophysaire de GHS-R plus élevée peut être expliquée en partie par l'action de l'insuline qui l'inhibe (Luque RM et Kineman RD 2006) et dont les taux plasmatiques semblent inférieurs chez les rats Lou/C (Perrin D *et al.* 2003; Kappeler L *et al.* 2004b). Les niveaux plasmatiques de T4, qui stimule l'expression hypophysaire de GHS-R (Kamegai J *et al.* 2001a) sont plus élevés chez les rats Lou/C (Mitchell SE *et al.* 2006). Les taux plasmatiques de ghréline sont uniquement supérieurs chez les rats Lou/C âgés de 3 mois et comparables chez les rats Lou/C et Wistar âgés de 24 mois, malgré le lien entre la sécrétion de ghréline et les niveaux de masse adipeuse de l'organisme (Kappeler L *et al.* 2004a). A 24 mois, l'expression hypophysaire de GHS-R est également comparable chez les rats Lou/C et Wistar. Ces données suggèrent que le système ghréline n'est pas impliqué dans la sécrétion de GH supérieure chez le rat Lou/C âgés (Kappeler L *et al.* 2004a).

II.2.b. Expression hypophysaire de ObR.

Comme nous l'avons vu dans la partie Introduction bibliographique, l'action de la leptine au niveau hypophysaire reste soumise à controverse. Dans cette étude, grâce à la technique de PCR quantitative en temps réel, nous avons montré l'expression hypophysaire de ObRa et surtout de ObRb, en utilisant deux couples d'amorces différents dans ce dernier cas afin de réduire les artéfacts expérimentaux. Ce résultat contredit en soit les détracteurs de l'action hypophysaire de la leptine, mais est en adéquation avec les différentes études montrant l'expression hypophysaire de ces deux isoformes de ObR dans l'hypophyse humaine et murine (Cai A et Hyde JF 1998; Dieterich K et Lehnert H 1998; Jin L *et al.* 1999; Morash B *et al.* 1999; Jin L *et al.* 2000; Morash B *et al.* 2001). Nos résultats montrent que l'expression de ObRa et de ObRb dans l'hypophyse entière est inférieure de 35-40% chez les rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar. En utilisant un kit Elisa (R&D system), nous avons également observé que la quantité de protéine ObR (toutes isoformes membranaires confondues) exprimée au niveau de l'hypophyse est inférieure (40%) chez les rats Lou/C.

L'équipe de Osamura montre que ObR est exprimé majoritairement (à 98%) dans les cellules somatotropes (Sone M *et al.* 2001). Cependant, étant donné les multiples actions physiologiques de la leptine et l'importance de l'hypophyse en tant que glande endocrine, il est impossible aux vues des connaissances actuelles d'écarter la possibilité que plusieurs types de cellules endocrines adénohypophysaires expriment ObR. De plus, nos résultats d'immunomarquage anti-ObR dans l'hypophyse montrent que ce récepteur est également localisé dans des cellules autres que les cellules somatotropes.

Nous avons étudié par la technique de quantification de fluorescence la quantité de protéine ObR exprimée au niveau des cellules somatotropes et observé une diminution de cette expression chez les rats Lou/C, diminution qui est du même ordre de grandeur qu'au niveau de l'hypophyse entière (40%). Cette technique a déjà été utilisée précédemment par notre équipe, et bien qu'elle soit peu populaire elle est fiable, même si elle ne donne qu'une approche semi-quantitative de l'expression (Mertani HC *et al.* 2003).

Afin d'étudier, au niveau des cellules somatotropes, l'expression des deux isoformes ObRa et ObRb, que nous ne pouvons distinguer par la technique de quantification de fluorescence (principalement parce qu'il n'existe pas d'anticorps anti-ObRb commercial de qualité), nous avons procédé à l'isolation des cellules somatotropes par la technique de LCM suivie d'une analyse par PCR quantitative en temps réel. Nous avons montré que cette technique est applicable aux cellules somatotropes grâce à leur organisation 3D et au protocole d'immunofluorescence que nous avons développé permettant d'identifier ces cellules sans altérer la qualité des ARN extraits. Ce protocole permet potentiellement de capturer des cellules de n'importe quel tissu, dans la limite de l'organisation spatiale et de l'expression cellulaire de la protéine spécifique permettant leur reconnaissance. En effet notre protocole expérimental a bien fonctionné grâce au fait que la GH est très exprimée dans les cellules somatotropes, permettant leur identification par une réaction d'immunofluorescence très courte dans le temps.

L'utilisation de la LCM nous a permis de montrer que les deux isoformes ObRa et ObRb sont exprimées au niveau des cellules somatotropes, ce qui est déjà un résultat très intéressant en soit.

Cependant les différences d'expression de ObRa, ObRb et GHS-R entre les rats Lou/C et Wistar ne sont pas significatives dans nos conditions expérimentales. Ceci est principalement dû à un manque d'expérience de cette technique. En effet, la capture d'un plus grand nombre de cellules somatotropes à partir de chaque animal nous aurait permis d'une part d'augmenter la quantité d'ARN obtenue après extraction (malgré un nombre de cellules prélevées

largement supérieur à celui recommandé par le fabricant), et d'autre part d'avoir une plus grande vision de l'ensemble de la population des cellules somatotropes. De plus des considérations autres que scientifiques (coût de la LCM) ne nous ont pas permis de réaliser cette technique sur plus de trois rats de chaque catégorie. Dans cette situation, les statistiques ne pardonnent pas le moindre écart.

En conclusion, l'effet de la leptine sur la sécrétion de GH est potentiellement plus faible chez les rats Lou/C. En effet, les faibles taux plasmatiques de leptine sont associés à une plus faible expression du récepteur de la leptine au niveau hypothalamique (ARC et VMH) et hypophysaire. Ceci suggère notamment une altération de la potentialisation de la leptine sur la réponse des cellules somatotropes au GHRH, potentialisation qui a été mise en évidence dans des cultures primaires de cellules adénohypophysaires de rat (Mizuno I *et al.* 1999). Il faut cependant rappeler qu'en comparaison au GHRH et à la ghréline, les effets de la leptine sur la sécrétion de GH sont faibles, et le réel impact d'un système leptine moins « efficace » chez les rats Lou/C en ce qui concerne la GH reste à définir.

II.3. Les boucles de rétrocontrôles négatifs.

La sécrétion de GH est totalement régulée par les rétrocontrôles négatifs hypothalamiques et hypophysaires de la GH et d'IGF-1. Le système GHRH/SRIF étant comparable entre les rats Lou/C et Wistar, nous nous sommes intéressés au niveau hypophysaire des rétrocontrôles. Les taux plasmatiques de GH sont identiques chez les rats Lou/C et Wistar âgés de 3 mois, et nous avons mis en évidence que l'expression hypophysaire du récepteur de la GH l'est également. Ces données montrent que le rétrocontrôle négatif exercé par la GH sur les cellules somatotropes est comparable entre rats Lou/C et Wistar. Néanmoins, encore une fois, il ne faut pas confondre expression hypophysaire et expression au niveau des cellules somatotropes et aucune information, chez le rat Lou/C, n'est disponible concernant les taux plasmatiques de GHBP (« GH Binding Protein ») qui régule les taux plasmatiques de GH biologiquement active.

Les taux plasmatiques d'IGF1 sont inférieurs chez les rats Lou/C âgés de 3, 12 et 24 mois par comparaison aux rats Wistar du même âge (Kappeler L *et al.* 2004a).

Les auteurs de cette étude suggèrent alors, aux vues de la sécrétion de GH comparable entre les rats Lou/C et Wistar âgés de 3 mois, une résistance à la GH chez les rats Lou/C. Cependant cette hypothèse est envisageable si la taille inférieure des rats Lou/C et leur longévité accrue est prise en considération (les souris transgéniques surexprimant IGF-1

vivent en effet moins longtemps (Bartke A 2003)), mais l'est moins aux vues de la faible adiposité de ces rats, et de leur développement somme toute normal. Le récepteur de l'IGF-1 est exprimé au niveau des cellules somatotropes (Eppler E *et al.* 2007) et nous avons mis en évidence que son expression hypophysaire est inférieure chez les rats Lou/C, suggérant que le rétrocontrôle négatif exercé par IGF-1 sur les cellules somatotropes est réduit chez cette souche de rat (IGF-1 plasmatique et expression hypophysaire de IGF-1R réduits). Cependant, comme nous l'avons déjà signalé, chez les rats Lou/C, aucune information n'est disponible sur les taux plasmatiques de IGF-1BP, qui régule la quantité d'IGF-1 biologiquement active.

II.4 Effets de l'injection de leptine sur l'axe GH des rats Lou/C et Wistar.

Les rats Lou/C étant caractérisés par des taux plasmatiques de leptine inférieurs à ceux des rats Wistar, nous avons émis l'hypothèse d'une sensibilité à la leptine différente entre ces deux souches de rats. De plus, chez les rats Lou/C utilisés au cours de cette étude, l'expression de SOCS-3 au niveau de l'ARC n'est pas modifiée par une injection intrapéritonéale de leptine, contrairement aux rats Wistar où elle est augmentée, suggérant une sensibilité à la leptine inférieure au niveau central chez les rats Lou/C (Mitchell SE *et al.* 2006). Chez les rats Sprague-Dawley alimentés, l'infusion ICV de leptine augmente l'amplitude des pulses de GH et la réponse au GHRH, tandis que l'injection ICV de leptine (aiguë) n'induit pas de modification de la sécrétion de GH (Carro E *et al.* 1997; Tannenbaum GS *et al.* 1998). Ceci suggère que la leptine, à sa concentration plasmatique standard (rats alimentés normalement), exerce un effet maximal sur la sécrétion de GH. Aux vues de leur faible taux plasmatique de leptine, les rats Lou/C pourraient représenter un bon modèle d'étude des effets de la leptine sur l'axe GH.

Suite à l'injection de leptine, nous n'avons observé aucune modification de la concentration plasmatique de GH (2 h après injection) chez les rats Lou/C et Wistar. Il est important de préciser que dans cette expérience, les rats ont tous été euthanasiés à la même heure de la journée (12h30 +/- 30 min). Cependant, il faut noter que la technique de mesure de la sécrétion de GH que nous avons utilisé n'est pas représentative. En effet, il aurait fallu réaliser des profils de sécrétion de GH dans le temps afin de visualiser les pics de sécrétion. De plus, dans le cas de l'injection aiguë d'une hormone, ses effets sur la GH dépendent du moment de l'injection, s'il correspond à un pic de sécrétion de GH ou s'il le précède. Ainsi dans nos conditions expérimentales, l'absence d'effet de la leptine sur les taux plasmatiques

de GH n'implique pas définitivement une absence d'effet de la leptine sur la sécrétion de GH. L'infusion intrapéritonéale sur plusieurs jours ou l'injection ICV (en aiguë ou infusion) de leptine auraient peut-être permis de mettre en évidence une différence de sensibilité à la leptine vis-à-vis de la sécrétion de GH entre ces deux souches de rats.

Malgré le manque d'effet visible sur la sécrétion de GH de l'injection intrapéritonéale de leptine, celle-ci induit des modifications de l'expression de certains composants de l'axe GH. Ainsi au niveau de l'hypophyse, l'injection de leptine stimule l'expression de GHS-R chez les rats Lou/C et Wistar, tandis que l'expression des isoformes ObRa et ObRb n'est pas affectée. La relation entre la leptine et l'expression de GHS-R a déjà été observée au niveau central (Hewson AK *et al.* 2002; Nogueiras R *et al.* 2004), mais nous apportons ici la première démonstration d'un tel effet au niveau hypophysaire. De façon intéressante, la leptine et la ghréline exercent des effets antagonistes sur le contrôle de la balance énergétique au niveau central et l'injection ICV de leptine inhibe l'expression de GHS-R au niveau de l'ARC (Nogueiras R *et al.* 2004). Au niveau de l'hypophyse, où la leptine et la ghréline exercent des effets synergiques sur la sécrétion de GH, nous montrons que l'injection de leptine stimule l'expression de GHS-R. Encore une fois, il s'agit d'un argument tendant à différencier les effets de la ghréline sur la balance énergétique et sur la sécrétion de GH.

L'injection intrapéritonéale de leptine induit dans nos conditions expérimentales une diminution de l'expression du récepteur de la GH, mais uniquement chez les rats Lou/C. Cet effet de la leptine sur l'expression hypophysaire du GH-R n'a, à ma connaissance, jamais été mis en évidence. Ainsi chez les rats Lou/C, la leptine influencerait négativement le système de rétrocontrôle de la GH sur sa propre sécrétion, ce qui est en adéquation avec l'effet stimulateur de la leptine sur la sécrétion de GH. Cependant, les taux plasmatiques de leptine et l'expression hypophysaire de ObRa et ObRb sont plus faibles chez les rats Lou/C, et un tel effet de la leptine exogène sur l'expression de GH-R reste difficile à intégrer dans le cadre de la régulation de l'axe GH, dans cette souche de rats.

L'injection intrapéritonéale de leptine induit également une diminution de l'expression hypophysaire de GHRH-R, mais chez les rats Lou/C uniquement, ce qui est contraire à l'effet stimulateur de la leptine sur la sécrétion de GH et à son effet de potentialisation de la réponse des cellules somatotropes au GHRH (Mizuno I *et al.* 1999; Zieba DA *et al.* 2003). Un tel effet inhibiteur de la leptine sur l'expression de GHRH-R a déjà été mis en évidence dans un modèle expérimental de cultures primaires d'adénohypophyses de bovins (Roh S-G *et al.* 2001). Les deux résultats précédents montrent que la sensibilité hypophysaire à la leptine, en ce qui concerne l'axe GH, est supérieure chez les rats Lou/C, malgré une expression

hypophysaire de ObRa et ObRb inférieure. Cependant, l'effet de l'injection de leptine sur l'expression hypophysaire de GHS-R est comparable entre rats Lou/C et Wistar. Nous avons montré que l'expression de SOCS-3 au niveau des cellules somatotropes est comparable chez les rats Lou/C et Wistar, ce qui est également le cas au niveau de l'ARC chez les rats utilisés dans cette étude (Mitchell SE *et al.* 2006). L'injection de leptine induit une augmentation significative de l'expression hypophysaire de SOCS-3 chez les rats Wistar, alors qu'elle n'est pas modifiée chez les rats Lou/C. Toutefois, mesurer l'expression de SOCS-3 au niveau de l'hypophyse entière ou des cellules somatotropes n'a en réalité que peu de sens, étant donné le rôle central de l'hypophyse et le nombre important de cytokines agissant à ce niveau. Nous n'avons pas examiné chez les rats Lou/C et Wistar l'effet de l'injection intrapéritonéale de leptine sur l'expression hypothalamique de GRHR et SRIF. Cependant aux vues des études menées par d'autres équipes de recherche (Carro E *et al.* 1999), il est peu probable que l'injection de leptine dans nos conditions expérimentales ait un effet sur l'expression de ces sécrétagogues hypothalamiques.

II.5. Action autocrine/paracrine de la leptine hypophysaire.

La leptine et la ghréline sont exprimées au niveau hypophysaire (Jin L *et al.* 1999; Morash B *et al.* 1999; Jin L *et al.* 2000; Korbonits M *et al.* 2001). La fonction de cette synthèse ectopique est encore mal définie, mais il a été proposé que l'action autocrine/paracrine de la leptine hypophysaire participe à la régulation de la sécrétion de GH (Sone M *et al.*, 2001a ; Sone M *et al.*, 2001b).

Nous avons mesuré par PCR quantitative en temps réel l'expression hypophysaire de la ghréline et de la leptine chez les rats Lou/C et Wistar, traités ou non par la leptine (injection aiguë intrapéritonéale). Nous n'avons observé aucune différence significative dans l'expression hypophysaire de la ghréline entre rats Lou/C et Wistar, et aucun effet de la leptine sur cette expression. Ces données montrent que l'expression hypophysaire de la ghréline n'est pas corrélée aux taux plasmatiques de leptine, contrairement à son expression stomacale.

L'expression de la leptine hypophysaire est significativement inférieure chez les rats Lou/C par comparaison aux rats Wistar et l'injection intrapéritonéale de leptine induit une diminution significative de cette expression chez ces deux souches de rats. Ces résultats montrent que l'expression hypophysaire de la leptine est corrélée aux niveaux plasmatiques de leptine, suggérant une relation entre le statut métabolique de l'organisme et l'action

autocrine/paracrine de la leptine au niveau hypophysaire, et donc potentiellement un effet du statut métabolique sur la sécrétion de GH, *via* la leptine hypophysaire.

III. Conclusion.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude nous a permis d'améliorer la connaissance du contrôle de la sécrétion de GH chez les rats Lou/C, dont l'étude avait notamment été abordée dans deux articles publiés durant cette thèse (Kappeler L *et al.* 2004a; Kappeler L *et al.* 2004b). La sécrétion de GH est comparable entre rats Lou/C et Wistar à l'âge de 3 mois, malgré les variations d'importants régulateurs de l'axe GH et notamment les taux plasmatiques de leptine et ghréline.

Le niveau de régulation hypophysaire est primordial pour expliquer ce phénomène, l'équilibre hypothalamique GHRH/SRIF n'étant pas modifié entre les rats Lou/C et Wistar. L'action hypophysaire de la ghréline est supérieure chez les rats Lou/C (taux plasmatiques de ghréline et expression hypophysaire de GHS-R supérieurs), tandis que l'action de la leptine est inférieure (taux plasmatiques de leptine et expression hypophysaire de ObR inférieurs). Les rats Lou/C sont également caractérisés par une diminution du rétrocontrôle négatif exercé par IGF-1 sur la sécrétion de GH (taux plasmatiques de IGF-1 et expression hypophysaire de IGF-1R inférieurs).

Il serait intéressant de réaliser la même étude de l'expression des principaux régulateurs et composants de l'axe GH en fonction de l'âge des rats Lou/C et Wistar, afin d'identifier les facteurs responsables de la diminution de la sécrétion de GH ralentie chez le rat Lou/C, autres que l'expression hypophysaire stable dans le temps de GHRH-R.

Nous avons montré que ObRa et ObRb sont exprimés au niveau des cellules somatotropes, et que la leptine régule l'expression hypophysaire de composants de l'axe GH comme le GHRH-R, le GH-R et surtout le GHS-R. Ces résultats plaident en faveur d'un impact direct de la leptine au niveau hypophysaire sur la sécrétion de GH. De plus, nous avons mis en évidence que l'expression ectopique de leptine au niveau de l'hypophyse est corrélée aux taux plasmatiques de leptine. Ainsi, le statut métabolique de l'organisme pourrait influencer la sécrétion de GH via l'action paracrine/autocrine de la leptine hypophysaire sur les cellules somatotropes. Etant donné l'importance de la leptine dans le contrôle de nombreuses fonctions physiologiques comme le métabolisme énergétique et la reproduction, et étant donné le rôle majeur de l'hypophyse en tant que glande endocrine de référence, dont les hormones jouent également un rôle clé dans ces fonctions, il est nécessaire aux vues de

nos résultats, de réévaluer de façon positive l'action directe de la leptine sur la fonction hypophysaire.

Etude 3 : Relation entre le processus d'internalisation du récepteur de la leptine ObRb et l'activation des voies de signalisation.

L'internalisation des récepteurs est un processus clé dans la régulation des effets cellulaires d'une hormone. Malgré l'importance physiologique de la leptine, peu d'études ont été réalisées dans ce domaine et la mécanistique de l'internalisation du récepteur ObRb est encore mal définie. Le premier objectif de cette étude est d'approfondir les connaissances concernant l'internalisation de ObRb et la régulation du nombre de ObRb localisés à la surface cellulaire.

L'internalisation d'un récepteur peut influencer la mise en place des voies de transduction du signal sous-jacentes. Si une telle relation était vérifiée dans le cadre de ObRb, l'exposition prolongée à de fortes concentrations plasmatiques en leptine, caractéristiques de l'obésité, pourrait entraîner à terme une modification du processus d'internalisation de ObRb, et une déficience des voies de transduction du signal activées par la leptine participant au phénomène de résistance à la leptine. Le deuxième objectif de cette étude est d'étudier *in vitro* la relation entre internalisation de ObRb et activation des voies de signalisation en réponse à la leptine

I. Caractérisation de l'internalisation de ObRb.

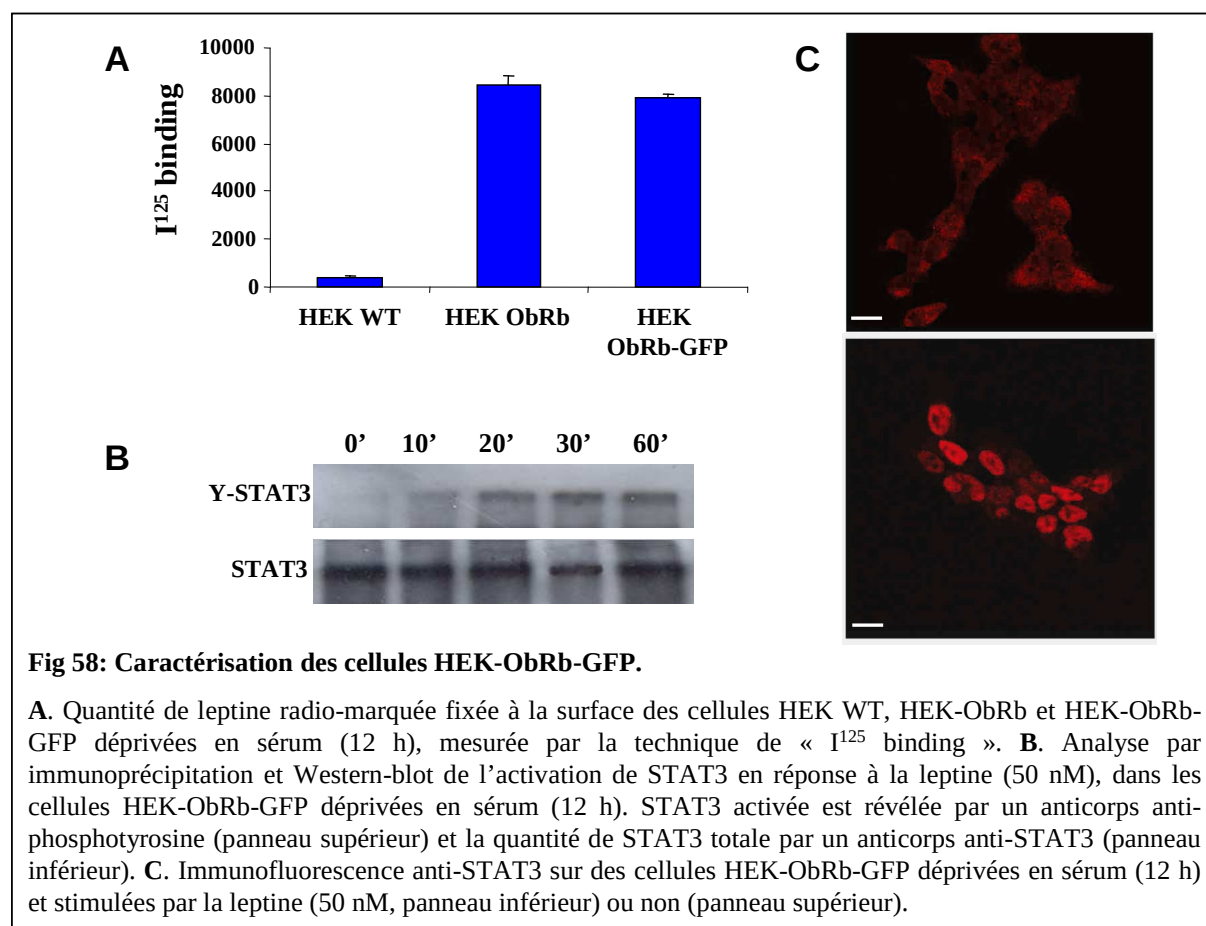
I.1. Choix et caractérisation du modèle cellulaire.

I.1.a. Choix du modèle d'étude.

Afin d'étudier les caractéristiques de l'internalisation du récepteur de la leptine ObRb, et devant l'absence de lignées cellulaires exprimant ObRb de façon endogène, nous avons choisi comme modèle d'étude principal les cellules HEK293 (HEK ; « Human Embryonic Kidney ») surexprimant de façon stable ObRb (de souris), couplé ou non à la protéine GFP insérée dans le domaine intracellulaire du récepteur (HEK-ObRb ; HEK-ObRb-GFP). Les raisons du choix de la lignée cellulaire HEK sont multiples : i) ce sont des cellules couramment utilisées dans l'étude des mécanismes d'internalisation, ii) les précédentes études réalisées dans le domaine de l'internalisation du récepteur de la leptine ont utilisé comme modèle cellulaire les cellules CHO et COS-7 ; les caractéristiques d'internalisation d'un récepteur pouvant varier selon le type cellulaire, l'utilisation des cellules HEK nous permet de

confronter nos résultats à ceux déjà publiés. Nous avons également utilisé avec parcimonie des cellules CHO transfectées transitoirement avec les mêmes constructions ObRb et ObRb-GFP (CHO-ObRb ; CHO-ObRb-GFP).

Un des problèmes majeurs rencontrés dans l'étude de la leptine et de son récepteur en général est le manque d'anticorps commerciaux anti-ObR de qualité et polyvalents. Nous avons utilisé la protéine GFP, couplée à ObRb, permettant de faciliter la visualisation de ce récepteur en microscopie. La GFP permet également de faciliter les techniques classiques de biochimie (Western-blot et immuno-précipitation) en l'utilisant comme étiquette moléculaire.



I.1.b. Caractérisation fonctionnelle des cellules HEK-ObRb-GFP.

Les clones HEK-ObRb et HEK-ObRb-GFP utilisés dans cette étude ont été caractérisés, afin de vérifier que l'insertion de la protéine GFP dans le domaine intracellulaire du récepteur n'induit pas de modification significative sur l'impact de la leptine. Les cellules HEK-ObRb-GFP et HEK-ObRb présentent des constantes de liaison à la leptine comparables, même si elles sont légèrement inférieures dans les cellules HEK-ObRb-GFP, signe probable d'une différence d'expression du récepteur entre les clones sélectionnés (Figure 58.A).

Dans les cellules HEK-ObRb-GFP, l'activation de la protéine STAT3 en réponse à une stimulation par la leptine (50 nM) est observable après 10 minutes de stimulation, et est maximale après 30 minutes de stimulation (Figure 58.B). Dans les cellules HEK-ObRb-GFP, la protéine STAT3 une fois activée subit une translocation nucléaire. Cette dernière a été observée 30 minutes après la stimulation par la leptine (Figure 58.C).

I.2. Localisation intracellulaire de ObRb.

Dans les cellules HEK-ObRb-GFP observées directement en microscopie confocale, le signal GFP est faible et ObRb-GFP n'est visible qu'au niveau de quelques structures cellulaires (Figure 59, panneau de gauche). Les raisons de cette faible fluorescence spontanée sont inconnues, et ce problème a été rencontré avec l'ensemble des clones isolés exprimant ObRb-GFP. Les mêmes difficultés ont été rencontrées par d'autres équipes de recherche et semblent liées à une expression de ObRb-GFP relativement faible dans les cellules eucaryotes malgré l'utilisation de vecteurs d'expression efficaces (Dr C.Bjorbaek, communication personnelle). Nous avons contourné ce problème de visualisation en réalisant une immunofluorescence anti-GFP révélée par un anticorps secondaire de type Alexa émettant dans le vert (Alexa 488) ou le rouge (Alexa 540) selon les besoins (Figure 59, panneaux central et de droite). Les anticorps Alexa possèdent une capacité d'émission de fluorescence supérieure à la GFP (plusieurs fluorochromes sont fixés sur une molécule d'IgG), permettant une visualisation de ObRb-GFP plus performante, et de révéler ainsi une localisation de ObRb invisible auparavant. Dans ces conditions, l'utilisation de la GFP couplée à ObRb peut sembler superflue, mais cette protéine sert alors d'étiquette moléculaire, à la manière d'épitopes Flag ou HA.

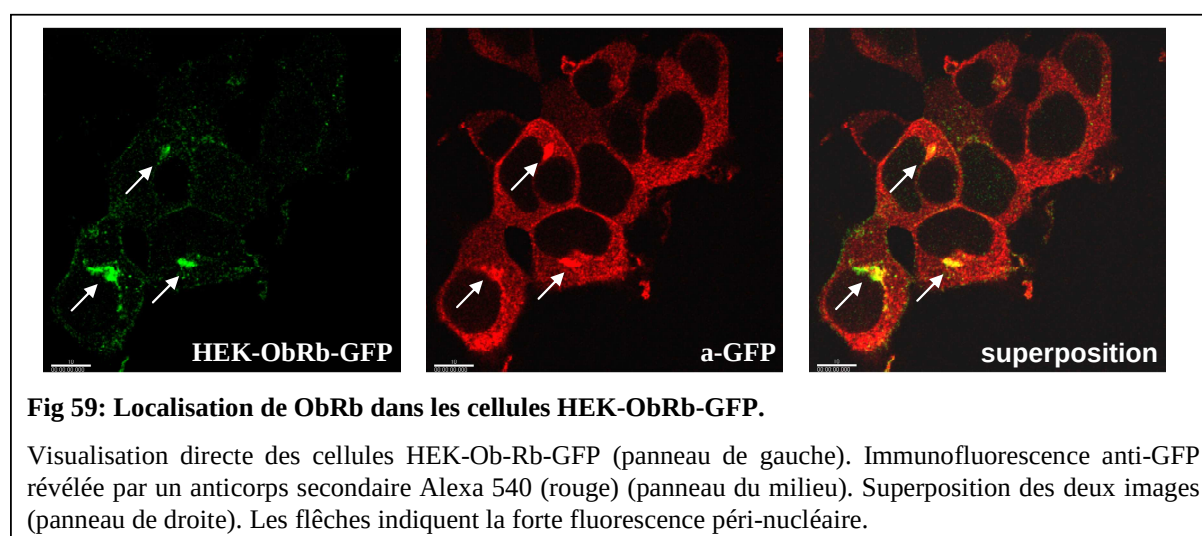
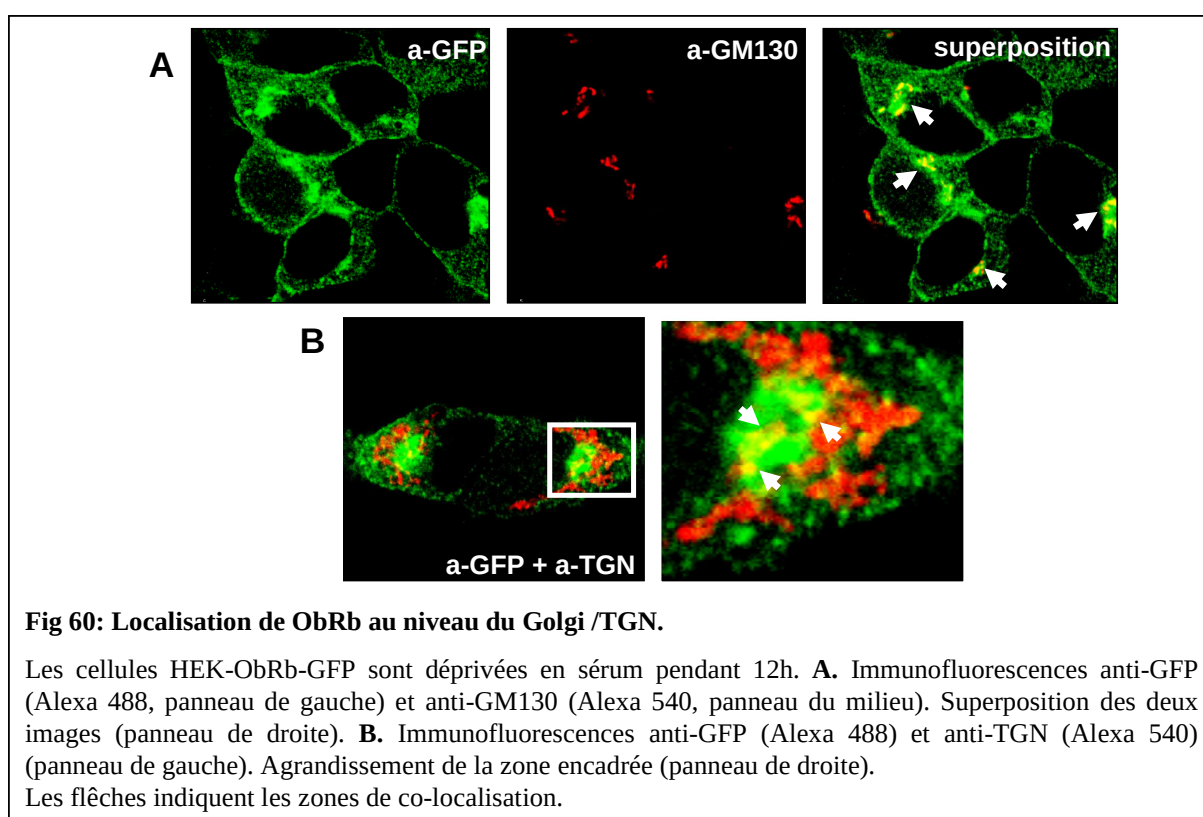


Fig 59: Localisation de ObRb dans les cellules HEK-ObRb-GFP.

Visualisation directe des cellules HEK-Ob-Rb-GFP (panneau de gauche). Immunofluorescence anti-GFP révélée par un anticorps secondaire Alexa 540 (rouge) (panneau du milieu). Superposition des deux images (panneau de droite). Les flèches indiquent la forte fluorescence péri-nucléaire.

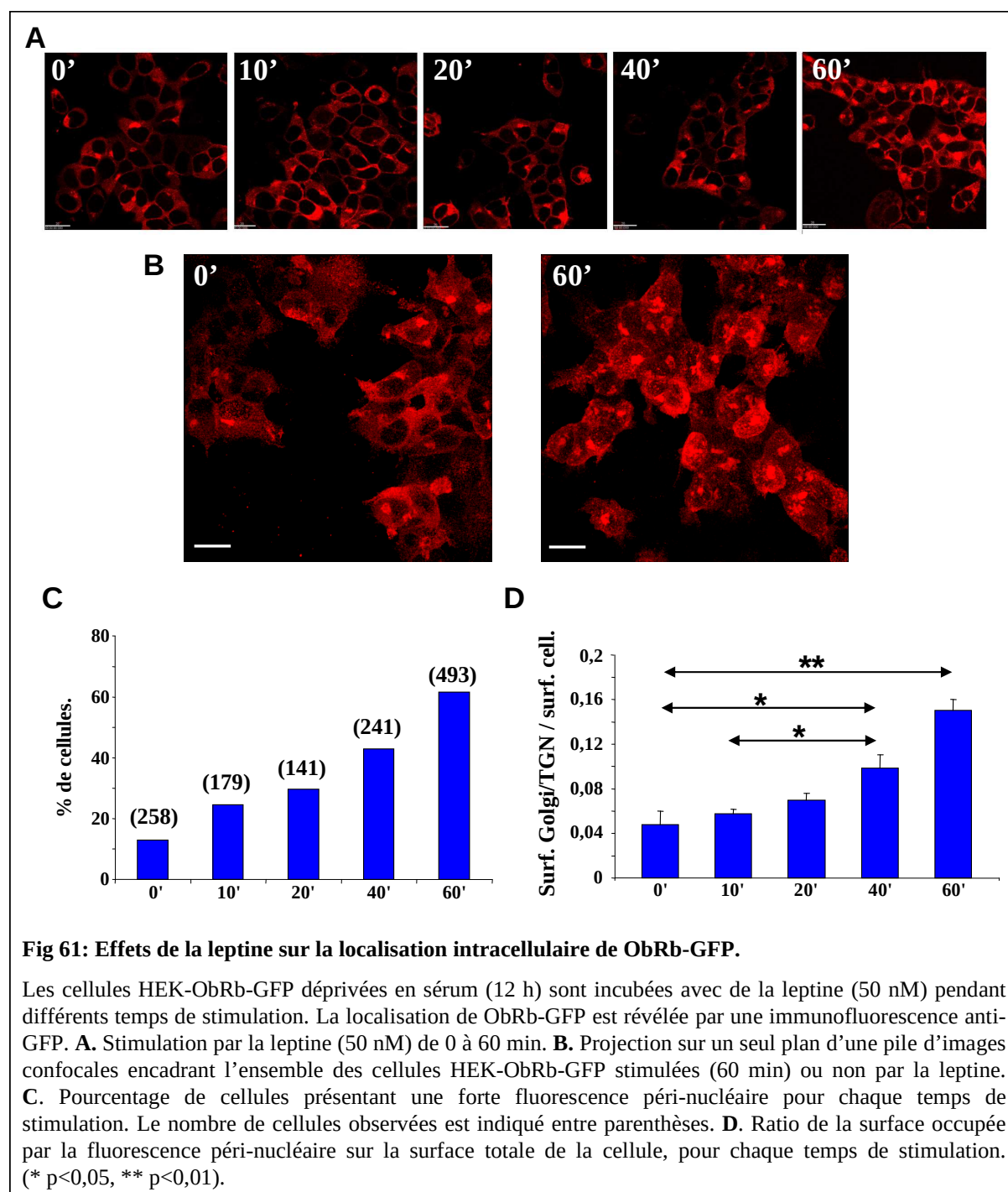
I.2.a. ObRb est localisé principalement au niveau du Golgi/TGN.

Dans les cellules HEK-ObRb-GFP déprivées en sérum pendant 12h et non stimulées par la leptine, ObRb-GFP est localisé sur l'ensemble du cytoplasme et, dans certaines cellules, plus particulièrement au niveau d'une zone péri-nucléaire (Figures 59-60). Dans ces conditions expérimentales, la localisation de ObRb-GFP au niveau de la membrane plasmique est difficilement détectable. La zone péri-nucléaire, associée à l'intensité de fluorescence la plus importante dans les cellules HEK-ObRb-GFP, a été identifiée par co-localisation comme correspondant principalement à l'appareil de Golgi et au « Trans-Golgi Network » (Golgi/TGN) (Figure 60).



I.2.b. Effets de la leptine sur la localisation intracellulaire de ObRb.

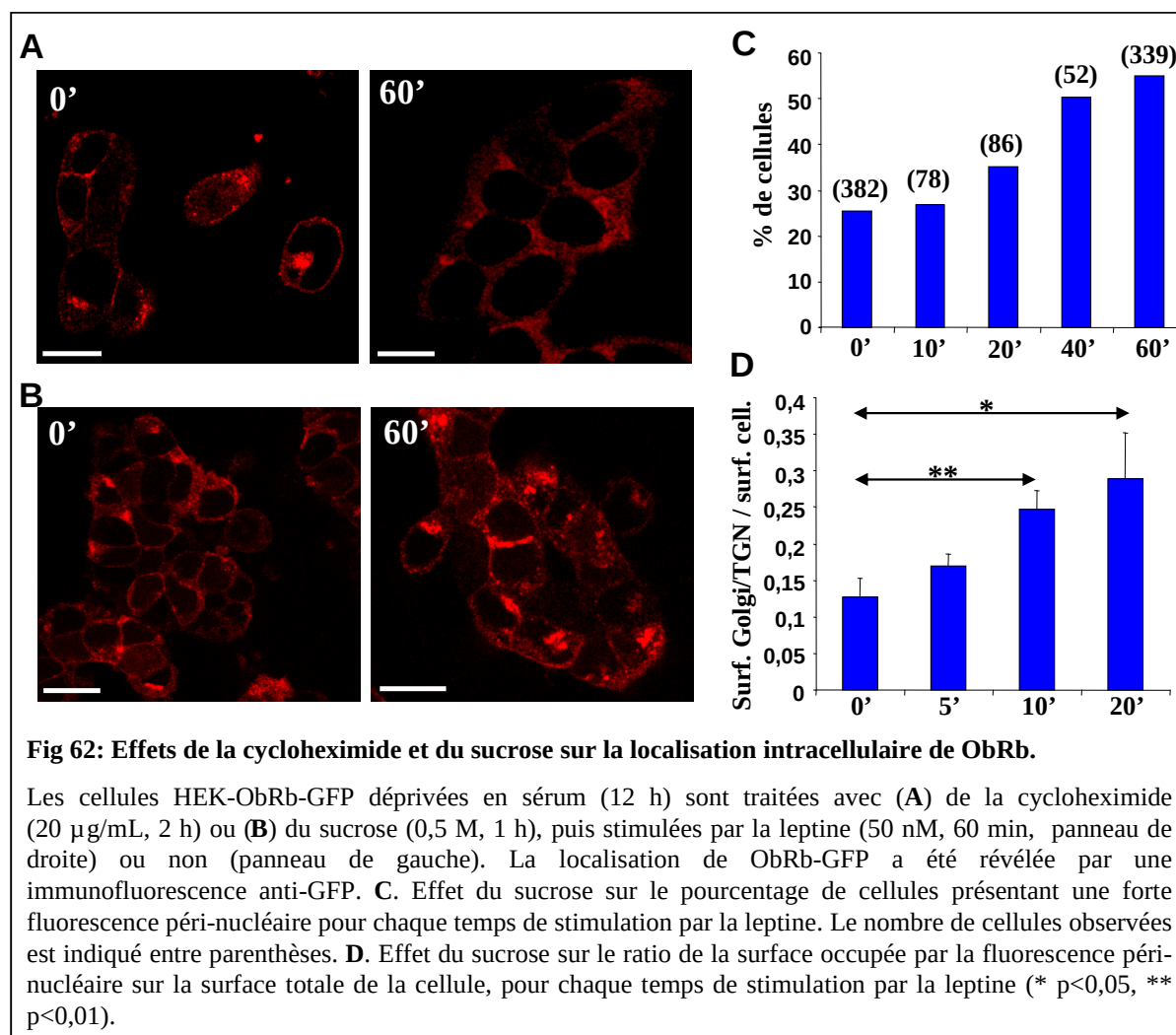
Dans les cellules HEK-ObRb-GFP déprivées en sérum (12 h), la stimulation par la leptine (50 nM) à « court terme » (5 à 20 minutes) n'induit pas de modification visible de la localisation intracellulaire de ObRb-GFP. Cependant, la stimulation par la leptine (50 nM) à « plus long terme » (40 à 60 minutes) induit une augmentation de la fluorescence associée au Golgi/TGN (figure 61.A, B), aussi bien en terme de nombre de cellules caractérisées par une forte fluorescence au niveau du Golgi/TGN (figure 61.C), qu'en terme de surface intracellulaire occupée par la fluorescence associée au Golgi/TGN (figure 61.D).



I.2.c. Effets du sucrose et de la cycloheximide sur la localisation intracellulaire de ObRb.

Dans les cellules HEK-ObRb-GFP stimulées ou non par la leptine (50 nM) et traitées avec de la cycloheximide (20 µg/mL, 2 h), un inhibiteur de la synthèse protéique, la fluorescence localisée au niveau du Golgi/TGN diminue fortement et n'est plus détectable sur l'ensemble des cellules observées (figure 62.A). Ce résultat montre que les récepteurs localisés au niveau de cette zone subcellulaire correspondent à des récepteurs ObRb-GFP néo-

synthétisés. L'inhibition du processus d'endocytose par l'utilisation d'un milieu hypertonique (sucrose 0,5 M pendant 1 h), ne modifie pas la localisation intracellulaire de ObRb-GFP dans les cellules traitées et non traitées par la leptine (Fig 62.B), et n'empêche pas l'augmentation de la fluorescence associée au Golgi/TGN suite à une stimulation par la leptine (Fig 62.C.D).



I.3. Caractéristiques de l'internalisation de la leptine et de son récepteur.

I.3.a. Cinétique d'internalisation de la leptine.

La vitesse d'internalisation de la leptine, dans les cellules HEK-ObRb-GFP et CHO-ObRb-GFP, a été mesurée par la technique de « I^{125} binding / acid wash ». Environ 50% de la leptine radio-marquée initialement fixée à la surface cellulaire est internalisée en 30 minutes dans les cellules HEK-ObRb-GFP et en 15 minutes dans les cellules CHO-ObRb-GFP (figure 63). La quantité de leptine radio-marquée internalisée atteint un plateau à partir de 45 minutes

dans les cellules HEK-ObRb-GFP et de 30 minutes dans les cellules CHO-ObRb-GFP (figure 63).

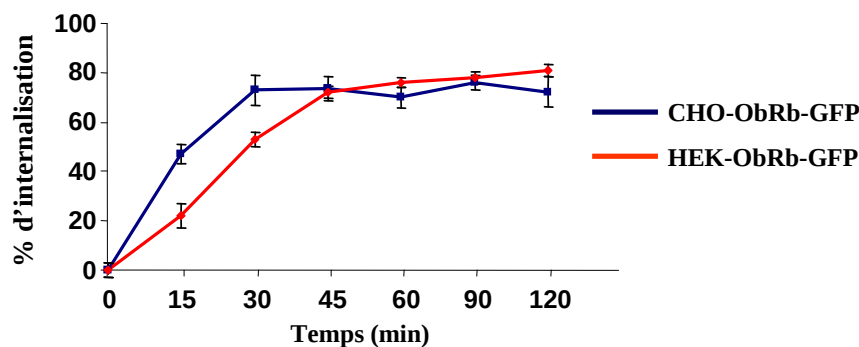


Fig 63: Cinétique d'internalisation de la leptine.

Brièvement, la leptine radio-marquée est fixée à son récepteur (à 4°C), dans les cellules HEK-ObRb-GFP et CHO-ObRb-GFP. Les cellules sont ensuite remises en culture à 37°C, la quantité de leptine radio-marquée localisée à la surface cellulaire est mesurée pour chaque temps de la cinétique par la technique « acid wash », et comparée à la quantité de leptine radio-marquée fixée initialement.

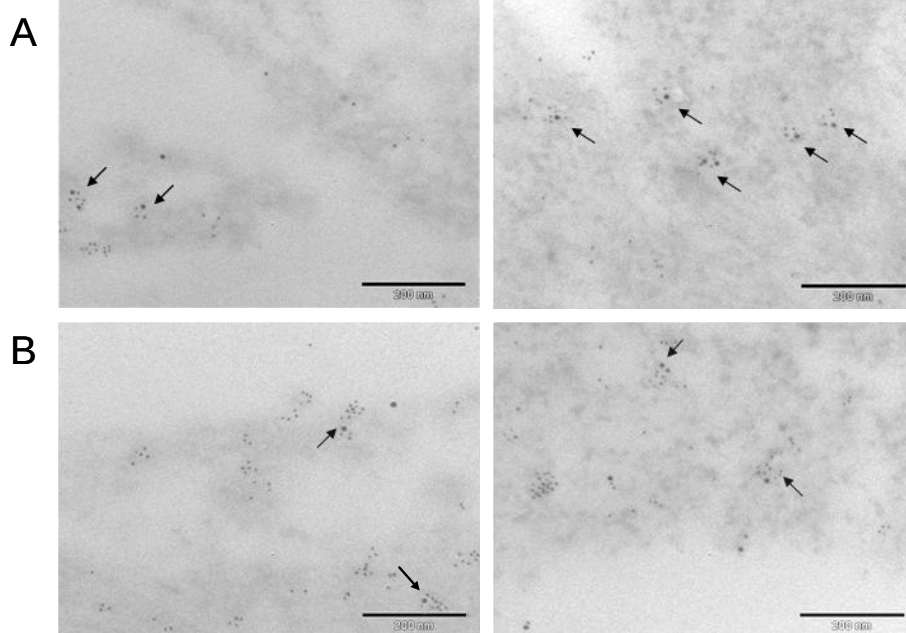


Fig 64: Endocytose de ObRb via la voie dépendante de la clathrine et la voie des cavéoles.

A. Co-localisation ultrastructurale entre ObRb-GFP (particules d'or 10 nm) visualisé par un anticorps anti-GFP et la clathrine (particules d'or 5 nm), dans les cellules HEK-ObRb-GFP stimulées par la leptine (50 nM, 15 min, panneau de droite) ou non (panneau de gauche). **B.** Co-localisation ultrastructurale entre ObRb-GFP (particules d'or 10 nm) visualisé par un anticorps anti-GFP et la cavéoline-1 (particules d'or 5 nm), dans les cellules HEK-ObRb-GFP stimulées par la leptine (50 nM, 15 min, panneau de droite) ou non (panneau de gauche). Les flèches indiquent la co-localisation.

I.3.b. ObRb et les systèmes d'endocytose clathrine / cavéoles.

Dans les cellules HEK-ObRb-GFP déprivées en sérum (12 h), ObRb-GFP co-localise avec les protéines clathrine (figure 64.A) et cavéoline-1 (figure 64.B), suggérant l'implication de ces deux voies d'endocytose dans l'internalisation de la leptine.

I.3.c. ObRb et recyclage.

Nous avons observé par la technique de double marquage fluorescent en microscopie confocale réalisée dans les cellules HEK-ObRb-GFP déprivées en sérum (12h) et non stimulées par la leptine, une co-localisation entre ObRb-GFP et la protéine EEA1, un marqueur des « sorting endosomes » (figure 65.A). ObRb-GFP co-localise également avec la protéine Rab4 (figure 65.B), caractéristique des vésicules de recyclage issues directement des « sorting endosomes ».

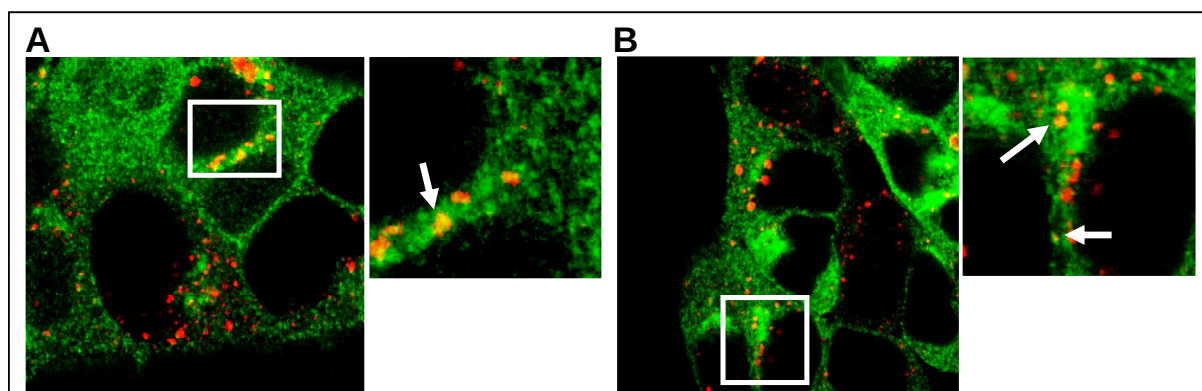
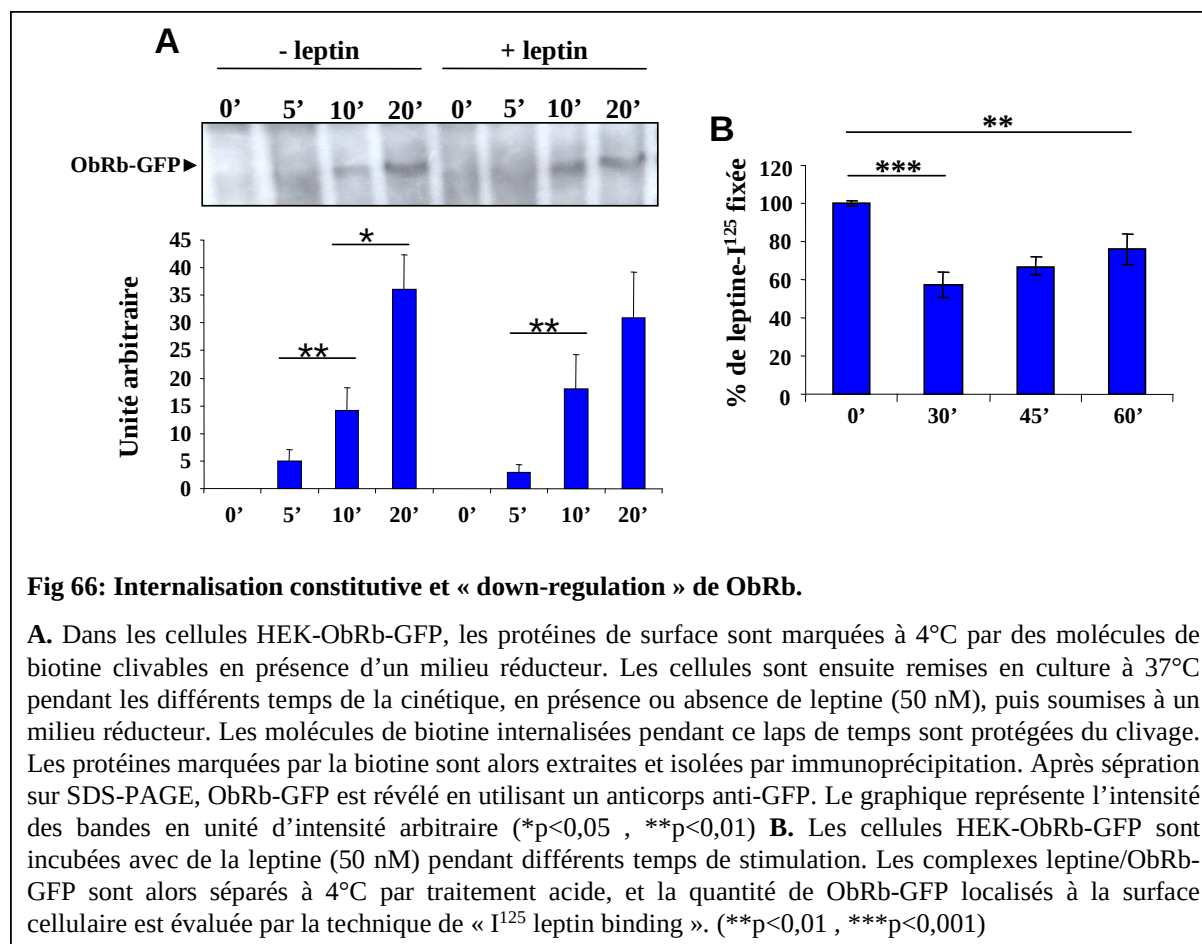


Fig 65: ObRb et recyclage.

Les cellules HEK-ObRb-GFP sont déprivées en sérum (12 h). **A.** Co-localisation entre ObRb-GFP révélé par une immunofluorescence anti-GFP (Alexa 488) et EEA1 (Alexa 540). **B.** Co-localisation entre ObRb-GFP révélé par une immunofluorescence anti-GFP (Alexa 488) et Rab4 (Alexa 540).

I.3.d. Internalisation constitutive de ObRb.

En réalisant, dans les cellules HEK-ObRb-GFP déprivées en sérum (12 h), un marquage des protéines localisées à la surface cellulaire par de la biotine clivable en présence d'un milieu réducteur, suivie par une analyse en Western-blot, nous avons mis en évidence une internalisation constitutive de ObRb-GFP (figure 66.A). La même procédure expérimentale montre que la stimulation par la leptine ne semble pas influencer la quantité d'ObRb-GFP internalisé (figure 66.A). Cependant, la stimulation par la leptine (50 nM) induit une diminution du nombre de récepteurs ObRb-GFP localisés au niveau de la membrane plasmique (« down regulation ») (figure 66.B).



I.4. Discussion – Perspectives.

L'internalisation des récepteurs est fortement impliqué dans la régulation des réponses cellulaires à une hormone. L'étude de ce processus dans le cadre du récepteur de la leptine est donc primordiale dans la compréhension de l'action biologique de cette hormone adipocytaire. Nos résultats montrent que les caractéristiques d'endocytose du récepteur de la leptine ObRb sont différentes de celles de la majorité des récepteurs de cytokines de classe I, et font de ObRb un cas particulier et complexe en terme d'internalisation.

I.4.a. Cinétique d'internalisation de la leptine et les systèmes d'endocytose clathrine / cavéoles.

Dans nos modèles cellulaires développés pour ce projet de recherche (CHO-ObRb-GFP et HEK-ObRb-GFP), la cinétique d'internalisation de la leptine radio-marquée diffère selon le type cellulaire certes, mais est en accord avec les précédentes études publiées. Ces résultats sont également similaires à ceux obtenus pour d'autres cytokines comme la GH, l'IL-6 et la PRL (Dittrich E *et al.* 1994; Genty N *et al.* 1994; Allevato G *et al.* 1995).

En utilisant un milieu de culture hypertonique, l'équipe de Flier a mis en évidence une internalisation dépendante de la clathrine pour les isoformes du récepteur ObRa et ObRb de la leptine (Uotani S *et al.* 1999). Nous avons confirmé ce résultat dans le cas de ObRb, en mettant en évidence par microscopie électronique une co-localisation entre ce récepteur et la protéine clathrine. Nous avons également observé une colocalisation entre ObRb et la protéine cavéoline-1, suggérant une implication de la voie des cavéoles dans l'internalisation de ce récepteur. Des études réalisées par notre laboratoire ont montré que la voie des cavéoles joue un rôle important dans l'internalisation de cytokines comme la GH, et donc dans la médiation de leurs actions biologiques (Lobie PE *et al.* 1999; Perret-Vivancos C *et al.* 2006). Une investigation plus approfondie du rôle du système cavéolaire dans l'action biologique de la leptine pourrait donc s'avérer intéressante. La surexpression de cavéoline-1 dans notre modèle cellulaire HEK-ObRb (HEK-ObRb-Cav) permettrait de vérifier l'impact de la voie des cavéoles dans l'internalisation de la leptine et de son récepteur, en étudiant notamment la cinétique d'internalisation de leptine radio-marquée. En utilisant ce modèle HEK-ObRb-Cav, des études en microscopie confocale pourraient permettre de mettre en évidence une accumulation de leptine dans certains compartiments intracellulaires (le ligand endocyté par la voie des cavéoles n'étant pas dégradé). L'isolement des différents compartiments intracellulaires suivi, de l'extraction protéique de leur contenu et leur analyse en Western-blot (comparaison HEK-ObRb et HEK-ObRb-Cav) pourraient également permettre de mettre en évidence une accumulation intracellulaire de leptine biologiquement active.

I.4.b. ObRb et recyclage.

Le processus de recyclage vers la membrane plasmique des récepteurs ObRb internalisés est pour l'instant mal défini, malgré plusieurs études visant à améliorer ce domaine (Barr VA *et al.* 1999; Belouzard S *et al.* 2004). Dans notre étude, nous avons mis en évidence une co-localisation entre ObRb-GFP et la protéine Rab4 caractéristique des vésicules de recyclage issues des « sorting endosomes » (voie de recyclage rapide). Cependant ces expériences de co-localisation par microscopie confocale sont limitées dans le cas de petites vésicules cytoplasmiques et d'une fluorescence du récepteur répartie sur l'ensemble du cytoplasme. De plus, certaines équipes de recherche considèrent que Rab4 est également caractéristique des « early endosomes » et que cette protéine ne serait pas un bon marqueur du recyclage (Gaborik Z et Hunyady L 2004).

Nous avons utilisé la monensine, un inhibiteur chimique du recyclage, afin d'étudier plus précisément la réalité de ce processus cellulaire dans le cadre de ObRb-GFP. Cependant,

l'incubation des cellules HEK-ObRb-GFP avec la monensine, en présence ou absence de leptine, n'induit aucun effet discernable sur la localisation intracellulaire de ObRb-GFP. Les tentatives pour conjuguer la monensine et les expériences de « I¹²⁵-leptin binding » se sont révélées infructueuses, les cellules traitées avec la monensine ne supportant pas ce protocole expérimental. Bien que le manque d'effet de la monensine sur la distribution cellulaire de ObRb-GFP indique que le recyclage ne participe pas au processus général d'internalisation de ObRb-GFP, il n'est pas possible aux vues des connaissances actuelles, d'écarter cette possibilité définitivement. L'idéal serait d'utiliser des transfections de mutants des protéines Rab impliquées dans le recyclage, couplée à des expériences de « I¹²⁵-leptin binding ».

I.4.c. Accumulation de ObRb au niveau du Golgi/TGN induite par la leptine.

Nos résultats obtenus par microscopie confocale montrent qu'en absence de ligand et de sérum, ObRb-GFP est localisé dans l'ensemble du cytoplasme, sans localisation préférentielle au niveau de la membrane plasmique ce qui contraste avec la localisation d'autres récepteurs endocrines membranaires (Frenzel R *et al.* 2006). En absence de leptine, dans certaines cellules, ObRb-GFP est principalement localisé au niveau d'une zone péri-nucléaire correspondant au Golgi/TGN. Une telle localisation de ObRb a déjà été reportée *in vitro* dans d'autres modèles cellulaires et *in vivo* dans des neurones hypothalamiques (Diano S *et al.* 1998; Barr VA *et al.* 1999; Baskin DG *et al.* 1999; Belouzard S *et al.* 2004).

Suite à une stimulation par la leptine, le pourcentage de cellules présentant cette localisation particulière augmente, ainsi que la surface intracellulaire occupée par la fluorescence associée au Golgi/TGN. Dans notre modèle cellulaire, le taux de synthèse de ObRb-GFP est constant car la construction cDNA codant pour ObRb-GFP n'inclut pas les régions promotrices du gène ObRb. Dans ces conditions, deux mécanismes peuvent conduire à une accumulation de ObRb-GFP au niveau du Golgi/TGN en réponse à la leptine : i) le transport de ObRb-GFP du Golgi/TGN vers la membrane plasmique est inhibé par la leptine; ii) la stimulation par la leptine induit une augmentation de l'internalisation de ObRb-GFP qui est alors recyclé vers le Golgi/TGN où il s'accumule.

Suite à une inhibition de la synthèse protéique par l'utilisation de cycloheximide, la localisation péri-nucléaire de ObRb-GFP disparaît, aussi bien en présence qu'en absence de leptine. Ceci suggère que ce sont les récepteurs ObRb-GFP néosynthétisés qui sont les principaux contributeurs de l'accumulation de ObRb-GFP au niveau du Golgi/TGN, et non

les récepteurs ObRb-GFP internalisés depuis la membrane plasmique. Ce résultat est en adéquation avec de précédentes publications (Barr VA *et al.* 1999; Belouzard S *et al.* 2004). En outre, la leptine ne semble pas influencer la cinétique d'internalisation de ObRb (voir Chapitre I.4.d.).

De plus, l'inhibition de l'internalisation de ObRb-GFP par l'utilisation de sucrose ne bloque pas son accumulation au niveau du Golgi/TGN induite par la leptine. Cependant, l'effet stimulateur ou inhibiteur du traitement par le sucrose sur cette accumulation peut difficilement être défini dans nos conditions expérimentales, le sucrose induisant des variations de la surface cellulaire. Néanmoins, après 60 minutes de stimulation par la leptine, le pourcentage de cellules présentant une accumulation de ObRb-GFP au niveau du Golgi/TGN est comparable entre les cellules ayant subi le traitement par le sucrose (55%) ou non (61%).

En conclusion, nos résultats montrent que la leptine induit une accumulation des ObRb-GFP néosynthétisés au niveau du Golgi/TGN, et participe ainsi à la régulation de leur adressage vers la membrane plasmique. L'internalisation de la leptine et de son récepteur n'influence pas le trafic de ObRb-GFP vers la surface cellulaire. La capacité d'une hormone à réguler l'export de protéines vers la surface cellulaire a déjà été décrite. L'insuline par exemple stimule l'export du transporteur de glucose GLUT-4 vers la membrane plasmique, par un mécanisme dépendant des voies de transduction du signal activées par l'insuline (Satoh S *et al.* 1993). Dans les cellules HeLa transfectées, seuls 50% des ObRb synthétisés atteignent la membrane plasmique (en 30 min-1 h), les autres étant dégradés (Belouzard S *et al.* 2004). Par la technique de « pulse-chase » consistant à marquer radioactivement, sur un temps court, les protéines néosynthétisées, nous pourrions confirmer ce résultat dans notre modèle cellulaire. Cette technique nous permettrait également d'examiner plus précisément l'effet de la leptine sur la cinétique d'adressage vers la membrane plasmique de ObRb-GFP. Pour ce faire, des extractions sub-cellulaires de la membrane plasmique après différents temps de « chase », dans des conditions de stimulation ou non par la leptine, suivies d'une immuno-précipitation afin d'isoler les ObRb-GFP localisés à la membrane plasmique, puis d'un SDS-PAGE et d'une révélation de ObRb-GFP par autoradiographie seront nécessaires. Une autre possibilité, peut-être plus simple, consisterait en l'utilisation dans le milieu de culture d'anticorps anti-ObR spécifiques du domaine extracellulaire du récepteur peut être envisagée afin d'isoler les récepteurs ObRb-GFP localisés au niveau de la membrane plasmique, ceci à la place des extraits sub-cellulaires de membrane plasmique. Cependant des contrôles seront

nécessaires pour vérifier que cet anticorps n'est pas endocyté dans la cellule et ne se lie pas alors avec des récepteurs intracellulaires, et un travail de mise au point de l'extraction protéique qui ne devra pas séparer le complexe anticorps/récepteur sera à effectuer.

I.4.d. ObRb et internalisation constitutive.

Nos résultats et ceux publiés par l'équipe de Rouillé (Belouzard S *et al.* 2004) montrent que ObRb peut être internalisé constitutivement, c'est-à-dire indépendamment d'une stimulation par son ligand, et que la leptine ne semble pas influencer sa cinétique d'internalisation. Ce résultat fait de ObRb un récepteur de cytokines de classe I particulier. En plus de l'expérience de biotinylation utilisée dans cette étude, d'autres arguments sont en faveur d'une internalisation constitutive de ObRb. La visualisation du récepteur de la leptine *in vitro* dans des cellules transfectées déprivées en sérum (HEK-ObRb-GFP, HeLa-ObRb-HA) montre une localisation de ObRb sur l'ensemble du cytoplasme en absence de leptine. De plus, dans ces conditions de culture, seuls 15 à 25 % des sites de fixation de la leptine sont localisés à la surface cellulaire (Barr VA *et al.* 1999; Lundin A *et al.* 2000). Dans le cas d'une internalisation non-constitutive, la grande majorité des récepteurs devrait être localisée au niveau de la membrane plasmique en absence de leptine. Egalement, dans le cas d'une internalisation non-constitutive, les récepteurs doivent, sauf exception, être activés par leurs ligands pour être endocytés (Paccaud JP *et al.* 1992). Dans le cas de ObRb, son internalisation semble indépendante de JAK2 et donc de son activation par la leptine (Uotani S *et al.* 1999).

L'équipe de Rouillé défend le fait que l'internalisation de ObRb est constitutive **et** totalement indépendante de la leptine (Belouzard S *et al.* 2004). Cependant, si la technique de biotinylation est efficace pour mettre en évidence une internalisation constitutive, elle n'est pas suffisamment sensible pour exclure totalement un effet de la leptine sur l'internalisation de son récepteur. De plus, il existe des arguments en faveur d'un impact de la leptine sur ce processus cellulaire. La stimulation par la leptine induit une « down-regulation » de ObRb, c'est-à-dire une diminution du nombre de récepteurs localisés au niveau de la membrane plasmique, ceci dans notre modèle cellulaire et dans les cellules COS-7 et CHO transfectées (Barr VA *et al.* 1999; Uotani S *et al.* 1999). La « down-regulation » du récepteur de la leptine en réponse à la leptine est plus importante dans le cas de l'isoforme ObRb, en comparaison à ObRa, suggérant l'importance des voies de signalisation et donc de la leptine sur la régulation du nombre de récepteurs de la leptine localisés à la surface cellulaire (Barr VA *et al.* 1999; Uotani S *et al.* 1999).

Néanmoins, il est possible d'expliquer la « down-regulation » de ObRb en réponse à la leptine tout en conservant le caractère constitutif et totalement ligand-indépendant de l'internalisation de ObRb-GFP. Ainsi, dans notre modèle expérimental, la synthèse de ObRb est constante dans le temps et indépendante de la leptine. Dans ce contexte, cette cytokine peut réguler le nombre de récepteurs présents à la membrane plasmique en agissant à trois niveaux : i) sur la cinétique d'internalisation de ObRb, ii) sur la cinétique d'adressage à la membrane des ObRb néosynthétisés, iii) sur le recyclage de ObRb.

Aucun argument en faveur d'un recyclage de ObRb n'a été apporté jusqu'à présent et donc un effet inhibiteur de la leptine sur ce processus cellulaire n'est pas envisageable en l'état actuel des connaissances. Ainsi, dans notre procédure expérimentale montrant la « down-regulation » de ObRb-GFP, nous observons l'équilibre entre l'internalisation des ObRb-GFP et l'adressage vers la membrane plasmique des ObRb-GFP néosynthétisés. La diminution du nombre de ObRb localisés à la surface cellulaire suite à une stimulation par la leptine pourrait être la conséquence de l'effet inhibiteur de la leptine sur l'adressage des ObRb-GFP néosynthétisés vers la membrane plasmique, effet mis en évidence dans cette étude. De plus, dans les cellules HeLa, la demi-vie de ObRb est courte (+/- 2 h) (Belouzard S *et al.* 2004) suggérant que le temps de résidence du récepteur au niveau de la membrane plasmique est également court. Ceci montre l'importance de l'apport des récepteurs néosynthétisés dans le pool des ObRb localisés à la surface cellulaire.

D'autres hypothèses peuvent également être avancées pour expliquer le phénomène de « down-regulation », tout en conservant l'aspect totalement ligand-indépendant de l'internalisation de ObRb, comme par exemple le clivage du domaine extracellulaire de ObRb en réponse à la leptine. *In vivo*, chez l'homme, c'est par ce mécanisme que l'isoforme ObRe est créée (Ge H *et al.* 2002). Néanmoins, aucune isoforme libre du récepteur de la leptine n'a pu être détectée suite à une stimulation par la leptine dans le modèle HeLa-ObRb-HA (Belouzard S *et al.* 2004). Egalement, un changement dans l'affinité de liaison entre les récepteurs ObRb-GFP résiduels (pas encore endocytés) et le ligand suite à une stimulation peut être envisagé, mais semble néanmoins peu probable sur un temps de stimulation par la leptine relativement court.

Dans les cellules HeLa transfectées, seuls 50% des récepteurs ObRb néosynthétisés sont adressés à la membrane plasmique (25% dans les cellules COS-7 transfectées), les 50% restants étant dégradés (Barr VA *et al.* 1999; Belouzard S *et al.* 2004). Il est envisageable que la leptine induise une modification de ce ratio en augmentant la proportion de ObRb dégradés sans atteindre la membrane plasmique. Cette action de la leptine participerait au phénomène

de « down-regulation ». Si tel était le cas, d'un point de vue expérimental, l'utilisation d'inhibiteurs de la dégradation lysosomale comme la chloroquine pourrait permettre la mise en évidence, par immunofluorescence, d'une accumulation accrue au niveau du Golgi/TGN dans les cellules HEK-ObRb-GFP stimulées par la leptine, en comparaison aux cellules HEK-ObRb-GFP traitées par la chloroquine mais non stimulées par la leptine et aux cellules HEK-ObRb-GFP non traitées par la chloroquine mais stimulées par la leptine. Cependant cette procédure expérimentale est fastidieuse et la technique de quantification de l'accumulation de fluorescence au niveau du Golgi/TGN pourrait s'avérer ne pas être assez sensible.

En conclusion, malgré les résultats montrant clairement une internalisation constitutive de ObRb-GFP dans notre modèle cellulaire, un effet de la leptine sur l'internalisation de ce récepteur ne peut être totalement écarté à l'heure actuelle, laissant ouverte l'hypothèse de la co-existence d'une internalisation constitutive et non-constitutive de ObRb.

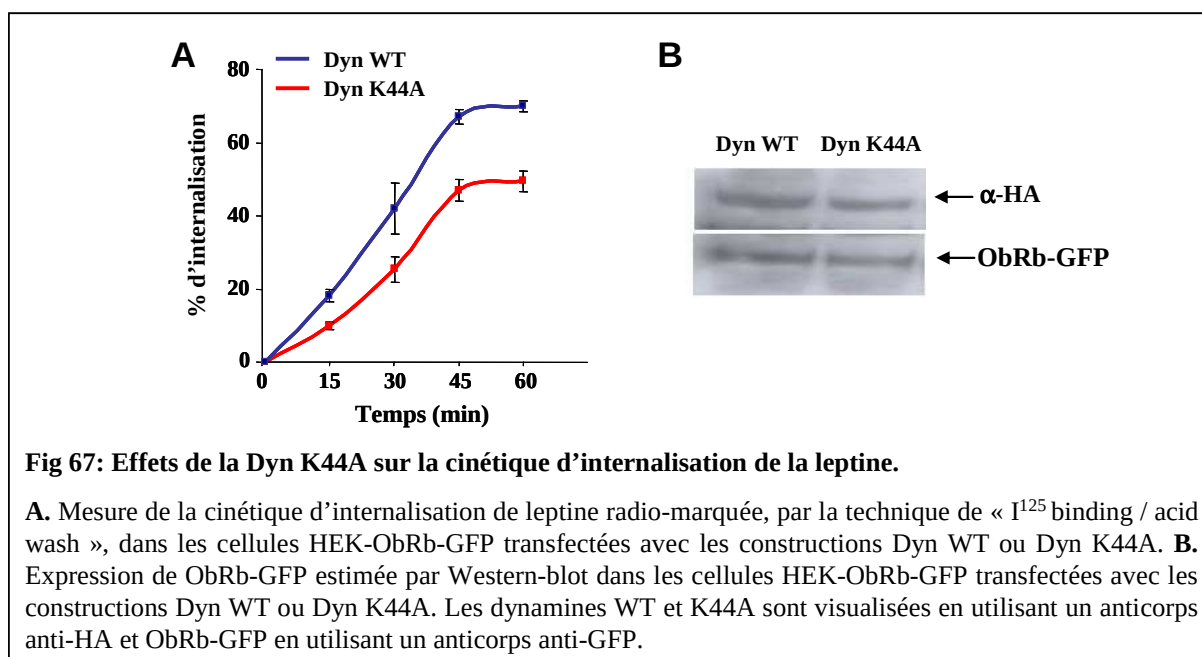
II. Internalisation de ObRb et activation des voies de signalisation.

II.1. Stratégie d'étude.

Quelques études réalisées au cours de ces deux dernières décennies ont montré l'existence d'une relation entre voies de signalisation induite par un ligand et l'internalisation de son récepteur. Nous avons remarqué que dans notre modèle cellulaire HEK-ObRb, le traitement par un milieu hypertonique (sucrose 0,5 M, 1 h), inhibant l'endocytose, induit une nette réduction de l'activation de STAT3 en réponse à la leptine. Nous avons donc examiné plus en détails l'impact de l'internalisation de ObRb sur l'activation des trois grandes voies de signalisation de la leptine (les voies STAT, IRS/PI3K et MAPK) en utilisant comme modèles cellulaires les lignées HEK-ObRb, HEK-ObRb-GFP et CHO-ObRb. Dans tous ces modèles, nous avons également transfecté de façon transitoire un vecteur d'expression eucaryote contenant la séquence codante de la protéine JAK2, afin d'augmenter l'activation de ObRb et donc des voies de transduction du signal sous-jacentes.

Afin d'inhiber le processus d'internalisation, nous avons transfecté une construction d'ADNc codant pour un mutant de la dynamine-1 couplé à une étiquette moléculaire HA (DynK44A). Les contrôles sont réalisés en transfectant les cellules dans les mêmes conditions avec une construction d'ADNc codant pour la dynamine-1 sauvage couplée à HA (Dyn WT). Dans nos conditions expérimentales, la transfection de la construction DynK44A dans les cellules HEK-ObRb-GFP inhibe le taux d'internalisation de la leptine radio-marquée

d'environ 30-40%, par comparaison aux cellules transfectées avec la construction Dyn WT (figure 67.A), sans altérer significativement l'expression de ObRb-GFP (figure 67.B).



II.2. Impact de l'inhibition de l'endocytose sur les voies de signalisation.

L'activation des protéines clés des voies de signalisation est étudiée en isolant la protéine d'intérêt par immuno-précipitation et en analysant son état de phosphorylation par Western-blot. L'intensité des bandes de protéines révélées par Western-blot a été quantifiée en scannant les films afin de mesurer de façon semi-quantitative l'activation des protéines en réponse à la leptine.

Dans les cellules HEK-ObRb-GFP, la transfection de DynK44A n'affecte pas l'activation de JAK2 (figure 68.B) et de ObRb-GFP (figure 68.A) en réponse à la leptine (50 nM). Cependant, l'activation de STAT3 en réponse à la leptine (50 nM) est significativement inhibée ($p < 0,01$) dans les cellules HEK-ObRb-GFP transfectées avec DynK44A (figure 68.C). Ce résultat a été confirmé en utilisant un kit commercial, STAT3 Transfactor (Clontech) (figure 68.D), dont la sensibilité est supérieure à la technique d'immuno-précipitation / Western-blot.

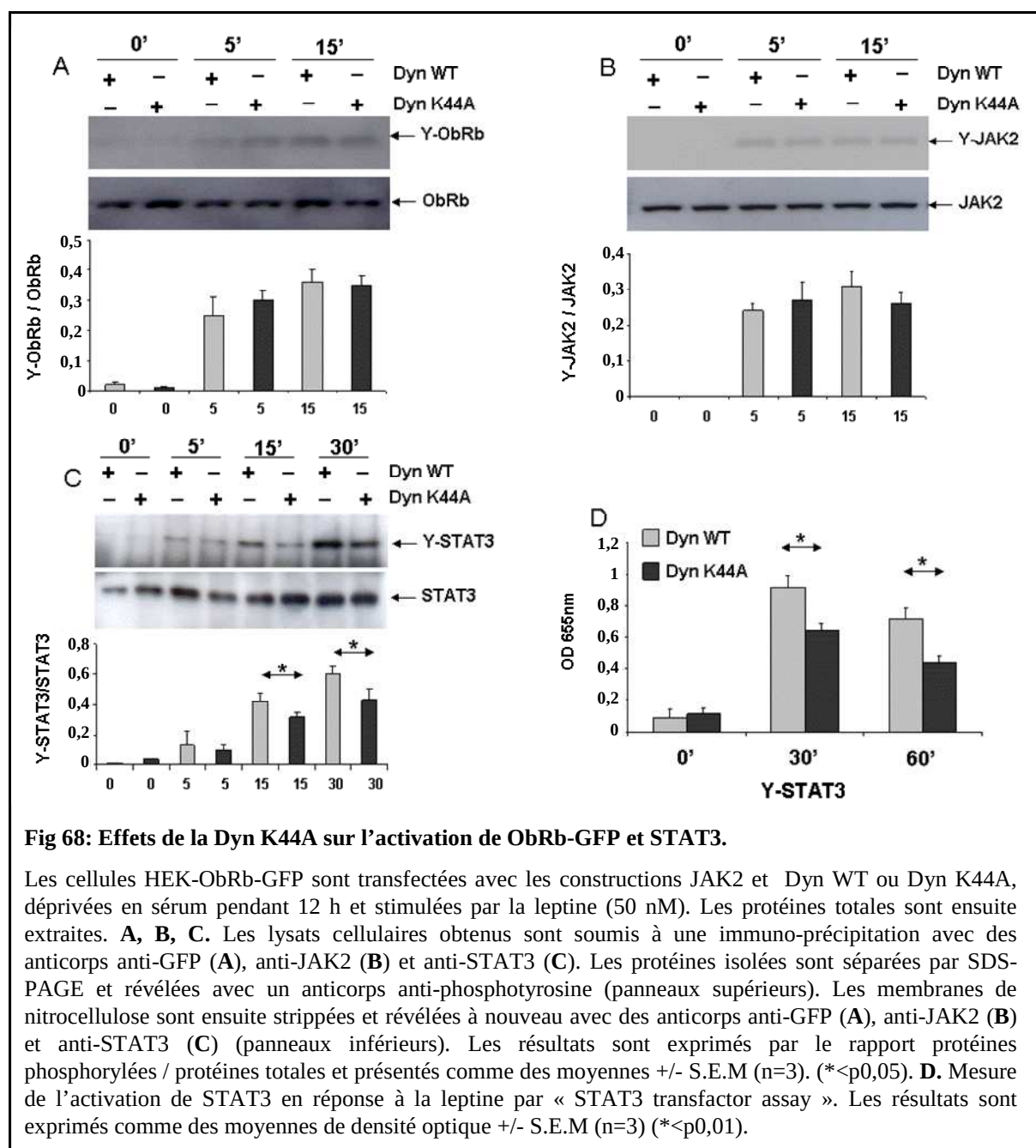
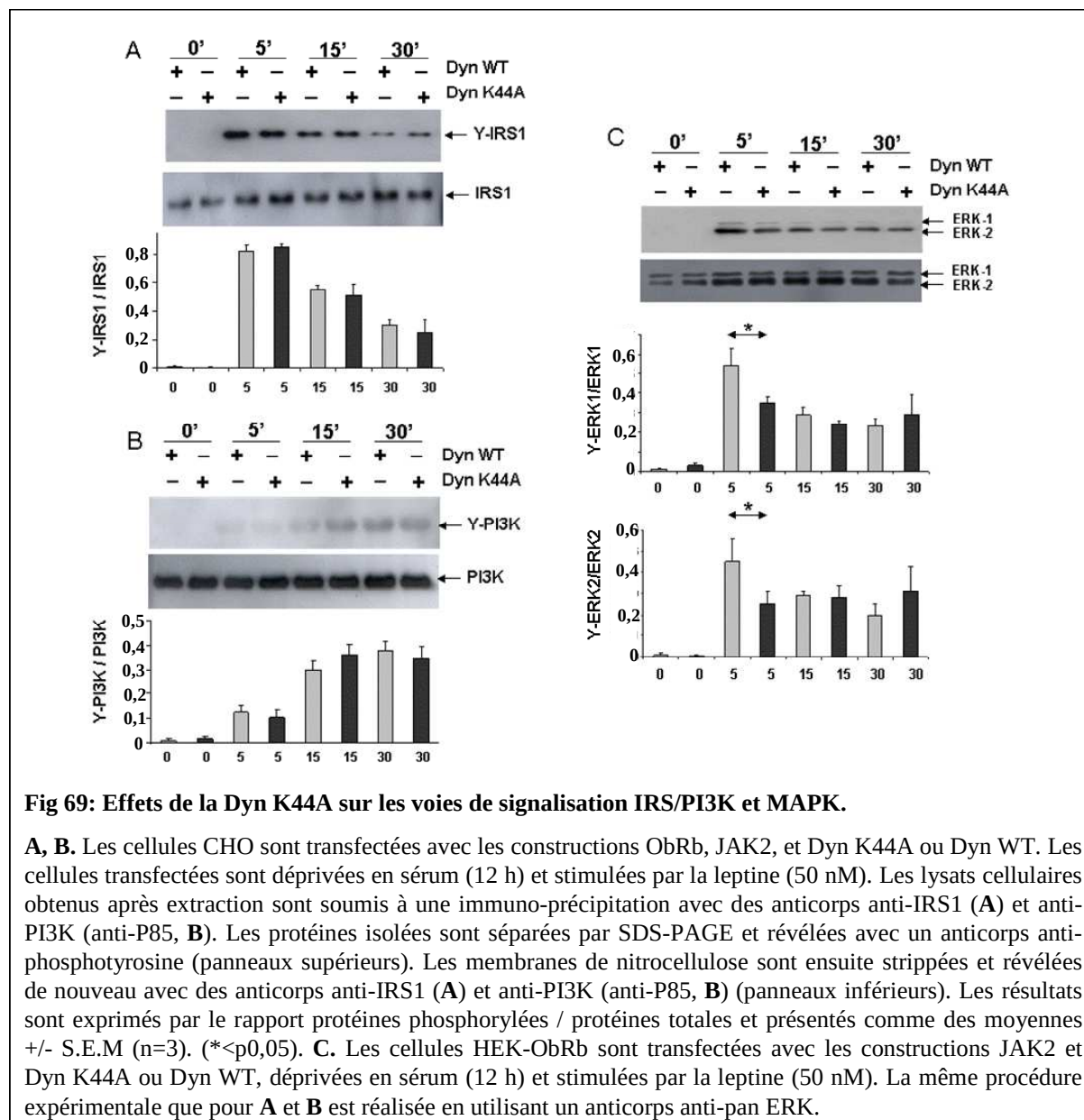


Fig 68: Effets de la Dyn K44A sur l'activation de ObRb-GFP et STAT3.

Les cellules HEK-ObRb-GFP sont transfectées avec les constructions JAK2 et Dyn WT ou Dyn K44A, déprivées en sérum pendant 12 h et stimulées par la leptine (50 nM). Les protéines totales sont ensuite extraites. **A, B, C.** Les lysats cellulaires obtenus sont soumis à une immuno-précipitation avec des anticorps anti-GFP (**A**), anti-JAK2 (**B**) et anti-STAT3 (**C**). Les protéines isolées sont séparées par SDS-PAGE et révélées avec un anticorps anti-phosphotyrosine (panneaux supérieurs). Les membranes de nitrocellulose sont ensuite strippées et révélées à nouveau avec des anticorps anti-GFP (**A**), anti-JAK2 (**B**) et anti-STAT3 (**C**) (panneaux inférieurs). Les résultats sont exprimés par le rapport protéines phosphorylées / protéines totales et présentés comme des moyennes $\pm$ S.E.M (n=3). (* $<p0,05$). **D.** Mesure de l'activation de STAT3 en réponse à la leptine par « STAT3 transfactor assay ». Les résultats sont exprimés comme des moyennes de densité optique $\pm$ S.E.M (n=3) (* $<p0,01$).

Aucune différence dans l'activation des protéines IRS1 (figure 69.A) et de la sous-unité catalytique p85 de PI3K (figure 69.B) en réponse à la leptine (50 nM) n'a été observée dans les cellules CHO-ObRb transfectées avec la construction DynK44A. Dans les cellules HEK-ObRb, l'activation de ERK1/2 en réponse à la leptine (50 nM) est significativement inhibée pour un temps de stimulation court (5 minutes), mais n'est pas modifiée pour des temps de stimulation plus longs (15-30 minutes) (figure 69.C).



II.3. Discussion – Perspectives.

Il existe un lien étroit entre le processus d'endocytose d'un récepteur et l'activation des voies de signalisation sous-jacentes. En effet, une relation entre certains composants moléculaires des vésicules d'endocytose et certains acteurs clés des voies de signalisation a été observée dans de nombreuses études. Ainsi, la régulation du processus d'internalisation d'un récepteur peut conduire à l'activation spécifique de certaines voies de transduction du signal. La majorité des études menées dans ce domaine a été réalisée sur les récepteurs RTK et RCPG. Malheureusement, peu d'études jusqu'à présent se sont focalisées sur la famille des récepteurs de cytokines, et nous apportons ici des données importantes dans ce cas particulier ainsi que dans le cadre de l'action biologique de la leptine.

Nos résultats préliminaires ont montrés que l'inhibition de l'internalisation en utilisant un milieu hypertonique (sucrose ; 0,5 M) induit une baisse de l'activation de STAT3 en réponse à la leptine. Cependant, l'utilisation du sucrose ou d'autres produits chimiques comme la méthyl- β -cyclodextrine est certes efficace pour inhiber le processus d'endocytose, mais peut également s'avérer toxique pour la cellule et ainsi engendrer des artéfacts dans les voies de signalisation étudiées. Afin d'être dans les meilleures conditions expérimentales, nous avons utilisé la co-transfection d'une construction ADNc codant pour un mutant de la protéine dynamine-1, DynK44A. La dynamine est impliquée dans les phénomènes de fission membranaire. Ainsi, l'expression de DynK44A permet de diminuer l'internalisation des récepteurs vers les « sorting endosomes » en inhibant partiellement la séparation des vésicules d'endocytose de la membrane plasmique, sans influencer de façon significative l'interaction entre le ligand et son récepteur (Damke H *et al.* 1994). La transfection de DynK44A induit une réduction significative de l'internalisation de GLUT4 seulement 4h après transfection (Al-Hasani H *et al.* 1998).

Cependant, l'endocytose étant un processus indispensable pour la survie cellulaire, il nous a fallu trouver des conditions de transfection en adéquation avec notre stratégie d'inhibition de l'internalisation de ObRb et l'état biologique des cellules. Les premières études ayant utilisé la transfection de DynK44A ont montré que l'expression de cette protéine pendant 48 heures n'induisait pas de modification significative des processus de prolifération cellulaire ou d'apoptose (nos études sont de la même façon réalisées 48 heures après transfection) (Damke H *et al.* 1994). Nous avons également vérifié dans nos conditions expérimentales que l'expression de DynK44A n'induisait pas de modification de la prolifération cellulaire, de la morphologie des cellules, et surtout de l'expression de ObRb-GFP, un contrôle indispensable à réaliser. L'utilisation de la construction DynK44A permet d'inhiber l'endocytose de 80% dans le cas de transfection stable et jusqu'à 40% dans le cas de transfection transitoire (Vieira AV *et al.* 1996). Ces données sont en adéquation avec les résultats obtenus dans notre modèle d'étude HEK-ObRb-GFP.

II.3.a. Activation des protéines JAK2 et ObRb-GFP.

Dans notre modèle cellulaire, l'activation de JAK2 et de ObRb-GFP en réponse à la leptine n'est pas affectée par l'inhibition de l'endocytose. Ceci montre que l'activation de ces protéines, initiatrices des voies de signalisation, se produit au niveau de la membrane plasmique et ne nécessite que l'interaction de la leptine avec son récepteur, et non l'internalisation de celui-ci. De plus, ce résultat est en accord avec ceux montrant que JAK2

est localisé principalement au niveau de la membrane plasmique, et constitutivement associé aux récepteurs localisés à la surface cellulaire (Behrmann I *et al.* 2004).

II.3.b. Activation de la protéine STAT3.

L'inhibition de l'internalisation de ObRb induit une diminution de l'activation de STAT3 en réponse à la leptine sans pour autant affecter sa réponse temporelle (l'activation de STAT3 est toujours maximale à 30 minutes). Ainsi, l'activation de STAT3 dans les cellules HEK-ObRb-GFP se produit en partie au niveau des « sorting endosomes », ce qui reflète le concept de « signaling endosomes » développé par l'équipe de Leof (Leof EB 2000). Ce résultat est en adéquation avec les données publiées par l'équipe de Sehgal montrant, dans le modèle cellulaire Hep3B (cellules hépatocytaires humaines), la présence de protéines STAT3 actives au niveau des « sorting endosomes », et une réduction de l'activation de STAT3 en réponse à l'IL6 suite à l'inhibition du processus d'endocytose (Shah M *et al.* 2006).

Ce résultat suggère également par voie de conséquence la présence de récepteurs ObRb encore activés au niveau des « sorting endosomes ». Afin de vérifier ce point plusieurs stratégies peuvent être envisagées : i) L'utilisation de la microscopie électronique et d'un anticorps anti-ObRb-phosphorylé pour réaliser des expériences d'immuno-marquage et de co-localisation avec les marqueurs protéiques Rab adéquats. Même s'il existe un anticorps commercial anti-ObRb-phosphorylé, celui-ci n'a jamais été utilisé dans des travaux de recherche publiés. ii) Il est également possible de procéder à une isolation des « sorting endosomes », suivie d'une extraction protéique et d'une analyse par immuno-précipitation / Western-blot de l'état de phosphorylation du récepteur ObRb.

II.3.c. Activation des protéines IRS/PI3K.

Pour l'étude de la voie IRS/PI3K, nous avons utilisé la lignée CHO-ObRb, les cellules HEK-ObRb-GFP ne donnant pas de résultat satisfaisant. Généralement, l'étude de l'activation des protéines IRS dans les cellules CHO est réalisée dans un modèle expérimental de cellules CHO transfectées avec le récepteur de l'insuline (CHO-IR). Il est également possible de surexprimer les protéines IRS1 et IRS2 afin de faciliter leurs détections (Bjorbaek C *et al.* 1997). Cependant la protéine IRS1 est exprimée de façon endogène dans les cellules CHO. Dans nos conditions expérimentales, ne disposant pas de la lignée CHO-IR et des plasmides IRS, nous avons procédé à une immuno-précipitation à partir d'une grande quantité de protéines totales (environ 2,5 - 3 mg) afin d'isoler une grande quantité de protéine IRS, et de pouvoir ainsi détecter ces protéines par la suite. Cette procédure expérimentale a bien

fonctionné pour IRS1 mais nous avons été malheureusement dans l'incapacité de détecter la protéine IRS2 qui joue un rôle plus important que IRS1 dans l'action biologique de la leptine (Withers DJ *et al.* 1998). La détection de PI3K a logiquement été soumise aux mêmes conditions expérimentales.

Nos résultats montrent que l'activation dans le temps de PI3K n'est pas superposable à celle de IRS1, avec une activation rapide et élevée de IRS1 suivie d'une diminution, et une activation progressive et décalée dans le temps de PI3K. Même s'il est possible d'envisager plusieurs mécanismes cellulaires expliquant ce phénomène, notamment une localisation intracellulaire de IRS1 activée par ObRb et de PI3K différente, aucune explication nette n'est possible à l'heure actuelle. De plus, à ma connaissance, aucune étude n'a examiné en parallèle l'activation de IRS1/2 et PI3K en réponse à la leptine.

Dans les cellules CHO-ObRb, l'inhibition de l'endocytose par la transfection de la construction DynK44A n'induit aucun changement significatif dans l'activation des protéines IRS1 et PI3K en réponse à la leptine. Cependant, la technique de mesure semi-quantitative utilisée pourrait ne pas être assez sensible pour détecter de fines différences d'activation de la voie IRS/PI3K, surtout dans la mesure où les protéines IRS1 et PI3K sont faiblement activées dans nos conditions expérimentales. De même, nous sommes dans une situation expérimentale de multiples co-transfections transitoires, en l'occurrence ObRb, JAK2 et DynK44A (ou Dyn WT). Même si trois co-transfections peuvent être réalisées sur une même population cellulaire et donner des résultats probants (Bjorbaek C *et al.* 1997), cette méthode induit inévitablement une dilution des effets de l'inhibition de l'internalisation sur l'activation des protéines d'intérêts.

Ainsi, un impact de l'internalisation de ObRb sur l'activation de la voie IRS/PI3K ne peut être totalement exclu. De plus, les protéines IRS et PI3K sont présentes au niveau des « sorting endosomes » (Kelly KL et Ruderman NB 1993). Et, même si la relation entre internalisation et voies de signalisation peut varier selon les conditions expérimentales et le modèle cellulaire, l'activation de la voie IRS/PI3K est par exemple affectée par la transfection de DynK44A dans le cas du récepteur au NGF (Zhang Y-z *et al.* 2000).

II.3.d. Activation des protéines ERK1/2.

Dans les cellules HEK-ObRb, l'inhibition de l'internalisation induit une réduction de l'activation des protéines ERK1/2 en réponse à la leptine pour le temps de stimulation 5 minutes, mais n'affecte pas l'activation totale de ces protéines pour des temps de stimulation plus longs. On ne peut pas réellement parler de retard d'activation de cette voie, car dans ce

cas la quantité de protéines ERK1/2 activées pour le temps de stimulation 15 minutes devrait logiquement être supérieure. Cependant, force est de constater qu'il existe un mécanisme cellulaire de compensation, permettant une activation normale de la voie MAPK par la leptine, pour des temps de stimulation « élevés ».

Un tel mécanisme compensatoire pourrait être expliqué en partie par les multiples possibilités d'activation de la voie MAPK conduisant *in fine* à la phosphorylation des protéines ERK. En effet, suite à une stimulation par la leptine, la voie MAPK peut être activée directement par ObR ou *via* la phosphorylation de la protéine JAK2 (Bjorbaek C *et al.* 1997; Li C et Friedman JM 1999; Bjorbaek C *et al.* 2001). Il existe également des interconnexions entre la voie MAPK et les autres voies de signalisation comme la voie IRS/PI3K (Chen NG *et al.* 1997; Ookuma M *et al.* 1998). Ainsi, il est possible d'envisager que suite à une stimulation par la leptine, l'activation de la voie MAPK est dans un premier temps fortement liée à l'activation de ObRb et à son internalisation vers les « sorting endosomes ». Par la suite, la signalisation MAPK à partir de ce compartiment intracellulaire deviendrait relativement moins importante, comparée à la signalisation indépendante de l'internalisation de ObRb, médiée potentiellement *via* des acteurs protéiques appartenant aux autres voies de signalisation, et activés lors des premiers instants de la stimulation par la leptine.

II.3.e. Signalisation et voie des cavéoles.

Comme nous l'avons vu, ObRb-GFP co-localise avec les cavéoles suggérant l'implication de cette voie d'endocytose dans l'internalisation du récepteur de la leptine. Les cavéoles sont, comme les vésicules de clathrine, le siège de véritables complexes de signalisation (Quest A *et al.* 2004). La transfection *in vitro* de DynK44A inhibant également cette voie d'endocytose (Oh P *et al.* 1998), nous ne pouvons exclure un impact de l'internalisation de ObRb-GFP *via* la voie des cavéoles sur l'activation des voies de transduction du signal en réponse à la leptine. De plus, *in vitro*, la transfection de cavéoline-1 dans des cellules surexprimant le GHR augmente l'activation de STAT3 en réponse à la GH (Lobie PE *et al.* 1999). Ce résultat démontre la forte relation entre l'activation de STAT par une cytokine et la voie d'internalisation des cavéoles. Ainsi dans notre modèle expérimental, la diminution de l'activation de STAT3 engendrée par la transfection de DynK44A dans notre modèle cellulaire pourrait résulter en partie de l'inhibition de l'internalisation de ObRb-GFP *via* la voie des cavéoles, même si encore une fois l'implication de cette voie d'endocytose dans l'internalisation de ObRb devra être étudiée plus en détail.

II.3.f. Conclusion.

Dans le cas du récepteur de la leptine, aucune étude ne s'était focalisée sur la relation entre l'internalisation de ObRb et l'établissement des voies de signalisation induite par la leptine. Nous avons apporté ici des éléments concrets montrant l'importance de cette relation dans l'action biologique de la leptine. Cependant, il s'agit uniquement d'une première étape et il est indéniable que de nombreux travaux restent à effectuer.

Dans un premier temps, il serait intéressant de développer de nouveaux modèles cellulaires *in vitro* afin de vérifier que l'impact de l'internalisation de ObRb sur l'activation des voies de transduction du signal sous-jacentes soit un fait plus général. Nous avons vu que l'isoforme ObRa peut également activer différentes voies de signalisation en réponse à la leptine, même si son importance *in vivo* dans l'action biologique de cette hormone adipocytaire est encore mal définie. Il serait alors intéressant d'étudier l'impact d'une inhibition de l'internalisation de ObRa sur la mise en place des voies de transduction du signal.

L'utilisation de cultures primaires de neurones hypothalamiques de rongeurs pourrait également être un modèle d'étude intéressant. Si celui-ci n'est pas adapté pour l'étude des caractéristiques d'internalisation de ObRb, pour des raisons essentiellement morphologiques, il permettrait d'étudier l'impact de l'internalisation de ObRb sur l'activation de STAT3 notamment, ceci dans un contexte plus physiologique que les modèles cellulaires classiques.

L'utilisation de cultures primaires de neurones hypothalamiques, ou de cellules issues des principaux tissus cibles périphériques de la leptine, obtenus à partir d'animaux obèses ou sains, permettrait d'étudier l'impact de l'obésité sur les caractéristiques cinétiques de l'internalisation du récepteur de la leptine, et la relation dans ce contexte entre internalisation et signalisation. Dans le cas de cette pathologie, l'exposition prolongée à de fortes concentrations plasmatiques de leptine pourrait entraîner à terme une modification de la cinétique et des caractéristiques d'endocytose de ObR, malgré le caractère constitutif de son internalisation. En effet, certaines protéines impliquées dans les voies de signalisation participent également à la régulation de la dynamique d'assemblage des CCP, et donc à la régulation de l'internalisation. L'altération des signaux de transduction cellulaires associée à l'obésité pourraient se repercuter sur le processus d'internalisation de ObR. Ainsi, si la relation entre internalisation et signalisation observée *in vitro* dans cette étude se vérifie *in vivo*, la potentielle dérégulation du processus d'internalisation de ObR associée à l'obésité pourrait participer à l'établissement du phénomène de résistance à la leptine, caractérisé notamment par une diminution de l'activation de STAT3 en réponse à la leptine.

Procédures expérimentales

I. Les modèles expérimentaux

I.1. Les animaux.

Les animaux ont été élevés dans des conditions d'élevage standard (23°C, cycle lumière/obscurité de 12h, accès libre à la nourriture et à l'eau) et les traitements expérimentaux ont été réalisés en accord avec les règles de conduite européennes. Les rats sont euthanasiés par décapitation après une légère anesthésie.

I.1.a. Les rats DIO.

Des rats Sprague-Dawley CD mâles (Charles River) âgés de six semaines sont alimentés avec de la nourriture standard (Purina 5001) ou énergétiquement riche (Research Diet, C11024) pendant 14 semaines. La nourriture énergétiquement riche est composée d'huile de maïs (8%), de lait concentré adouci (44%), de Purina 5001 (47%) et de maltodextrine 10 (1%). Le contenu énergétique est de 4.5 kcal/g (15% protéine, 52% hydrate de carbone, 33% lipide). L'évolution du poids des rats est contrôlée une fois par semaine. Les rats sont répertoriés comme obèses (DIOs) ou résistants (DIO_r) en fonction de leur poids final (voir la partie résultat).

I.1.b. Les rats Lou/C.

Les rats Lou/C mâles (Harlan) et les rats Wistar mâles (Harlan) utilisés pour cette étude sont âgés de 3 mois. Le traitement par la leptine a été réalisé par injection aiguë intrapéritonéale (leptine de rat, 2 mg/kg).

I.2. Les cellules.

I.2.a. Lignées cellulaires et conditions de culture.

Dans cette étude, deux lignées de cellules eucaryotes ont été utilisées, les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) et HEK (Human Embryonic Kidney). Ces deux lignées sont cultivées en conditions standard de culture (37°C, 5% CO₂), respectivement dans du milieu Ham F-12 et DMEM (4500 mg/L glucose, glutamax, sans pyruvate) supplémentés en sérum de veau foetal 10% (SVF), pénicilline 100 U/mL et streptomycine 100 µg/mL pour les cellules contrôles. Les lignées stables monoclonales de HEK exprimant ObRb sont maintenues en pression de sélection par l'ajout d'Hygromycine B 100 µg/mL dans le milieu de culture. Tous les milieux, antibiotiques et sérum utilisés proviennent du fournisseur Invitrogen.

I.2.b. Transfections et établissement des lignées stables.

Les transfections des cellules CHO et HEK ont été réalisées avec le Polyfect Transfection Reagent (Qiagen) en respectant le protocole du fabricant. Les constructions d'ADNc codant pour ObRb et ObRb-GFP de souris et clonées dans le vecteur d'expression pcDNA (Invitrogen) ont été fournies par le Dr L.M. Williams (Rowett Research Institute, Aberdeen, UK). Les plasmides codant pour les constructions de Dynamine-HA sauvage (Dyn WT pour Wild Type) et Dynamine-HA K44A mutée (Dyn K44A), clonées dans le vecteur d'expression eucaryote pCIS, ont été fournis par le Dr H. Al-Hasani (Dife Institute, Allemagne) (Al-Hasani H *et al.* 1998). Le plasmide codant pour la protéine JAK2 de souris a été fourni par le Dr V. Juvin (IGF, montpellier). Les plasmides ont été amplifiés puis purifiés suivant le protocole du fabricant (Endofree Plasmid Maxi kit, Qiagen).

Les lignées HEK exprimant de façon stable ObRb (HEK-ObRb) et ObRb-GFP (HEK-ObRb-GFP) ont été développées en collaboration avec le Dr M. Pyrski (Dife Institute, Allemagne). Brièvement les cellules HEK WT sont transfectées avec la construction ADNc codant pour ObRb ou ObRb-GFP et sont cultivées en présence d'antibiotique de sélection (Hygromycine B, 500µg/mL). Des clones indépendants sont isolés par la technique de dilution limite et maintenus en culture en présence de 100 µg/mL d'Hygromycine B. Les cellules sont cultivées en absence d'antibiotique de sélection pendant un minimum de 24 h avant toute expérience.

Tableau 1 : Quantité d' ADN transfecté en µg.

	ObRb	Dyn WT	Dyn K44A	JAK2
HEK-ObRb-GFP	x	15	15	12
HEK-ObRb	x	15	15	12
CHO WT	12	8	8	6

Pour l'étude de l'activation des voies de signalisation, le jour précédant la transfection des Dyn WT, Dyn K44A et JAK2 (et ObRb), 8×10^6 cellules HEK-ObRb ou HEK-ObRb-GFP, ou 3×10^6 cellules CHO WT sont ensemencées dans des boîtes de culture de 20 cm de diamètre. Après 24 h, la transfection est réalisée en suivant le protocole du fabricant et en respectant le ratio [quantité d'ADN / Polyfect Reagent] recommandé (Polyfect, Qiagen) (voir Tableau 1). Les cellules sont ensuite cultivées dans des conditions standard pendant 36 h puis déprivées en sérum pendant 12 h avant stimulation par la leptine (leptine humaine, 50 nM, Sigma, diluée dans du milieu DMEM sans sérum).

II. Immunohistochimie, immunocytochimie.

II.1. Liste des différents anticorps utilisés.

Immunofluorescence (IF). Western Blot (WB).

Anti-ObR, chèvre, Santa-Cruz, IF 1/100.

Anti-GH, lapin, DAKO IF 1/500

Anti-GFP, lapin, Torrey Pines, 1/500 IF, 1/250 WB.

Anti-HA, souris, Sigma-aldrich, 1/500 WB.

Anti clathrin / caveolin, chèvre, Santa-Cruz, 1/100.

Anti-Rab4, souris, BD biosciences, IF 1/300.

Anti-EEA1, souris, BD biosciences, IF 1/200.

Anti-TGN, souris, BD biosciences, IF 1/500.

Anti-GM130, souris, BD biosciences, IF 1/500.

Anti-STAT3, lapin, Santa-Cruz, IF 1/100 IP 1/1000, WB 1/200.

Anti-PhosphoTyrosine, souris, BD biosciences, WB 1/500.

Anti-Pan ERK, souris, BD biosciences, WB 1/500.

Anti-IRS1, souris, BD biosciences, WB 1/1000.

Anti-JAK2, souris, BD biosciences, WB 1/500.

Anti-PI3K, chèvre, Santa-Cruz 1/200.

IgG conjugué à l'Alexa 488, Molecular Probes, 1/500.

IgG conjugué à l'Alexa 546, Molecular Probes, 1/500.

IgG conjugué à l'HRP, DAKO, 1/2000.

II.2. Préparation des échantillons.

II.2.a. Tissus congelés.

Les tissus (dans notre cas les hypophyses) sont rapidement prélevés, brièvement rincés dans du PBS à 4°C, déposés dans une goutte de Tissu-Tek puis congelés sur un lit de carboglace et conservés à -80°C. Des coupes de 7 à 15 µm selon les cas sont réalisées à froid à l'aide d'un cryostat, puis conservées dans une boîte hermétique à -80°C. Avant l'expérience d'immunohistochimie, les coupes sont fixées dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% (1 min) puis rincées avec du PBS (3x1 min). Ce protocole diffère pour le marquage réalisé dans l'expérience de LCM (pour « Laser Capture Microdissection ») (voir le chapitre correspondant).

II.2.b. Tissus enrobés en paraffine.

Les tissus sont rapidement prélevés, brièvement rincés dans du PBS à 4°C, puis fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% sur la nuit, à 4°C, avec agitation. Les tissus sont ensuite rincés dans un grand volume de PBS/Glycine 0,1 M pendant au minimum 3x1 h. Les tissus ainsi fixés peuvent être conservés à 4°C pendant quelques jours, à l'obscurité.

Pour l'enrobage en paraffine, les tissus sont déshydratés par des bains successifs d'alcool 70%, 90% et 100% (2x5 min). Les tissus sont ensuite incubés dans du butanol (1 h à température ambiante) puis dans un mélange 50/50 de butanol et paraffine (paraplast, Mc Cormick) (1h à 56 °C), et pour finir par des bains successifs de paraffine pure (3 x 4 h). Les tissus inclus en paraffine peuvent être conservés à température ambiante pendant de nombreuses années.

Des coupes de 15 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome et déposées sur des lames histologiques silanées. Avant l'expérience d'immunohistochimie, les coupes sont déparaffinées dans du xylène (2x1 h), puis réhydratées par des bains successifs d'alcool 100%, 90%, 70% (2x2 min) et de PBS (2x5 min)

II.2.c. Cellules en culture.

Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre recouvertes de Poly-D-Lysine, permettant une meilleure adhérence des cellules sur le verre. Le milieu de culture est ensuite aspiré et les cellules sont rincées avec du PBS à 4°C (3x2 min) puis fixées avec une solution de PFA 4% à 4°C pendant 15 min et rincées avec du PBS/Glycine 0,1 M (3x5 min) puis du PBS seul (2x5 min). Les cellules ainsi fixées peuvent être conservées quelques jours à 4°C, à l'obscurité.

II.3. Immuno-marquage.

Les cellules sont perméabilisées avec une solution de PBS/TritonX100 0,05% pendant 5 min à température ambiante (RT pour room temperature) puis incubées avec une solution de PBS/BSA 5% pendant 30 min afin de bloquer les sites non spécifiques. Les tissus sont directement incubés avec la solution de PBS/BSA 5%. Une incubation avec les anticorps primaires (dilués dans une solution de PBS-BSA 1%) est ensuite réalisée pendant 1 heure à RT ou sur la nuit à 4°C. Les cellules/tissus sont ensuite rincés abondamment dans du PBS pendant 3x10 min au minimum. Les anticorps secondaires couplés au fluorochromes sont incubés à RT pendant 30 min à 1 h. Après plusieurs lavages abondants dans du PBS, les lames ou lamelles sont montées pour leur observation en microscopie.

II.4. Observation en microscopie à fluorescence.

Les images sont acquises avec un microscope Zeiss LSM 510 à balayage laser équipé du système META, équipé de sources laser et de trois canaux de détection séparés, comportant chacune leur propre « pinhole ». Les images fluorescentes correspondant aux Alexa 488 (excitée par une source laser Argon 488 nm et émettant à 519 nm) et Alexa 546 (excitée par une source laser HeNe 543 nm et émettant à 573 nm) sont collectées séquentiellement sur deux canaux différents. Un jeu de filtres appropriés est utilisé afin de réduire la fluorescence non spécifique. Les images ainsi collectées ont été analysées avec les logiciels Imaris 4 (Bitplane) et Zeiss.

II.5. Quantification de la fluorescence.

La technique de quantification de la fluorescence a été réalisée en collaboration avec le Dr Y. Usson (Grenoble, CNRS UMR5525). Elle est décrite dans l'article intitulé « Nuclear translocation and retention of GH » (Mertani HC *et al.* 2003). Brièvement, la fluorescence correspondant au marquage du récepteur de la leptine a été quantifiée dans les cellules somatotropes, à partir de coupes d'hypophyse en paraffine. Une double immunofluorescence GH/ObR est réalisée, les cellules somatotropes sont identifiées et un masque binaire est créé. La fluorescence correspondant à ObR est quantifiée uniquement dans ce masque en utilisant un logiciel spécialement développé pour cette technique (Samba).

II.6. Immuno-marquages en microscopie électronique.

Afin de procéder à la co-localisation entre ObRb et les protéines clathrine et cavéoline, les cellules HEK-ObRb-GFP sont fixées pendant 20 min à 4°C dans une solution de PFA 4% et glutaraldéhyde 0,05%. Les cellules sont ensuite incubées dans du PBS contenant 0,4 M de sucrose (30 min, 4°C) afin de les cryo-protéger, puis congelées comme précédemment décrit (Lobie PE *et al.* 1999). Des coupes ultra-fines de 80 nm congelées sont réalisées en utilisant un microtome (Ultracut S, Leica) et montées sur des grilles de nickel.

L'immunocytoologie est réalisée en incubant les coupes avec du PBS-BSA 1% pendant 10 min à RT, puis avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 1% pendant 1h à RT. Après rinçages, les coupes sont incubées avec l'anticorps secondaire (dilué dans du PBS-BSA 1%) couplé à des particules d'or de 5 ou 10 nm de diamètre, pendant 1 h à RT. Les coupes sont ensuite fixées avec du glutaraldéhyde 2,5%, marquées avec de l'acétate d'uranyle neutre

à 4% pendant 20 min et enrobées de méthylcellulose. Les coupes sont observées sur un microscope électronique Philips CM120 (80kV) (Centre Technologique des Microstructures).

III. Purification des ARN et PCR quantitative.

III.1. Extraction des ARN.

Dans toutes ces étapes, le matériel utilisé ainsi que les différentes solutions sont « RNases free ». Les tissus sont rapidement prélevés, brièvement rincés dans du PBS à 4°C, et les ARN totaux sont extraits en utilisant le kit d'extraction PROMEGA, conformément aux instructions du fabricant. Ce kit comprend une étape de traitement à la DNaseI afin d'éliminer les contaminations par l'ADN génomique. La qualité des ARN extraits a été contrôlée par Bioanalyseur (Agilent).

III.2. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc).

Dans un volume final de 10 µL, 1 µg d'ARN est incubé pendant 5 min à 65°C (puis 5 min à 4°C) en présence de 1 µL d'Oligo(dT)12-18 (500 µg/mL, Invitrogen) et de 1 µL de dNTP (10 nM chacun, Invitrogen). Sont alors ajoutés sur la glace : 4µL de tampon (first strand buffer 5X, Invitrogen), 2 µL de DTT 0,1 M (Invitrogen), 1 µL de RNase OUT (Invitrogen), 1 µL d'eau ultrapure et 1 µL de Transcriptase Inverse Superscript II (Invitrogen). La synthèse des ADNc est réalisée lors d'un cycle de 2 min à 37°C, 50 min à 42°C et 5 min à 85°C. Les 20 µL de réaction ainsi obtenus sont dilués 12,5 fois (ou 25 fois selon les gènes étudiés) dans de l'eau ultrapure, aliquotés et conservés à -20°C jusqu'à utilisation comme ADN cibles dans les réactions de PCR.

III.3. Choix des amorces.

Chaque couple d'amorces (Tableau 2) a été sélectionné grâce au logiciel OligoPerfect (Invitrogen). Les critères appliqués sont : i) une taille du fragment amplifié inférieure à 200 pb, ii) si possible la présence d'une jonction intron/exon au sein de ce fragment, iii) un nombre limité de GC dans la séquence permettant de diminuer les risques de formation de boucle intramoléculaire et de dimérisation des amorces. Pour chaque couple d'amorces, la température optimale d'hybridation a été déterminée par PCR classique. Par la suite, pour chaque PCR quantitative, l'absence de plusieurs produits de PCR ainsi qu'une efficacité de réaction adéquate ont été vérifiées.

Tableau 2 : Les différentes amorces utilisées.

gènes	forward primer (5'--3')	reverse primer (5'--3')
ObRa	GCT GTG CAG TCA CTC AGT GC TGC AGG GCT GTA TGT CAT TG	TCA AAG AGT GTC CGC TCT CTT TTG G AGT GTC CGC TCT CTT TTG GGA
ObRb	CAG ATC ATC CAC CCA ATG TG TGA CCA CTC CAG ATT CCA CA	TTC CCC GTG ATT TTC TTC AG CCA CTG TTT TCA CGT TGC TG
GHSR	CAC CAC CAC CAA CCT CTA CC	GGA AGC AGA TGG CGA AGT AG
GHRH	GAA ATC ATG AAC AGG CAG CA	GCT GAA AGC TTC ATC CTT GG
GHRH-R	CAC TGC CCC AGG AAC TAC AT	CCA CAG AGA CCT TGC ACA GA
SRIF	TGG CAG AAC TGC TGT CTG AG	GAA GTT CTT GCA GCC AGC TT
sst1-R	GGA GCG ACA GTA AGC AGG AC	CTT TCG GAC AAG CCA GAC TC
sst2-R	CCC GCT ATG TAA TCT CGT	TGC AAG AGG GAT GCT G
sst5-R	CGC CAA GAT GAA GAC AGT TAC	TGA CCA TCA GGC AGA AGA TAC
IGF1-R	GTG CTG TAC GCC TCT GTG AA	TTG CAG CCT CAT TCA CTG TC
GH-R	GCC CTG CCA AGA AAA TTA CA	GGA GCG GTA TCT GCT GTC TC
leptine	CAG GTT CCA GCT TCT TGA GC	GCT TGT CCT CTG TCC TCT GG
ghréline	TGA GCT ATC TGC AGC ACG TT	TGA CAC CAA AAC CCT CAT CA
β -actin	CAC TTT CTA CAA TGA GCT GCG	AAG GAA GGC TGG AAG AGA GC

III.4. PCR quantitative en temps réel.

La majorité des réactions de PCR quantitatives est réalisée sur le eCycler (BioRad), utilisant des plaques de 96 puits spéciales. Chaque réaction de PCR a été réalisée en triplicate. Chaque puit contient un volume de réaction final de 25 μ L constitué d'un mélange de 1 μ L d'ADNc, 2,5 μ L de buffer 10X (Invitrogen), 1 μ L de MgCl₂ (50 nM, Invitrogen), 1,25 μ L d'Evagreen 20X (équivalent du SYBR Green, Biotum), 0,125 μ L de Polymerase Platinum Taq (Invitrogen), 0,05 μ L de chaque dNTP (100 mM, Invitrogen), 0,05 μ L de chaque amorce à 100 μ M, et 9 μ L d'eau ultrapure. Les conditions d'amplification appliquées sont : un cycle d'activation de la Taq polymérase de 15 min à 95°C (« Hot start ») suivi de 35 à 45 cycles. comportant une étape de dénaturation (15 sec, 95°C), une étape d'hybridation (30sec à la température spécifique du couple d'amorce) et une étape d'élongation (30 sec, 72°C). La qualité des fragments de PCR amplifiés est contrôlée en réalisant une courbe de fusion après amplification.

III.5. Analyse et normalisation.

Pour chaque gène, des quantifications relatives sont réalisées par rapport à des gammes de dilutions séquentielles d'ADNc et l'analyse est effectuée avec le logiciel eCycler. Les résultats sont ensuite normalisés par rapport au gène de la β -Actine dont l'expression est la plus stable parmi les différents gènes de ménage testés dans nos conditions expérimentales (tissu hypophysaire). Pour chaque gène étudié, trois PCR quantitatives au minimum ont été réalisées, à partir d'ADNc issus d'au moins deux RT indépendantes afin de limiter les erreurs de quantification liées à la réaction de transcription inverse.

IV. Analyse de l'expression et de l'activation des protéines tissulaires ou cellulaires.

IV.1. Extraction des protéines totales.

IV.1.a. Pour les tissus.

Les tissus (hypophyses) sont prélevés, rincés rapidement dans du PBS à 4°C, puis broyés dans du tampon de lyse, sur la glace, dans un Potter adapté aux petits volumes. Le lysat ainsi obtenu est récupéré et incubé sur la glace pendant 30 min avec agitations occasionnelles (vortex). Le lysat est alors homogénéisé à l'aide d'une seringue préalablement refroidie et incubé de nouveau 10 min sur la glace. Les protéines solubilisées sont récupérées après centrifugation (16000g, 30 min, 4°C) et leur concentration estimée par la méthode de Bradford (protein assay, Pierce).

IV.1.b. Pour les cellules en culture.

Les cellules sont rincées abondamment avec du PBS à 4°C, les boîtes de culture étant placées sur la glace. Le PBS est correctement aspiré, le tampon de lyse est ajouté et les cellules sont décollées à l'aide d'un grattoir et récupérées avec le tampon de lyse dans un tube approprié placé sur la glace. Le lysat obtenu est pipeté plusieurs fois à l'aide d'une pipette de 200 μ l, et incubé sur la glace pendant 30 minutes avec agitation occasionnelle (vortex). Le lysat est alors homogénéisé à l'aide d'une seringue préalablement refroidie et incubé de nouveau 10 min sur la glace. Les protéines solubilisées sont récupérées après centrifugation (16000g, 30 min, 4°C) et leur concentration estimée par la méthode de Bradford (protein assay, Pierce).

IV.1.c. Les différents tampons de lyse utilisés.

Pour les expériences d'immuno-précipitation (cellules en culture), le tampon de lyse utilisé est le RIPA modifié dont la composition est la suivante : Tris-HCl 50 mM pH 7,4 ; NP-40 1%; Na-deoxycholate 0,25%; NaCl 150 mM ; EDTA 1 mM.

Pour les expériences d'analyse en Western-blot classique le tampon de lyse utilisé est composé de NP-40 1%; TritonX-100 0,5% ; glycérol 10%; EDTA 1 mM; NaCl 150 mM; Tris-HCl 50mM pH 7,4. Pour l'ELISA anti-ObR, le tampon utilisé est identique, excepté qu'il ne contient pas d'EDTA.

A ces tampons de lyse est ajouté un cocktail d'inhibiteur de protéases (Complete EDTA-free, Roche) et de phosphatases (Sigma).

IV.2. Immuno-précipitation (pour cellules en culture).

Dans un premier temps, les billes de sépharose couplées aux protéines A/G (Santa-Cruz) sont préparées par une incubation de 30 min sur la glace dans une solution de Tris-HCl (pH 7,4)–BSA 2%. Les billes sont récupérées par centrifugation et rincées 3 fois dans la solution de Tris. Le lysat de protéines (de 500 µg à 2,5 mg de protéines à une concentration de 1 µg/mL) est clarifié en ajoutant les billes couplées aux protéines A/G (20 µL) pendant 10 min à 4°C. Le lysat clarifié est récupéré par centrifugation et incubé en présence de l'anticorps primaire à 4°C sur la nuit avec agitation (agitateur orbital). L'immuno-complexe formé est capturé en incubant le lysat avec les billes couplées aux protéines A/G (50 µL) pendant 2 h à 4°C, toujours sous agitation. Les billes sont récupérées par centrifugation (5 sec, 10000 rpm) et rincées 3 fois avec le tampon de lyse ou du PBS selon les cas. Les billes sont alors resuspendues dans 50 µL de tampon de charge dénaturant 2X (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 ; glycérol 20% ; SDS 10% ; 2-mercaptoéthanol 10% et bleu de bromophénol 0,01%), et le tout est chauffé pendant 5min à 100°C environ. Les billes sont éliminées par centrifugation et le surnageant est chargé sur le gel SDS-PAGE et analysé par la technique de Western-blot.

IV.3. Le Western-blot.

Les protéines sont diluées dans du tampon de charge dénaturant, séparées par SDS-PAGE et transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes sont saturées par incubation avec du TBS-T (TBS + Tween 20 0,05%) contenant 5% de lait ou 3% de BSA selon les cas. Les membranes sont ensuite incubées avec anticorps primaires sur la nuit à 4°C. Après rinçage avec le TBS-T (3x15 min), les membranes sont incubées 30 min à RT avec les

anticorps couplés à l'enzyme HRP (HorseRadish Peroxidase) et la révélation des protéines est réalisée par chimioluminescence en utilisant le substrat ECL+ (Amersham). Les membranes peuvent être de nouveau utilisées après élimination des anticorps (« stripping ») réalisée par incubation 15 min à RT dans une solution à pH 2,2 composée de glycine 100mM, NP-40 0,1% et SDS 0,2%. Elles sont ensuite lavées avec de l'eau milliQ (3 x 5 min) puis du PBS (10 min) et de nouveau saturées et incubées avec les anticorps.

Une fois les films développés, ils sont scannés (ImageScanner II, GE Healthcare) et l'intensité des bandes, correspondant à la quantité de protéines, est évaluée (semi-quantification ; ImageQuant TL software, GE Healthcare). Le marqueur de poids moléculaire est utilisé pour calibrer le système et permettre une comparaison entre les films de chaque série d'expériences.

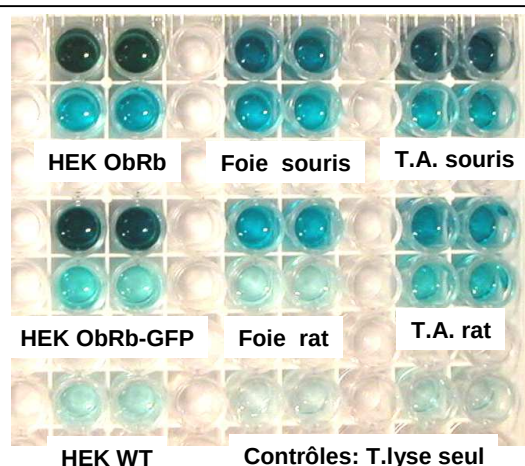


Fig 70: Validation du kit ELISA ObR.

L'utilisation du kit ELISA ObR a été validée en réalisant cette expérience sur les cellules HEK-ObRb, HEK-ObRb-GFP, et sur le tissu adipeux (T.A) et le foie de souris et de rat.

IV.4. L'ELISA.

Les techniques d'ELISA réalisées durant cette thèse sont basées sur l'utilisation de kits commerciaux. Pour chaque kit, les conditions expérimentales sont variables et sont décrites sur les sites web des fabricants. Le kit ELISA anti-ObR (R&D system) a été développé à l'origine pour quantifier l'isoforme ObRe dans le plasma. Des mises au point ont été réalisées au laboratoire pour adapter son fonctionnement aux tissus, en utilisant un tampon de lyse particulier (voir chapitre III.1.c). Tous les contrôles nécessaires ont été réalisés pour valider l'utilisation de ce kit sur les tissus (Figure 70).

V. Laser Capture Microdissection (LCM).

V.1. Immuno-marquage fluorescent des cellules somatotropes et microdissection.

Tous les instruments, récipients et les solutions (à part les anticorps) sont RNases free. Les hypophyses congelées et conservées à -80°C sont coupées à l'aide d'un cryostat à une épaisseur de 12 µm. Les coupes sont conservées à -80°C. Le jour de l'expérience de microdissection, les coupes stockées à -80°C sont fixées à l'acétone (2 min, à 4°C) puis brièvement rincées dans du PBS à 4°C (5 sec). Les étapes suivantes sont réalisées à l'abri de la lumière. L'anticorps primaire est appliqué sur les coupes pendant 5 min à 4°C (anti-GH DAKO, dilué dans du PBS au 1/500). Les coupes sont rincées (PBS pendant 2min, 4°C) puis incubées avec l'anticorps secondaire pendant 5 min à 4°C (CY3, Dako, 1/700) et à nouveau rincées dans du PBS (2 min, 4°C). Les coupes sont alors déshydratées par des bains successifs d'éthanol (75%, 95%, 100% ; 2 x 30 sec chacun) et de xylène (2 x 5 min). Les coupes sont alors conservées sous vide, à RT et à l'obscurité.

La microdissection est réalisée conformément aux recommandations du fabricant (Arcturus, Pix cell system). Les cellules GH identifiées par immuno-marquage sont prélevées à l'aide de capsules HS (Arcturus). Environ 1000 cellules sont prélevées par hypophyse.

V.2. Extraction des ARN, amplification et PCR quantitative.

Les ARN sont extraits selon le protocole du fabricant (Qiagen, RNAeasy microkit). Une étude qualitative des ARN est réalisée à l'aide du Bioanalyseur (AGILENT). L'analyse comparative est portée sur les ARN extraits des coupes avant et après immuno-marquage, de même qu'avant et après LCM, afin de vérifier que ces traitements n'induisent pas de dégradation significative des ARN, incompatible avec l'étude en PCR quantitative.

La quantité d'ARN totaux obtenus après microdissection étant faible, les ARNm ont été amplifiés suivant le protocole du fabricant (MessageAmp aRNA kit ; Ambion). Brièvement, une transcription inverse est réalisée en utilisant des amorces de type oligo(dT) contenant le promoteur T7. L'ADN est transcrit en utilisant l'ARN polymérase T7 afin de générer des copies de chaque ARNm présent dans l'échantillon. Il a été démontré que cette amplification n'altère pas la proportion relative de chaque ARNm par rapport à l'ensemble de la population des ARNm. Cette méthode est donc compatible avec les expériences de PCR quantitative (King C *et al.* 2005). La quantité d'ARN obtenu après amplification est de l'ordre de 10-15 ng/µL. Par la suite une transcription inverse est réalisée comme précédemment

décrit, en utilisant ici comme amorces des « random hexamer », les ARN amplifié ne possédant plus de queue polyA. La PCR quantitative en temps réel est ensuite réalisée suivant le protocole précédemment décrit.

VI. Mesure de la cinétique d'internalisation de la leptine

VI.1. I^{125} binding couplé à la technique de lavages acides.

Les cellules sont cultivées jusqu'à 80% de confluence dans des boîtes de Pétri (60mm) recouvertes de la Poly-D-Lysine. Après rinçage avec du PBS (4°C, 2 x 5 min), les cellules sont incubées avec 100 000 cpm de leptine radiomarquée à l' I^{125} , dans 0,5ml de milieu DMEM contenant 1% de BSA, pendant 2 h à 4°C. Les cellules sont rincées avec du PBS (4°C) afin d'enlever la leptine radio-marquée non fixée, puis remises en culture dans du milieu DMEM à 37°C pendant les différents temps de la cinétique. Les cellules sont ensuite rincées à nouveau avec du PBS à 4°C puis incubées avec un tampon acide (NaCl 0,5 M ; acide acétique 0,2 M) pendant 5 min pour dissocier les complexes leptine/récepteur localisés à la surface cellulaire. Un deuxième lavage acide est ensuite réalisé. La radioactivité contenue dans les solutions acides récupérées après ces deux lavages et contenant la leptine radio-marquée est mesurée en utilisant un compteur gamma.

VI.2. Technique de biotinylation des protéines de surface.

Les cellules HEK-ObRb-GFP sont cultivées jusqu'à 80% de confluence dans des boîtes de Pétri (60mm) recouvertes de la Poly-D-Lysine et sont rincées avec du PBS à 4°C. L'ensemble des protéines localisées à la surface cellulaire est marqué après incubation des cellules dans une solution de PBS à pH 8 contenant 0,5 mg/mL de Sulfo-NHS-SS-Biotine pendant 2 h à 4°C, en accord avec le protocole du fabricant (Pierce). Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS (4°C, pH 8, 2 x 5 min) et remises en culture (37°C, milieu DMEM) en présence ou absence de leptine (leptine humaine, 50 nM, Sigma), pendant les différents temps de la cinétique. Après rinçage avec du PBS à 4°C, les ponts disulfures sont clivés en utilisant 50 nM de glutathion dans une solution contenant 75 mM de NaCl, 75 mM de NaOH, 10% de SVF à 4°C pendant 15min. Les cellules sont de nouveau rincées à 4°C avec du PBS. Il est nécessaire de noter que les protéines biotinylées localisées dans le cytoplasme sont protégées du clivage. Les protéines totales sont ensuite extraites dans le tampon de lyse RIPA modifié, les protéines biotinylées sont immuno-précipitées en utilisant la streptavidine, séparées par SDS-PAGE et visualisées par la technique de Western-blot en

utilisant un anticorps anti-GFP. L'intensité des bandes a été mesurée comme précédemment décrit.

Bibliographie

(501 références)

-A-

- Ahima, R.S., Saper, C.B., Flier, J.S. and Elmquist, J.K. (2000). "Leptin Regulation of Neuroendocrine Systems." *Frontiers in Neuroendocrinology* 21(3): 263-307.
- Ahima, R.S. and Flier, J.S. (2000). "Leptin." *Annual Review of Physiology* 62(1): 413-37.
- Al-Hasani, H., Hinck, C.S. and Cushman, S.W. (1998). "Endocytosis of the Glucose Transporter GLUT4 Is Mediated by the GTPase Dynamin." *J. Biol. Chem.* 273(28): 17504-10.
- Allevato, G., Billestrup, N., Goujon, L., Galsgaard, E.D., Norstedt, G., Postel-Vinay, M.-C., Kelly, P.A. and Nielsen, J.H. (1995). "Identification of Phenylalanine 346 in the Rat Growth Hormone Receptor as Being Critical for Ligand-mediated Internalization and Down-regulation." *J. Biol. Chem.* 270(29): 17210-4.
- Alliot, J., Boghossian, S., Jourdan, D., Veyrat-Durebex, C., Pickering, G., Meynial-Denis, D. and Gaumet, N. (2002). "The LOU/c/jall Rat as an Animal Model of Healthy Aging?" *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57(8): B312-20.
- Alvarez, C.V., Mallo, F., Burguera, B., Cacicedo, L., Dieguez, C. and Casanueva, F. (1991). "Evidence for a direct pituitary inhibition by free fatty acids of in vivo growth hormone responses to growth hormone-releasing hormone in the rat." *Neuroendocrinology* 53: 185-9.
- Anand, B. and Brobeck, J. (1951). "Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat." *Proc Soc Exp Biol Med* 77: 323-4.
- Araki, E., Lipes, M.A., Patti, M.-E., Bruning, J.C., Haag Iii, B., Johnson, R.S. and Kahn, C.R. (1994). "Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene." *Nature* 372(6502): 186-90.
- Argyropoulos, G., Rankinen, T., Neufeld, D.R., Rice, T., Province, M.A., Leon, A.S., Skinner, J.S., Wilmore, J.H., Rao, D.C. and Bouchard, C. (2002). "A Polymorphism in the Human Agouti-Related Protein Is Associated with Late-Onset Obesity." *J Clin Endocrinol Metab* 87(9): 4198-202.
- Arima, H. and Aguilera, G. (2000). "Vasopressin and Oxytocin Neurones of Hypothalamic Supraoptic and Paraventricular Nuclei Co-Express mRNA for Type-1 and Type-2 Corticotropin-Releasing Hormone Receptors." *Journal of Neuroendocrinology* 12(9): 833-42.

- Ariyasu, H., Takaya, K., Hosoda, H., Iwakura, H., Ebihara, K., Mori, K., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Kojima, M., Kangawa, K. and Nakao, K. (2002). "Delayed Short-Term Secretory Regulation of Ghrelin in Obese Animals: Evidenced by a Specific RIA for the Active Form of Ghrelin." *Endocrinology* 143(9): 3341-50.
- Arvat, E., Maccario, M., Di Vito, L., Broglio, F., Benso, A., Gottero, C., Papotti, M., Muccioli, G., Dieguez, C., Casanueva, F.F., Deghenghi, R., Camanni, F. and Ghigo, E. (2001). "Endocrine Activities of Ghrelin, a Natural Growth Hormone Secretagogue (GHS), in Humans: Comparison and Interactions with Hexarelin, a Nonnatural Peptidyl GHS, and GH-Releasing Hormone." *J Clin Endocrinol Metab* 86(3): 1169-74.
- Ashwell, C.M., McMurtry, J.P., Wang, X.H., Zhou, Y. and Vasilatos-Younken, R. (1999). "Effects of growth hormone and pair-feeding on leptin mRNA expression in liver and adipose tissue." *Domestic Animal Endocrinology* 17(1): 77-84.
- Azain, M.J., Roberts, T.J., Martin, R.J. and Kasser, T.R. (1995). "Comparison of daily versus continuous administration of somatotropin on growth rate, feed intake, and body composition in intact female rats." *J. Anim Sci.* 73(4): 1019-29.

-B-

- Baass, P.C., Di Guglielmo, G.M., Authier, F., Posner, B.I. and Bergeron, J.J.M. (1995). "Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases." *Trends in Cell Biology* 5(12): 465-70.
- Bagnasco, M., Kalra, P.S. and Kalra, S.P. (2002). "Ghrelin and Leptin Pulse Discharge in Fed and Fasted Rats." *Endocrinology* 143(2): 726-.
- Bahjaoui-Bouhaddi, M., Fellmann, D., Griffond, B. and Bugnon, C. (1994). "Insulin treatment stimulates the rat melanin-concentrating hormone-producing neurons." *Neuropeptides* 27(4): 251-8.
- Bale, T.L., Contarino, A., Smith, G.W., Chan, R., Gold, L.H., Sawchenko, P.E., Koob, G.F., Vale, W.W. and Lee, K.-F. (2000). "Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress." *Nat Genet* 24(4): 410-4.

- Banks, A.S., Davis, S.M., Bates, S.H. and Myers, M.G., Jr. (2000). "Activation of Downstream Signals by the Long Form of the Leptin Receptor." *J. Biol. Chem.* 275(19): 14563-72.
- Banks, W.A., DiPalma, C.R. and Farrell, C.L. (1999). "Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity." *Peptides* 20(11): 1341-5.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B. and Maness, L.M. (1996). "Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin." *Peptides* 17(2): 305-11.
- Baratta, M., Saleri, R., Mainardi, G.L., Valle, D., Giustina, A. and Tamanini, C. (2002). "Leptin Regulates GH Gene Expression and Secretion and Nitric Oxide Production in Pig Pituitary Cells." *Endocrinology* 143(2): 551-7.
- Barinaga, M., Bilezikjian, L.M., Vale, W.W., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M. (1985). "Independent effects of growth hormone releasing factor on growth hormone release and gene transcription." *Nature* 314(6008): 279-81.
- Baron, V., Alengrin, F. and Van Obberghen, E. (1998). "Dynamin Associates with Src-Homology Collagen (SHC) and Becomes Tyrosine Phosphorylated in Response to Insulin." *Endocrinology* 139(6): 3034-7.
- Barouch, L.A., Berkowitz, D.E., Harrison, R.W., O'Donnell, C.P. and Hare, J.M. (2003). "Disruption of Leptin Signaling Contributes to Cardiac Hypertrophy Independently of Body Weight in Mice." *Circulation* 108(6): 754-9.
- Barr, V.A., Lane, K. and Taylor, S.I. (1999). "Subcellular Localization and Internalization of the Four Human Leptin Receptor Isoforms." *J. Biol. Chem.* 274(30): 21416-24.
- Bartke, A. (2003). "Can Growth Hormone (GH) Accelerate Aging? Evidence from GH-Transgenic Mice." *Neuroendocrinology* 78(4): 210-6.
- Baskin, D.G., Breininger, J.F. and Schwartz, M.W. (2000). "SOCS-3 expression in leptin-sensitive neurons of the hypothalamus of fed and fasted rats." *Regulatory Peptides* 92(1-3): 9-15.
- Baskin, D.G., Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Breininger, J.F., Jonak, Z., Schaefer, J., Krouse, M., Burghardt, C., Campfield, L.A., Burn, P. and Kochan, J.P. (1999). "Leptin Receptor Long-form Splice-variant Protein Expression in Neuron Cell Bodies of the Brain and Co-localization with Neuropeptide Y mRNA in the Arcuate Nucleus." *J. Histochem. Cytochem.* 47(3): 353-62.
- Bates, S.H. and Myers, J.M.G. (2003). "The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 14(10): 447-52.

- Bates, S.H., Stearns, W.H., Dundon, T.A., Schubert, M., Tso, A.W.K., Wang, Y., Banks, A.S., Lavery, H.J., Haq, A.K., Maratos-Flier, E., Neel, B.G., Schwartz, M.W. and Myers, M.G. (2003). "STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction." *Nature* 421(6925): 856-9.
- Baumann, H., Morella, K.K., White, D.W., Dembski, M., Bailon, P.S., Kim, H., Lai, C.-F. and Tartaglia, L.A. (1996). "The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors." *PNAS* 93(16): 8374-8.
- Bayer, L., Colard, C., Nguyen, N.U., Risold, P., Fellmann, D. and Griffond, B. (2000). "Alteration of the expression of the hypocretin (orexin) gene by 2-deoxyglucose in the rat lateral hypothalamic area." *Neuroreport* 11(3): 531-3.
- Bazan, J.F. (1989). "A novel family of growth factor receptors: A common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor [beta]-chain." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 164(2): 788-95.
- Beck, B., Burlet, A., Nicolas, J.P. and Burlet, C. (1989). "Neurotensin in microdissected brain nuclei and in the pituitary of the lean and obese Zucker rats." *Neuropeptides* 13(1): 1-7.
- Beck, B., Burlet, A., Nicolas, J.-P. and Burlet, C. (1990). "Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) in obese Zucker rats: Implications in feeding and sexual behaviors." *Physiology & Behavior* 47(3): 449-53.
- Beck, B. and Richy, S. (1999). "Hypothalamic Hypocretin/Orexin and Neuropeptide Y: Divergent Interaction with Energy Depletion and Leptin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258(1): 119-22.
- Begeot, M., Dubois, M. and Dubois, P. (1977). "Growth hormone and ACTH in the pituitary of normal and anencephalic human fetuses: immunocytochemical evidence for hypothalamic influences during development. ." *Neuroendocrinology*. 24: 208-20.
- Behrmann, I., Smyczek, T., Heinrich, P.C., Schmitz-Van de Leur, H., Komyod, W., Giese, B., Muller-Newen, G., Haan, S. and Haan, C. (2004). "Janus Kinase (Jak) Subcellular Localization Revisited: The exclusive membrane localization of endogenous Janus Kinase 1 by cytokine receptor interaction uncovers the receptor complex to be equivalent to a receptor tyrosine kinase *J. Biol. Chem.* 279(34): 35486-93.
- Belouzard, S., Delcroix, D. and Rouille, Y. (2004). "Low Levels of Expression of Leptin Receptor at the Cell Surface Result from Constitutive Endocytosis and Intracellular Retention in the Biosynthetic Pathway." *J. Biol. Chem.* 279(27): 28499-508.

- Belouzard, S. and Rouille, Y. (2006). "Ubiquitylation of leptin receptor OB-Ra regulates its clathrin-mediated endocytosis." *Embo J.* 25: 932-42.
- Bence, K.K., Delibegovic, M., Xue, B., Gorgun, C.Z., Hotamisligil, G.S., Neel, B.G. and Kahn, B.B. (2006). "Neuronal PTP1B regulates body weight, adiposity and leptin action." *Nat Med* 12(8): 917-24.
- Bendinelli, P., Maroni, P., Pecori Giraldi, F. and Piccoletti, R. (2000). "Leptin activates Stat3, Stat1 and AP-1 in mouse adipose tissue." *Molecular and Cellular Endocrinology* 168(1-2): 11-20.
- Bengtsson, B.A., Eden, S., Lonn, L., Kvist, H., Stokland, A., Lindstedt, G., Bosaeus, I., Tolli, J., Sjostrom, L. and Isaksson, O.G. (1993). "Treatment of adults with growth hormone (GH) deficiency with recombinant human GH." *J Clin Endocrinol Metab* 76(2): 309-17.
- Benomar, Y., Roy, A., Aubourg, A., Djiane, J. and Taouis, M. (2005). "Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line." *Biochem. J* 388: 929-36.
- Berryman, D.E., List, E.O., Coschigano, K.T., Behar, K., Kim, J.K. and Kopchick, J.J. (2004). "Comparing adiposity profiles in three mouse models with altered GH signaling." *Growth Hormone & IGF Research* 14(4): 309-18.
- Berti, L., Kellerer, M., Capp, E. and Häring, H.U. (1997). "Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a PI3-kinase mediated effect." *Diabetologia* 40(5): 606-9.
- Billington, C.J., Briggs, J.E., Grace, M. and Levine, A.S. (1991). "Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 260(2): R321-7.
- Bittencourt, J., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J., Vale, W. and Sawchenko, P. (1992). "The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: An immuno- and hybridization histochemical characterization." *The Journal of Comparative Neurology* 319(2): 218-45.
- Bjorbaek, C., Buchholz, R.M., Davis, S.M., Bates, S.H., Pierroz, D.D., Gu, H., Neel, B.G., Myers, M.G., Jr. and Flier, J.S. (2001). "Divergent Roles of SHP-2 in ERK Activation by Leptin Receptors." *J. Biol. Chem.* 276(7): 4747-55.
- Bjorbaek, C., El-Haschimi, K., Frantz, J.D. and Flier, J.S. (1999). "The Role of SOCS-3 in Leptin Signaling and Leptin Resistance." *J. Biol. Chem.* 274(42): 30059-65.

- Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Frantz, J.D., Shoelson, S.E. and Flier, J.S. (1998). "Identification of SOCS-3 as a Potential Mediator of Central Leptin Resistance." *Molecular Cell* 1(4): 619-25.
- Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., Michl, P., Ahima, R.S., van Bueren, A., McCall, A.L. and Flier, J.S. (1998). "Expression of Leptin Receptor Isoforms in Rat Brain Microvessels." *Endocrinology* 139(8): 3485-91.
- Bjorbaek, C., Uotani, S., da Silva, B. and Flier, J.S. (1997). "Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor." *J. Biol. Chem.* 272(51): 32686-95.
- Blevins, J.E., Schwartz, M.W. and 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(1): R87-96.
- Bloch, B., Brazeau, P., Ling, N., Bohlen, P., Esch, F., Wehrenberg, W.B., Benoit, R., Bloom, F. and Guillemin, R. (1983). "Immunohistochemical detection of growth hormone-releasing factor in brain." *Nature* 301(5901): 607-8.
- Boghossian, S., Veyrat-Durebex, C. and Alliot, J. (2000). "Age-related changes in adaptive macronutrient intake in swimming male and female Lou rats." *Physiology & Behavior* 69(3): 231-8.
- Bohlooly-Y, M., Olsson, B., Bruder, C.E.G., Linden, D., Sjogren, K., Bjursell, M., Egecioglu, E., Svensson, L., Brodin, P., Waterton, J.C., Isaksson, O.G.P., Sundler, F., Ahren, B., Ohlsson, C., Oscarsson, J. and Tornell, J. (2005). "Growth Hormone Overexpression in the Central Nervous System Results in Hyperphagia-Induced Obesity Associated With Insulin Resistance and Dyslipidemia." *Diabetes* 54(1): 51-62.
- Bonifacino, J.S. and Traub, L.M. (2003). "SIGNALS FOR SORTING OF TRANSMEMBRANE PROTEINS TO ENDOSOMES AND LYSOSOMES." *Annual Review of Biochemistry* 72(1): 395-447.
- Bonnefont, X., Lacampagne, A., Sanchez-Hormigo, A., Fino, E., Creff, A., Mathieu, M.-N., Smallwood, S., Carmignac, D., Fontanaud, P., Travo, P., Alonso, G., Courtois-Coutry, N., Pincus, S.M., Robinson, I.C.A.F. and Mollard, P. (2005). "Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells." *PNAS* 102(46): 16880-5.

- Bonora, E., Moghetti, P., Zenere, M., Querena, M., Tosi, F., Corgnati, A. and Muggeo, M. (1990). "Plasma concentrations of growth hormone during hyperglycemic clamp with or without somatostatin infusion in obese subjects." *J Clin Endocrinol Metab* 70(6): 1732-4.
- Borowsky, B., Durkin, M.M., Ogozalek, K., Marzabadi, M.R., DeLeon, J., Heurich, R., Lichtblau, H., Shaposhnik, Z., Daniewska, I., Blackburn, T.P., Branchek, T.A., Gerald, C., Vaysse, P.J. and Forray, C. (2002). "Antidepressant, anxiolytic and anorectic effects of a melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonist." *Nat Med* 8(8): 825-30.
- Bouloumie, A., Marumo, T., Lafontan, M.A.X. and Busse, R. (1999). "Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells." *FASEB J.* 13(10): 1231-8.
- Bowers, C.Y. (1998). "Growth hormone-releasing peptide (GHRP)." *Cell Mol Life Sci.* 54: 1316-29.
- Bowers, C.Y., Momany, F., Reynolds, G., Chang, D., Hong A and Chang, K. (1980). "Structure-activity relationships of a synthetic pentapeptide that specifically releases growth hormone in vitro." *Endocrinology* 106: 663-7.
- Brismar, K., Fernqvist-Forbes, E., Wahren, J. and Hall, K. (1994). "Effect of insulin on the hepatic production of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3, and IGF-I in insulin- dependent diabetes." *J Clin Endocrinol Metab* 79(3): 872-8.
- Brodin, L., Low, P. and Shupliakov, O. (2000). "Sequential steps in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis." *Current Opinion in Neurobiology* 10(3): 312-20.
- Brown, K.S., Gentry, R.M. and Rowland, N.E. (1998). "Central injection in rats of [alpha]-melanocyte-stimulating hormone analog: effects on food intake and brain Fos." *Regulatory Peptides* 78(1-3): 89-94.
- Brubaker, P.L., Crivici, A., Izzo, A., Ehrlich, P., Tsai, C.-H. and Drucker, D.J. (1997). "Circulating and Tissue Forms of the Intestinal Growth Factor, Glucagon-Like Peptide-2." *Endocrinology* 138(11): 4837-43.
- Bruhn, T.O., Sutton, S.W., Plotsky, P.M. and Vale, W.W. (1986). "Central administration of corticotropin-releasing factor modulates oxytocin secretion in the rat." *Endocrinology* 119(4): 1558-63.
- Brunani, A., Invitti, C., Dubini, A., Piccoletti, R., Bendinelli, P., Maroni, P., Pezzoli, G., Ramella, G., Calogero, A. and Cavagnini, F. (1995). "Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of SRIH, beta-endorphin, CRH, NPY and GHRH in obese and normal weight subjects." *Int J Obes Relat Metab Disord.* 19(1): 17-21.

- Buono, P., Pasanisi, F., Nardelli, C., Ieno, L., Capone, S., Liguori, R., Finelli, C., Oriani, G., Contaldo, F. and Sacchetti, L. (2005). "Six Novel Mutations in the Proopiomelanocortin and Melanocortin Receptor 4 Genes in Severely Obese Adults Living in Southern Italy." *Clin Chem* 51(8): 1358-64.
- Butler, A.A., Kesteson, R.A., Khong, K., Cullen, M.J., Pelleymounter, M.A., Dekoning, J., Baetscher, M. and Cone, R.D. (2000). "A Unique Metalolic Sysdrone Causes Obesity in the Melanocortin-3 Receptor-Deficient Mouse." *Endocrinology* 141(9): 3518-21.

-C-

- Cai, A. and Hyde, J.F. (1998). "Upregulation of Leptin Receptor Gene Expression in the Anterior Pituitary of Human Growth Hormone-Releasing Hormone Transgenic Mice." *Endocrinology* 139(1): 420-3.
- Cai, X.J., Evans, M.L., Lister, C.A., Leslie, R.A., Arch, J.R.S., Wilson, S. and Williams, G. (2001). "Hypoglycemia Activates Orexin Neurons and Selectively Increases Hypothalamic Orexin-B Levels: Responses Inhibited by Feeding and Possibly Mediated by the Nucleus of the Solitary Tract." *Diabetes* 50(1): 105-12.
- Cai, X.J., Lister, C.A., Buckingham, R.E., Pickavance, L., Wilding, J., Arch, J.R.S., Wilson, S. and Williams, G. (2000). "Down-regulation of orexin gene expression by severe obesity in the rats: studies in Zucker fatty and Zucker diabetic fatty rats and effects of rosiglitazone." *Molecular Brain Research* 77(1): 131-7.
- Cai, X.J., Widdowson, P.S., Harrold, J., Wilson, S., Buckingham, R.E., Arch, J.R., Tadayyon, M., Clapham, J.C., Wilding, J. and Williams, G. (1999). "Hypothalamic orexin expression: modulation by blood glucose and feeding." *Diabetes* 48(11): 2132-7.
- Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.-L., Sinha, M.K. and Considine, R.V. (1996). "Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance." *The Lancet* 348(9021): 159-61.
- Carpentier, J., Sawano, F., Geiger, D., Gorden, P., Perrelet, A. and Orci, L. (1989). "Potassium depletion and hypertonic medium reduce "non-coated" and clathrin-coated pit formation, as well as endocytosis through these two gates." *J Cell Physiol.* 138: 519-26.

- Carro, E., Senaris, R., Considine, R.V., Casanueva, F.F. and Dieguez, C. (1997). "Regulation of in Vivo Growth Hormone Secretion by Leptin." *Endocrinology* 138(5): 2203-10.
- Carro, E., Señarís, R.M., Seoane, L.M., Frohman, L.A., Arimura, A., Casanueva, F. and Diéguez, C. (1999). "Role of Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone and Somatostatin on Leptin-Induced GH Secretion." *Neuroendocrinology* 69: 3-10.
- Carro, E., Seoane, L., Señaris, R., Considine, R., Casanueva, F. and Dieguez, C. (1998). "Interaction between Leptin and Neuropeptide Y on in vivo Growth Hormone Secretion." *Neuroendocrinology* 68: 187-91.
- Carro, E., Seoane, L.M., Senaris, R., Casanueva, F.F. and Dieguez, C. (2000). "Leptin increases in vivo GH responses to GHRH and GH-releasing peptide-6 in food-deprived rats." *Eur J Endocrinol* 142(1): 66-70.
- Carvalho, J.B.C., Siloto, R.M.P., Ignacchitti, I., Brenelli, S.L., Carvalho, C.R.O., Leite, A., Velloso, L.A., Gontijo, J.A.R. and Saad, M.J.A. (2001). "Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus." *FEBS Letters* 500(3): 119-24.
- Casanueva, F. and Dieguez, C. (2005). "Leptin and Ghrelin: What is the Impact on Pituitary Function?" *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 6: 39-45.
- Casanueva, F.F. and Dieguez, C. (1999). "Neuroendocrine Regulation and Actions of Leptin." *Frontiers in Neuroendocrinology* 20(4): 317-63.
- Casanueva, F.F., Villanueva, L., Dieguez, C., Diaz, Y., Cabranes, J.A., Szoke, B., Scanlon, M.F., Schally, A.V. and Fernandez-Cruz, A. (1987). "Free fatty acids block growth hormone (GH) releasing hormone-stimulated GH secretion in man directly at the pituitary." *J Clin Endocrinol Metab* 65(4): 634-42.
- Chalew, S., Lozano, R., Armour, K. and Kowarski, A. (1992). "Reduction of plasma insulin levels does not restore integrated concentration of growth hormone to normal in obese children." *Int J Obes Relat Metab Disord*. 16: 459-63.
- Chan, T.O., Rittenhouse, S.E. and Tsichlis, P.N. (1999). "AKT/PKB AND OTHER D3 PHOSPHOINOSITIDE-REGULATED KINASES: Kinase Activation by Phosphoinositide-Dependent Phosphorylation." *Annual Review of Biochemistry* 68(1): 965-1014.
- Chandrashekar, V., Bartke, A., Coschigano, K.T. and Kopchick, J.J. (1999). "Pituitary and Testicular Function in Growth Hormone Receptor Gene Knockout Mice." *Endocrinology* 140(3): 1082-8.

- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., More, K.J., Breitbart, R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I. and Morgenstern, J.P. (1996). "Evidence That the Diabetes Gene Encodes the Leptin Receptor: Identification of a Mutation in the Leptin Receptor Gene in db/db Mice." *Cell* 84(3): 491-5.
- Chen, N.G., Swick, A.G. and Romsos, D.R. (1997). "Leptin constrains acetylcholine-induced insulin secretion from pancreatic islets of ob/ob mice." *J.Clin.Invest.* 100: 1174-9.
- Chen, S., Kochan, J., Campfield, L., Burn, P. and Smeyne, R. (1999). "Splice variants of the OB receptor gene are differentially expressed in brain and peripheral tissues of mice." *J Recept Signal Transduct Res.* 19: 245-66.
- Chua, J.S.C., Koutras, I.K., Han, L., Liu, S.-M., Kay, J., Young, S.J., Chung, W.K. and Leibel, R.L. (1997). "Fine Structure of the Murine Leptin Receptor Gene: Splice Site Suppression Is Required to Form Two Alternatively Spliced Transcripts." *Genomics* 45(2): 264-70.
- Clark, R.G., Jansson, J.O., Isaksson, O. and Robinson, I.C. (1985). "Intravenous growth hormone: growth responses to patterned infusions in hypophysectomized rats." *J Endocrinol* 104(1): 53-61.
- Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gormelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.-M., Basdevant, A., Bougneres, P., Lebouc, Y., Froguel, P. and Guy-Grand, B. (1998). "A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction." *Nature* 392(6674): 398-401.
- Coleman, D. (1973). "Effects of parabiosis of obese with diabetes and normal mice." *Diabetologia* 9: 294-8.
- Connors, J.M., DeVito, W.J. and Hedge, G.A. (1985). "Effects of food deprivation on the feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of the rat." *Endocrinology* 117(3): 900-6.
- Copeland, K.C. and Nair, K.S. (1994). "Acute growth hormone effects on amino acid and lipid metabolism." *J Clin Endocrinol Metab* 78(5): 1040-7.
- Cordido, F., Peino, R., Penalva, A., Alvarez, C.V., Casanueva, F.F. and Dieguez, C. (1996). "Impaired growth hormone secretion in obese subjects is partially reversed by acipimox-mediated plasma free fatty acid depression." *J Clin Endocrinol Metab* 81(3): 914-8.

- Cordido, F., Penalva, A., Dieguez, C. and Casanueva, F.F. (1993). "Massive growth hormone (GH) discharge in obese subjects after the combined administration of GH-releasing hormone and GHRP-6: evidence for a marked somatotroph secretory capability in obesity." *J Clin Endocrinol Metab* 76(4): 819-23.
- Cordido, F., Penalva, A., Peino, R., Casanueva, F.F. and Dieguez, C. (1995). "Effect of combined administration of growth hormone (GH)-releasing hormone, GH-releasing peptide-6, and pyridostigmine in normal and obese subjects." *Metabolism* 44(6): 745-8.
- Coschigano, K.T., Clemmons, D., Bellush, L.L. and Kopchick, J.J. (2000). "Assessment of Growth Parameters and Life Span of GHR/BP Gene-Disrupted Mice." *Endocrinology* 141(7): 2608-13.
- Couturier, K., Servais, S., Koubi, H., Sempore, B., Sornay-Mayet, M.-H., Cottet-Emard, J.-M., Lavoie, J.-M. and Favier, R. (2002). "Metabolic Characteristics and Body Composition in a Model of Anti-Obese Rats (Lou/C)." *Obesity Res* 10(3): 188-95.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D. and Low, M.J. (2001). "Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus." *Nature* 411(6836): 480-4.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M. and Heiman, M.L. (2003). "The Distribution and Mechanism of Action of Ghrelin in the CNS Demonstrates a Novel Hypothalamic Circuit Regulating Energy Homeostasis." *Neuron* 37(4): 649-61.
- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E. and Weigle, D.S. (2001). "A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans." *Diabetes* 50(8): 1714-9.
- Cunha, S.R. and Mayo, K.E. (2002). "Ghrelin and Growth Hormone (GH) Secretagogues Potentiate GH-Releasing Hormone (GHRH)-Induced Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate Production in Cells Expressing Transfected GHRH and GH Secretagogue Receptors." *Endocrinology* 143(12): 4570-82.

-D-

- Dadke, S. and Chernoff, J. (2003). "Protein-Tyrosine Phosphatase 1B as a Potential Drug Target for Obesity " *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders* 3: 299-304.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E. and Schmid, S.L. (1994). "Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation." *J. Cell Biol.* 127(4): 915-34.
- Date, Y., Murakami, N., Kojima, M., Kuroiwa, T., Matsukura, S., Kangawa, K. and Nakazato, M. (2000). "Central Effects of a Novel Acylated Peptide, Ghrelin, on Growth Hormone Release in Rats." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 275(2): 477-80.
- De Matteis, R., Dashtipour, K., Ognibene, A. and Cinti, S. (1998). "Localization of leptin receptor splice variants in mouse peripheral tissues by immunohistochemistry." *Proc Nutr Soc.* 57: 441-8.
- DeFea, K.A., Zalevsky, J., Thoma, M.S., Dery, O., Mullins, R.D. and Bunnett, N.W. (2000). "{beta}-Arrestin-dependent Endocytosis of Proteinase-activated Receptor 2 Is Required for Intracellular Targeting of Activated ERK1/2." *J. Cell Biol.* 148(6): 1267-82.
- Dempsey, E.C., Newton, A.C., Mochly-Rosen, D., Fields, A.P., Reyland, M.E., Insel, P.A. and Messing, R.O. (2000). "Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(3): L429-38.
- Devos, R., Guisez, Y., Van der Heyden, J., White, D.W., Kalai, M., Fountoulakis, M. and Plaetinck, G. (1997). "Ligand-independent Dimerization of the Extracellular Domain of the Leptin Receptor and Determination of the Stoichiometry of Leptin Binding." *J. Biol. Chem.* 272(29): 18304-10.
- Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F. and Wrana, J.L. (2003). "Distinct endocytic pathways regulate TGF-[beta] receptor signalling and turnover." *Nat Cell Biol* 5(5): 410-21.
- Diano, S., Kalra, S.P. and Horvath, T.L. (1998). "Leptin Receptor Immunoreactivity is Associated with the Golgi Apparatus of Hypothalamic Neurones and Glial Cells." *Journal of Neuroendocrinology* 10(9): 647-50.

- Dickson, S.L. and Luckman, S.M. (1997). "Induction of c-fos Messenger Ribonucleic Acid in Neuropeptide Y and Growth Hormone (GH)-Releasing Factor Neurons in the Rat Arcuate Nucleus Following Systemic Injection of the GH Secretagogue, GH-Releasing Peptide-6." *Endocrinology* 138(2): 771-7.
- Dieguez, C. and Casanueva, F.F. (1995). "Influence of metabolic substrates and obesity on growth hormone secretion." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 6(2): 55-9.
- Dieterich, K. and Lehnert, H. (1998). "Expression of leptin receptor mRNA and the long form splice variant in human anterior pituitary and pituitary adenoma." *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 106: 522-5.
- Dittrich, E., Rose-John, S., Gerhartz, C., Mullberg, J., Stoyan, T., Yasukawa, K., Heinrich, P.C. and Graeve, L. (1994). "Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand- induced endocytosis of the IL-6 receptor." *J. Biol. Chem.* 269(29): 19014-20.
- Drucker, D.J. and Asa, S. (1988). "Glucagon gene expression in vertebrate brain." *J. Biol. Chem.* 263(27): 13475-8.
- Dunn, S.L., Bjornholm, M., Bates, S.H., Chen, Z., Seifert, M. and Myers, M.G., Jr. (2005). "Feedback Inhibition of Leptin Receptor/Jak2 Signaling via Tyr1138 of the Leptin Receptor and Suppressor of Cytokine Signaling 3." *Mol Endocrinol* 19(4): 925-38.
- Dupree, P., Parton, R., Raposo, G., Kurzchalia, T. and Simons, K. (1993). "Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells." *Embo J.* 12: 1597-605.
- Dyer, C.J., Simmons, J.M., Matteri, R.L. and Keisler, D.H. (1997). "Leptin receptor mRNA is expressed in ewe anterior pituitary and adipose tissues and is differentially expressed in hypothalamic regions of well-fed and feed-restricted ewes." *Domestic Animal Endocrinology* 14(2): 119-28.

-E-

- Eckel, R.H., Grundy, S.M. and Zimmet, P.Z. (2005). "The metabolic syndrome." *The Lancet* 365(9468): 1415-28.
- Egawa, M., Yoshimatsu, H. and Bray, G.A. (1991). "Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 260(2): R328-34.

- Egecioglu, E., Bjursell, M., Ljungberg, A., Dickson, S.L., Kopchick, J.J., Bergstrom, G., Svensson, L., Oscarsson, J., Tornell, J. and Bohlooly-Y, M. (2006). "Growth hormone receptor deficiency results in blunted ghrelin feeding response, obesity, and hypolipidemia in mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(2): E317-25.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.-C., Ramachandran, C., Gresser, M.J., Tremblay, M.L. and Kennedy, B.P. (1999). "Increased Insulin Sensitivity and Obesity Resistance in Mice Lacking the Protein Tyrosine Phosphatase-1B Gene." *Science* 283(5407): 1544-8.
- El-Haschimi, K., Pierroz, D.D., Hileman, S.M., Bjorbak, C. and Flier, J.S. (2000). "Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity." *J. Clin. Invest.* 105(12): 1827-32.
- Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R.S., Bjorbaek, C., Flier, J.S., Saper, C.B. and Elmquist, J.K. (1999). "Leptin Differentially Regulates NPY and POMC Neurons Projecting to the Lateral Hypothalamic Area." *Neuron* 23(4): 775-86.
- Elmquist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S. and Saper, C.B. (1998). "Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain." *J Comp Neurol* 395(4): 535-47.
- Eppler, E., Jevdjovic, T., Maake, C. and Reinecke, M. (2007). "Insulin-like growth factor I (IGF-I) and its receptor (IGF-1R) in the rat anterior pituitary." *European Journal of Neuroscience* 25(1): 191-200.

-F-

- Fayadat, L. and Kopito, R.R. (2003). "Recognition of a Single Transmembrane Degron by Sequential Quality Control Checkpoints." *Mol. Biol. Cell* 14(3): 1268-78.
- Fekete, C., Kelly, J., Mihaly, E., Sarkar, S., Rand, W.M., Legradi, G., Emerson, C.H. and Lechan, R.M. (2001). "Neuropeptide Y Has a Central Inhibitory Action on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis." *Endocrinology* 142(6): 2606-13.
- Fekete, C., Sarkar, S., Rand, W.M., Harney, J.W., Emerson, C.H., Bianco, A.C. and Lechan, R.M. (2002). "Agouti-Related Protein (AGRP) Has a Central Inhibitory Action on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis; Comparisons between the Effect of AGRP and Neuropeptide Y on Energy Homeostasis and the HPT Axis." *Endocrinology* 143(10): 3846-53.

- Fekete, C., Singru, P.S., Sanchez, E., Sarkar, S., Christoffolete, M.A., Riberio, R.S., Rand, W.M., Emerson, C.H., Bianco, A.C. and Lechan, R.M. (2006). "Differential Effects of Central Leptin, Insulin, or Glucose Administration during Fasting on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis and Feeding-Related Neurons in the Arcuate Nucleus." *Endocrinology* 147(1): 520-9.
- Finn, P.D., Cunningham, M.J., Pau, K.Y.F., Spies, H.G., Clifton, D.K. and Steiner, R.A. (1998). "The Stimulatory Effect of Leptin on the Neuroendocrine Reproductive Axis of the Monkey." *Endocrinology* 139(11): 4652-62.
- Frenzel, R., Voigt, C. and Paschke, R. (2006). "The Human Thyrotropin Receptor Is Predominantly Internalized by {beta}-Arrestin 2." *Endocrinology* 147(6): 3114-22.
- Fryburg, D. (1994). "Insulin-like growth factor I exerts growth hormone- and insulin-like actions on human muscle protein metabolism." *Am J Physiol.* 267: E331-6.
- Frystyk, J., Vestbo, E., Skjaerbaek, C., Mogensen, C.E. and Orskov, H. (1995). "Free insulin-like growth factors in human obesity." *Metabolism* 44(Supplement 4): 37-44.
- Furuse, M., Matsumoto, M., Mori, R., Sugahara, K., Kano, K. and Hasegawa, S. (1997). "Influence of fasting and neuropeptide Y on the suppressive food intake induced by intracerebroventricular injection of glucagon-like peptide-1 in the neonatal chick." *Brain Research* 764(1-2): 289-92.

-G-

- Gaborik, Z. and Hunyady, L. (2004). "Intracellular trafficking of hormone receptors." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15(6): 286-93.
- Gaidarov, I. and Keen, J.H. (1999). "Phosphoinositide-AP-2 Interactions Required for Targeting to Plasma Membrane Clathrin-coated Pits." *J. Cell Biol.* 146(4): 755-64.
- Gaidarov, I., Santini, F., Warren, R.A. and Keen, J.H. (1999). "Spatial control of coated-pit dynamics in living cells." *Nat Cell Biol* 1(1): 1-7.
- Garcia, A., Alvarez, C.V., Smith, R.G. and Dieguez, C. (2001). "Regulation of PIT-1 Expression By Ghrelin and GHRP-6 Through the GH Secretagogue Receptor." *Mol Endocrinol* 15(9): 1484-95.
- Ge, H., Huang, L., Pourbahrami, T. and Li, C. (2002). "Generation of Soluble Leptin Receptor by Ectodomain Shedding of Membrane-spanning Receptors in Vitro and in Vivo." *J. Biol. Chem.* 277(48): 45898-903.

- Genty, N., Paly, J., Edery, M., Kelly, P.A., Djiane, J. and Salesse, R. (1994). "Endocytosis and degradation of prolactin and its receptor in Chinese hamster ovary cells stably transfected with prolactin receptor cDNA." *Molecular and Cellular Endocrinology* 99(2): 221-8.
- Ghigo, E., Procopio, M., Maccario, M., Bellone, J., Arvat, E., Campana, S., Boghen, M. and Camanni, F. (1993). "Repetitive GHRH administration fails to increase the response to GHRH in obese subjects. Evidence for a somatotrope defect in obesity?" *Horm Metab Res.* 25: 305-8.
- Ghilardi, N. and Skoda, R.C. (1997). "The Leptin Receptor Activates Janus Kinase 2 and Signals for Proliferation in a Factor-Dependent Cell Line." *Mol Endocrinol* 11(4): 393-9.
- Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M.H. and Skoda, R.C. (1996). "Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice." *PNAS* 93(13): 6231-5.
- Girard, N., Boulanger, L., Denis, S. and Gaudreau, P. (1999). "Differential in Vivo Regulation of the Pituitary Growth Hormone-Releasing Hormone (GHRH) Receptor by GHRH in Young and Aged Rats." *Endocrinology* 140(6): 2836-42.
- Giustina, A. and Veldhuis, J.D. (1998). "Pathophysiology of the Neuroregulation of Growth Hormone Secretion in Experimental Animals and the Human." *Endocr Rev* 19(6): 717-97.
- Goldstone, A.P., Morgan, I., Mercer, J.G., Morgan, D.G.A., Moar, K.M., Ghatei, M.A. and Bloom, S.R. (2000). "Effect of Leptin on Hypothalamic GLP-1 Peptide and Brain-Stem Pre-proglucagon mRNA." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269(2): 331-5.
- Gong, D.-W., Bi, S., Pratley, R.E. and Weintraub, B.D. (1996). "Genomic Structure and Promoter Analysis of the Human obese Gene." *J. Biol. Chem.* 271(8): 3971-4.
- Gossard, F., Dihl, F., Pelletier, G., Dubois, P. and Morel, G. (1987). "In situ hybridization to rat brain and pituitary gland of growth hormone cDNA." *Neurosci Lett.* 79: 251-6.
- Gout, I., Dhand, R., Hiles, I.D., Fry, M.J., Panayotou, G., Das, P., Truong, O., Totty, N.F., Hsuan, J. and Booker, G.W. (1993). "The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains." *Cell* 75(1): 25-36.
- Graham, M., Shutter, J.R., Sarmiento, U., Sarosi, I. and Stark, K.L. (1997). "Overexpression of Agtr leads to obesity in transgenic mice." *Nat Genet* 17(3): 273-4.

- Grasso, P., Leinung, M.C., Ingher, S.P. and Lee, D.W. (1997). "In Vivo Effects of Leptin-Related Synthetic Peptides - Localization of Leptin Activity to Domains Between Amino Acid Residues 106-140." *Endocrinology* 138(4): 1413-8.
- Grosshans, B.L., Ortiz, D. and Novick, P. (2006). "Rabs and their effectors: Achieving specificity in membrane traffic." *PNAS* 103(32): 11821-7.
- Gualillo, O., Lago, F., Gomez-Reino, J., Casanueva, F.F. and Dieguez, C. (2003). "Ghrelin, a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action." *FEBS Letters* 552(2-3): 105-9.
- Guan, X.-M., Yu, H., Palyha, O.C., McKee, K.K., Feighner, S.D., Sirinathsinghji, D.J.S., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H.T. and Howard, A.D. (1997). "Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues." *Molecular Brain Research* 48(1): 23-9.
- Guillaume, V., Magnan, E., Cataldi, M., Dutour, A., Sauze, N., Renard, M., Razafindraibe, H., Conte-Devolx, B., Deghenghi, R. and Lenaerts, V. (1994). "Growth hormone (GH)-releasing hormone secretion is stimulated by a new GH-releasing hexapeptide in sheep." *Endocrinology* 135(3): 1073-6.

-H-

- Hakansson, M.-L., Brown, H., Ghilardi, N., Skoda, R.C. and Meister, B. (1998). "Leptin Receptor Immunoreactivity in Chemically Defined Target Neurons of the Hypothalamus." *J. Neurosci.* 18(1): 559-72.
- Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K. and Friedman, J.M. (1995). "Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene." *Science* 269(5223): 543-6.
- Hardie, D.G., Scott, J.W., Pan, D.A. and Hudson, E.R. (2003). "Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system." *FEBS Letters* 546(1): 113-20.
- Harrold, J.A., Williams, G. and Widdowson, P.S. (1999). "Changes in Hypothalamic Agouti-Related Protein (AGRP), but not [alpha]-MSH or Pro-Opiomelanocortin Concentrations in Dietary-Obese and Food-Restricted Rats." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258(3): 574-7.
- Harvey, S., Scanes, C.G. and Daughaday, W. (1994). "Growth Hormone." *CRC Press*.

- Haynes, A.C., Jackson, B., Overend, P., Buckingham, R.E., Wilson, S., Tadayyon, M. and Arch, J.R.S. (1999). "Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat." *Peptides* 20(9): 1099-105.
- He, Y., Chen, H., Quon, M.J. and Reitman, M. (1995). "The Mouse obese Gene." *J. Biol. Chem.* 270(48): 28887-91.
- Henley, J.R., Krueger, E.W.A., Oswald, B.J. and McNiven, M.A. (1998). "Dynamin-mediated Internalization of Caveolae." *J. Cell Biol.* 141(1): 85-99.
- Hennige, A.M., Stefan, N., Kapp, K., Lehmann, R., Weigert, C., Beck, A., Moeschel, K., Mushack, J., Schleicher, E. and Haring, H.-U. (2006). "Leptin down-regulates insulin action through phosphorylation of serine-318 in insulin receptor substrate 1." *FASEB J.*: fj.05-4635fje.
- Hervey, G. (1959). "The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats." *J Physiol (Lond)* 145: 336–52.
- Hervey, G.R. (1969). "Regulation of Energy Balance." *Nature* 222(5194): 629-31.
- Hetherington, A. and Ranson, S. (1942). "The spontaneous activity and food intake of rats with hypothalamic lesions." *Am J Physiol* 136: 609–17.
- Hewson, A.K., Tung, L.Y.C., Connell, D.W., Tookman, L. and Dickson, S.L. (2002). "The Rat Arcuate Nucleus Integrates Peripheral Signals Provided by Leptin, Insulin, and a Ghrelin Mimetic." *Diabetes* 51(12): 3412-9.
- Hileman, S.M., Pierroz, D.D., Masuzaki, H., Bjorbak, C., El-Haschimi, K., Banks, W.A. and Flier, J.S. (2002). "Characterization of Short Isoforms of the Leptin Receptor in Rat Cerebral Microvessels and of Brain Uptake of Leptin in Mouse Models of Obesity." *Endocrinology* 143(3): 775-83.
- Hileman, S.M., Tornoe, J., Flier, J.S. and Bjorbak, C. (2000). "Transcellular Transport of Leptin by the Short Leptin Receptor Isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney Cells." *Endocrinology* 141(6): 1955-61.
- Hinshaw, J.E. (2000). "DYNAMIN AND ITS ROLE IN MEMBRANE FISSION." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16(1): 483-519.
- Hisano, S., Tsuruo, Y., Kagotani, Y., Daikoku, S. and Chihara, K. (1990). "Immunohistochemical evidence for synaptic connections between neuropeptide Y-containing axons and periventricular somatostatin neurons in the anterior hypothalamus in rats." *Brain Res.* 520: 170-7.

- Hoggard, N., Mercer, J.G., Rayner, D.V., Moar, K., Trayhurn, P. and Williams, L.M. (1997). "Localization of Leptin Receptor mRNA Splice Variants in Murine Peripheral Tissues by RT-PCR and in Situ Hybridization." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 232(2): 383-7.
- Hojvatb, H., Bakerb, G., Kirsteinsb, L. and Lawrence, A. (1982). "Growth hormone (GH) immunoreactivity in the rodent and primate CNS: Distribution, characterization and presence posthypophysectomy " *Brain Research* 239: 543-57.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Geloën, A., Even, P.C., Cervera, P. and Le Bouc, Y. (2003). "IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice." *Nature* 421(6919): 182-7.
- Horgan, A.M. and Stork, P.J.S. (2003). "Examining the mechanism of Erk nuclear translocation using green fluorescent protein." *Experimental Cell Research* 285(2): 208-20.
- Horvath, T.L., Diano, S., Sotonyi, P., Heiman, M. and Tschop, M. (2001). "Minireview: Ghrelin and the Regulation of Energy Balance--A Hypothalamic Perspective." *Endocrinology* 142(10): 4163-9.
- Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberators, P.A., Rosenblum, C.I., Hamelin, M., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., Anderson, J., Paress, P.S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K.K., McKee, K.K., Pong, S.-S., Chaung, L.-Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., Heavens, R., Rigby, M., Sirinathsinghji, D.J.S., Dean, D.C., Melillo, D.G., Patchett, A.A., Nargund, R., Griffin, P.R., DeMartino, J.A., Gupta, S.K., Schaeffer, J.M., Smith, R.G. and Van der Ploeg, L.H.T. (1996). "A Receptor in Pituitary and Hypothalamus That Functions in Growth Hormone Release." *Science* 273(5277): 974-7.
- Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzamelis, I., Bjorbaek, C. and Flier, J.S. (2004). "Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3." *Nat Med* 10(7): 734-8.
- Huang, Q., Rivest, R. and Richard, D. (1998). "Effects of Leptin on Corticotropin-Releasing Factor (CRF) Synthesis and CRF Neuron Activation in the Paraventricular Hypothalamic Nucleus of Obese (ob/ob) Mice." *Endocrinology* 139(4): 1524-32.
- Huff, R. (1950). "Nature of exchange in parabiotic rats." *Am J Physiol* 161: 56-74.

- Hussain, M., Schmitz, O., Mengel, A., Glatz, Y., Christiansen, J., Zapf, J. and Froesch, E. (1994). "Comparison of the effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on substrate oxidation and on insulin sensitivity in growth hormone-deficient humans." *J Clin Invest.* 94: 1126-33.
- Hwang, C.-S., Mandrup, S., MacDougald, O.A., Geiman, D.E. and Lane, M.D. (1996). "Transcriptional activation of the mouse obese (ob) gene by CCAAT/enhancer binding protein alpha." *PNAS* 93(2): 873-7.

-I-

- Ihle, J.N. and Kerr, I.M. (1995). "Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily." *Trends in Genetics* 11(2): 69-74.
- Ilondo, M.M., Courtoy, P.J., Geiger, D., Carpentier, J.-L., Rousseau, G.G. and Meyts, P.D. (1986). "Intracellular Potassium Depletion in IM-9 Lymphocytes Suppresses the Slowly Dissociating Component of Human Growth Hormone Binding and the Down-Regulation of Its Receptors but Does not Affect Insulin Receptors." *PNAS* 83(17): 6460-4.
- Imaki, T., Shibasaki, T., Masuda, A., Hotta, M., Yamauchi, N., Demura, H., Shizume, K., Wakabayashi, I. and N., L. (1986). "The effect of glucose and free fatty acids on growth hormone (GH)-releasing factor-mediated GH secretion in rats." *Endocrinology* 118: 2390.
- Imaki, T., Shibasaki, T., Shizume, K., Masuda, A., Hotta, M., Kiyosawa, Y., Jibiki, K., Demura, H., Tsushima, T. and Ling, N. (1985). "The effect of free fatty acids on growth hormone (GH)-releasing hormone- mediated GH secretion in man." *J Clin Endocrinol Metab* 60(2): 290-3.
- Iqbal, J., Kurose, Y., Canny, B. and Clarke, I.J. (2006). "Effects of Central Infusion of Ghrelin on Food Intake and Plasma Levels of Growth Hormone, Luteinizing Hormone, Prolactin, and Cortisol Secretion in Sheep." *Endocrinology* 147(1): 510-9.
- Iqbal, J., Pompolo, S., Considine, R.V. and Clarke, I.J. (2000). "Localization of Leptin Receptor-Like Immunoreactivity in the Corticotropes, Somatotropes, and Gonadotropes in the Ovine Anterior Pituitary." *Endocrinology* 141(4): 1515-20.

Isse, N., Ogawa, Y., Tamura, N., Masuzaki, H., Mori, K., Okazaki, T., Satoh, N., Shigemoto, M., Yoshimasa, Y., Nishi, S., Hosoda, K., Inazawa, J. and Nakao, K. (1995). "Structural Organization and Chromosomal Assignment of the Human obese Gene." *J. Biol. Chem.* 270(46): 27728-33.

-J-

- Jacobowitz, D., Schulte, H., Chrousos, G. and Loriaux, D. (1983). "Localization of GRF-like immunoreactive neurons in the rat brain." *Peptides* 4: 521-4.
- Janowski, B.A., Ling, N.C., Giustina, A. and Wehrenberg, W.B. (1993). "Hypothalamic regulation of growth hormone secretion during food deprivation in the rat." *Life Sciences* 52: 891.
- Jiang, X. and Sorkin, A. (2002). "Coordinated Traffic of Grb2 and Ras during Epidermal Growth Factor Receptor Endocytosis Visualized in Living Cells." *Mol. Biol. Cell* 13(5): 1522-35.
- Jin, L., Burguera, B.G., Couce, M.E., Scheithauer, B.W., Lamsan, J., Eberhardt, N.L., Kulig, E. and Lloyd, R.V. (1999). "Leptin and Leptin Receptor Expression in Normal and Neoplastic Human Pituitary: Evidence of a Regulatory Role for Leptin on Pituitary Cell Proliferation." *J Clin Endocrinol Metab* 84(8): 2903-11.
- Jin, L., Zhang, S., Burguera, B.G., Couce, M.E., Osamura, R.Y., Kulig, E. and Lloyd, R.V. (2000). "Leptin and Leptin Receptor Expression in Rat and Mouse Pituitary Cells." *Endocrinology* 141(1): 333-9.
- Jureus, A., Cunningham, M.J., Li, D., Johnson, L.L., Krasnow, S.M., Teklemichael, D.N., Clifton, D.K. and Steiner, R.A. (2001). "Distribution and Regulation of Galanin-Like Peptide (GALP) in the Hypothalamus of the Mouse." *Endocrinology* 142(12): 5140-4.
- Jureus, A., Cunningham, M.J., McClain, M.E., Clifton, D.K. and Steiner, R.A. (2000). "Galanin-Like Peptide (GALP) Is a Target for Regulation by Leptin in the Hypothalamus of the Rat." *Endocrinology* 141(7): 2703-6.

-K-

- Kakuma, T., Lee, Y., Higa, M., Wang, Z.-w., Pan, W., Shimomura, I. and Unger, R.H. (2000). "Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets." *PNAS* 97(15): 8536-41.
- Kalra, S.P., Bagnasco, M., Otukonyong, E.E., Dube, M.G. and Kalra, P.S. (2003). "Rhythmic, reciprocal ghrelin and leptin signaling: new insight in the development of obesity." *Regulatory Peptides* 111(1-3): 1-11.
- Kamegai, J., Tamura, H., Ishii, S., Sugihara, H. and Wakabayashi, I. (2001). "Thyroid Hormones Regulate Pituitary Growth Hormone Secretagogue Receptor Gene Expression." *Journal of Neuroendocrinology* 13(3): 275-8.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H. and Wakabayashi, I. (2000). "Central Effect of Ghrelin, an Endogenous Growth Hormone Secretagogue, on Hypothalamic Peptide Gene Expression." *Endocrinology* 141(12): 4797-800.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H. and Wakabayashi, I. (2001). "Chronic Central Infusion of Ghrelin Increases Hypothalamic Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein mRNA Levels and Body Weight in Rats." *Diabetes* 50(11): 2438-43.
- Kamegai, J., Wakabayashi, I., Miyamoto, K., Unterman, T., Kineman, R. and Frohman, L. (1998). "Growth Hormone-Dependent Regulation of Pituitary GH Secretagogue Receptor (GHS-R) mRNA Levels in the Spontaneous Dwarf Rat. ." *Neuroendocrinology*. 68: 312-8.
- Kappeler, L., Zizzari, P., Alliot, J., Epelbaum, J. and Bluet-Pajot, M. (2004). "Delayed Age-Associated Decrease in Growth Hormone Pulsatile Secretion and Increased Orexigenic Peptide Expression in the Lou C/Jall Rat." *Neuroendocrinology*. 80: 273-83.
- Kappeler, L., Zizzari, P., Grouselle, D., Epelbaum, J. and Bluet-Pajot, M.T. (2004). "Plasma and Hypothalamic Peptide-Hormone Levels Regulating Somatotroph Function and Energy Balance in Fed and Fasted States: A Comparative Study in Four Strains of Rats." *Journal of Neuroendocrinology* 16(12): 980-8.
- Kastin, A.J. and Akerstrom, V. (2000). "Fasting, but not adrenalectomy, reduces transport of leptin into the brain." *Peptides* 21(5): 679-82.

- Kastin, A.J., Akerstrom, V. and Pan, W. (2000). "Activation of urocortin transport into brain by leptin." *Peptides* 21(12): 1811-7.
- Kaszubska, W., Falls, H.D., Schaefer, V.G., Haasch, D., Frost, L., Hessler, P., Kroeger, P.E., White, D.W., Jirousek, M.R. and Trevillyan, J.M. (2002). "Protein tyrosine phosphatase 1B negatively regulates leptin signaling in a hypothalamic cell line." *Molecular and Cellular Endocrinology* 195(1-2): 109-18.
- Katsuki, A., Sumida, Y., Gabazza, E.C., Murashima, S., Tanaka, T., Furuta, M., Araki-Sasaki, R., Hori, Y., Nakatani, K., Yano, Y. and Adachi, Y. (2001). "Plasma Levels of Agouti-Related Protein Are Increased in Obese Men." *J Clin Endocrinol Metab* 86(5): 1921-4.
- Katzmann, D., Odorizzi, G. and Emr, S. (2002). "Receptor Downregulation and Multivesicular-Body Sorting." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 893-905.
- Kelly, K.L. and Ruderman, N.B. (1993). "Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase. Association with a 185-kDa tyrosine-phosphorylated protein (IRS-1) and localization in a low density membrane vesicle." *J. Biol. Chem.* 268(6): 4391-8.
- Kennedy, G. (1953). "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat." *Proc R Soc London* 140: 578-92.
- Kessell, I., Holst, B.D. and Roth, T.F. (1989). "Membranous Intermediates in Endocytosis are Labile, as Shown in a Temperature-Sensitive Mutant." *PNAS* 86(13): 4968-72.
- Kim, M.S., Small, C.J., Stanley, S.A., Morgan, D.G.A., Seal, L.J., Kong, W.M., Edwards, C.M.B., Abusnana, S., Sunter, D., Ghatei, M.A. and Bloom, S.R. (2000). "The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin." *J. Clin. Invest.* 105(7): 1005-11.
- Kim, Y.-B., Uotani, S., Pierroz, D.D., Flier, J.S. and Kahn, B.B. (2000). "In Vivo Administration of Leptin Activates Signal Transduction Directly in Insulin-Sensitive Tissues: Overlapping but Distinct Pathways from Insulin." *Endocrinology* 141(7): 2328-39.
- Kimura, K., Tsuda, K., Baba, A., Kawabe, T., Boh-oka, S.-i., Ibata, M., Moriwaki, C., Hano, T. and Nishio, I. (2000). "Involvement of Nitric Oxide in Endothelium-Dependent Arterial Relaxation by Leptin." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273(2): 745-9.

- Kineman, R.D., Kamegai, J. and Frohman, L.A. (1999). "Growth Hormone (GH)-Releasing Hormone (GHRH) and the GH Secretagogue (GHS), L692,585, Differentially Modulate Rat Pituitary GHS Receptor and GHRH Receptor Messenger Ribonucleic Acid Levels." *Endocrinology* 140(8): 3581-6.
- King, C., Guo, N., Frampton, G.M., Gerry, N.P., Lenburg, M.E. and Rosenberg, C.L. (2005). "Reliability and Reproducibility of Gene Expression Measurements Using Amplified RNA from Laser-Microdissected Primary Breast Tissue with Oligonucleotide Arrays." *J Mol Diagn* 7(1): 57-64.
- Kirchhausen, T. (1999). "ADAPTORS FOR CLATHRIN-MEDIATED TRAFFIC." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15(1): 705-32.
- Kirchhausen, T. (2000). "CLATHRIN." *Annual Review of Biochemistry* 69(1): 699-727.
- Kishimoto, T., Taga, T. and Akira, S. (1994). "Cytokine signal transduction." *Cell* 76(2): 253-62.
- Kiyama, H. and Emson, P. (1990). "Distribution of somatostatin mRNA in the rat nervous system as visualized by a novel non-radioactive in situ hybridization histochemistry procedure." *Neuroscience* 38: 223-44.
- Kloek, C., Haq, A.K., Dunn, S.L., Lavery, H.J., Banks, A.S. and Myers, M.G., Jr. (2002). "Regulation of Jak Kinases by Intracellular Leptin Receptor Sequences." *J. Biol. Chem.* 277(44): 41547-55.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H. and Kangawa, K. (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature* 402(6762): 656-60.
- Kolaczynski, J.W., Nyce, M.R., Considine, R.V., Boden, G., Nolan, J.J., Henry, R., Mudaliar, S.R., Olefsky, J. and Caro, J.F. (1996). "Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro." *Diabetes* 45(5): 699-701.
- Kopelman, P., Noonan, K., Goulton, R. and Forrest, A. (1985). "Impaired growth hormone response to growth hormone releasing factor and insulin-hypoglycaemia in obesity." *Clin Endocrinol (Oxf)*. 23: 87-94.
- Korbonits, M., Bustin, S.A., Kojima, M., Jordan, S., Adams, E.F., Lowe, D.G., Kangawa, K. and Grossman, A.B. (2001). "The Expression of the Growth Hormone Secretagogue Receptor Ligand Ghrelin in Normal and Abnormal Human Pituitary and Other Neuroendocrine Tumors." *J Clin Endocrinol Metab* 86(2): 881-7.
- Korbonits, M., Goldstone, A.P., Gueorguiev, M. and Grossman, A.B. (2004). "Ghrelin--a hormone with multiple functions." *Frontiers in Neuroendocrinology* 25(1): 27-68.

- Korbonits, M., Trainer, P., Little, J., Edwards, R., Kopelman, P., Besser, G., Svec, F. and Grossman, A. (1997). "Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity." *Clinical Endocrinology* 46: 751-7.
- Korytko, A. and Cuttler, L. (1997). "Thyroid hormone and glucocorticoid regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression." *J Endocrinol.* 152: R13-7.
- 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. and Hastrup, S. (1998). "Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin." *Nature* 393(6680): 72-6.
- Kusari, J., Kenner, K.A., Suh, K.I., Hill, D.E. and Henry, R.R. (1994). "Skeletal muscle protein tyrosine phosphatase activity and tyrosine phosphatase 1B protein content are associated with insulin action and resistance." *J.Clin.Invest.* 93: 1156–62.

-L-

- Lam, N.T., Covey, S.D., Lewis, J.T., Oosman, S., Webber, T., Hsu, E.C., Cheung, A.T. and Kieffer, T.J. (2006). "Leptin resistance following over-expression of protein tyrosine phosphatase 1B in liver." *J Mol Endocrinol* 36(1): 163-74.
- Lania, L., Magello, B. and De Luca, P. (1997). "Transcriptional Regulation by the Sp Family Proteins." *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 29(12): 1313-23.
- Larsen, P.J., Vrang, N., Petersen, P.C. and Kristensen, P. (2000). "Chronic Intracerebroventricular Administration of Recombinant CART(42-89) Peptide Inhibits Food Intake and Causes Weight Loss in Lean and Obese Zucker (fa/fa) Rats." *Obesity Res* 8(8): 590-6.
- Lee, G.-H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I. and Friedman, J.M. (1996). "Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice." *Nature* 379(6566): 632-5.
- Lee, Y., Wang, M.-Y., Kakuma, T., Wang, Z.-W., Babcock, E., McCorkle, K., Higa, M., Zhou, Y.-T. and Unger, R.H. (2001). "Liporegulation in Diet-induced Obesity. THE ANTISTEATOTIC ROLE OF HYPERLEPTINEMIA." *J. Biol. Chem.* 276(8): 5629-35.

- Lefrancois, L., Boulanger, L. and Gaudreau, P. (1995). "Effects of aging on pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites: in vitro mimicry by guanyl nucleotides and reducing agents." *Brain Research* 673(1): 39-46.
- Leof, E.B. (2000). "Growth factor receptor signalling: location, location, location." *Trends in Cell Biology* 10(8): 343-8.
- Levin, B.E., Dunn-Meynell, A.A., Ricci, M.R. and Cummings, D.E. (2003). "Abnormalities of leptin and ghrelin regulation in obesity-prone juvenile rats." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(5): E949-57.
- Levin, B.E., Triscari, J. and Sullivan, A.C. (1983). "Altered sympathetic activity during development of diet-induced obesity in rat." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 244(3): R347-55.
- Levin, I., Cohen, J., Supino-Rosin, L., Yoshimura, A., Watowich, S.S. and Neumann, D. (1998). "Identification of a cytoplasmic motif in the erythropoietin receptor required for receptor internalization." *FEBS Letters* 427(2): 164-70.
- Levine, A.S., Kneip, J., Grace, M. and Morley, J.E. (1983). "Effect of centrally administered neurotensin on multiple feeding paradigms." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 18(1): 19-23.
- Levy, D.E. and Darnell, J.E. (2002). "STATS: TRANSCRIPTIONAL CONTROL AND BIOLOGICAL IMPACT." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(9): 651-62.
- Li, C. and Evans, H. (1944). "The isolation of pituitary growth hormone." *Science* 99: 183-4.
- Li, C. and Friedman, J.M. (1999). "Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction." *PNAS* 96(17): 9677-82.
- Li, C., Ioffe, E., Fidahusein, N., Connolly, E. and Friedman, J.M. (1998). "Absence of Soluble Leptin Receptor in Plasma from dbPas/dbPas and Other db/db Mice." *J. Biol. Chem.* 273(16): 10078-82.
- Li, S., Song, K.S. and Lisanti, M.P. (1996). "Expression and Characterization of Recombinant Caveolin." *J. Biol. Chem.* 271(1): 568-73.
- Licinio, J., Mantzoros, C., Negrão, A., Cizza, G., Wong, M., Bongiorno, P., Chrousos, G., Karp, B., Allen, C., Flier, J. and Gold, P. (1997). "Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function " *Nature Medecine* 3: 575-9.
- Lin, J., Barb, C.R., Kraeling, R.R. and Rampacek, G.B. (2003). "Growth hormone releasing factor decreases long form leptin receptor expression in porcine anterior pituitary cells." *Domestic Animal Endocrinology* 24(2): 95-101.

- Lin, J., Barb, C.R., Matteri, R.L., Kraeling, R.R., Chen, X., Meinersmann, R.J. and Rampacek, G.B. (2000). "Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig." *Domestic Animal Endocrinology* 19(1): 53-61.
- Lin, S., Storlien, L.H. and Huang, X.-F. (2000). "Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain." *Brain Research* 875(1-2): 89-95.
- Liu, P., Rudick, M. and Anderson, R.G.W. (2002). "Multiple Functions of Caveolin-1." *J. Biol. Chem.* 277(44): 41295-8.
- Liu, X.H., Morris, R., Spiller, D., White, M. and Williams, G. (2001). "Orexin A Preferentially Excites Glucose-Sensitive Neurons in the Lateral Hypothalamus of the Rat In Vitro." *Diabetes* 50(11): 2431-7.
- Lobie, P.E., Mertani, H., Morel, G., Morales-Bustos, O., Norstedt, G. and Waters, M.J. (1994). "Receptor-mediated nuclear translocation of growth hormone." *J. Biol. Chem.* 269(33): 21330-9.
- Lobie, P.E., Sadir, R., Graichen, R., Mertani, H.C. and Morel, G. (1999). "Caveolar Internalization of Growth Hormone." *Experimental Cell Research* 246(1): 47-55.
- Loche, S., Cambiaso, P., Carta, D., Setzu, S., Imbimbo, B.P., Borrelli, P., Pintor, C. and Cappa, M. (1995). "The growth hormone-releasing activity of hexarelin, a new synthetic hexapeptide, in short normal and obese children and in hypopituitary subjects." *J Clin Endocrinol Metab* 80(2): 674-8.
- Lodish, H.F. (1988). "Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi. A rate-limiting step in protein maturation and secretion." *J. Biol. Chem.* 263(5): 2107-10.
- Lu, D., Willard, D., Patel, I.R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R.P., Wilkison, W.O. and Cone, R.D. (1994). "Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor." *Nature* 371(6500): 799-802.
- Ludwig, D.S., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J.S. and Maratos-Flier, E. (2001). "Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance." *J. Clin. Invest.* 107(3): 379-86.
- Lundin, A., Rondahl, H., Walum, E. and Wilcke, M. (2000). "Expression and intracellular localization of leptin receptor long isoform-GFP chimera." *Biochim Biophys Acta.* 1499: 130-8.

- Luque, R.M., Gahete, M., Valentine, R. and Kineman, R. (2006). "Examination of the direct effects of metabolic factors on somatotrope function in a non-human primate model, *Papio anubis*." *J Mol Endocrinol*. 37: 25-38.
- Luque, R.M., Huang, Z.H., Shah, B., Mazzone, T. and Kineman, R.D. (2006). "Effects of leptin replacement on hypothalamic-pituitary growth hormone (GH) -axis function and circulating ghrelin levels in ob/ob mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab*: 00258.2006.
- Luque, R.M. and Kineman, R.D. (2006). "Impact of Obesity on the Growth Hormone Axis: Evidence for a Direct Inhibitory Effect of Hyperinsulinemia on Pituitary Function." *Endocrinology* 147(6): 2754-63.
- Luque, R.M., Kineman, R.D., Park, S., Peng, X.-D., Gracia-Navarro, F., Castano, J.P. and Malagon, M.M. (2004). "Homologous and Heterologous Regulation of Pituitary Receptors for Ghrelin and Growth Hormone-Releasing Hormone." *Endocrinology* 145(7): 3182-9.

-M-

- M. Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P.A. and Friedman, J.M. (1995). "Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects " *Nature Medecine* 1: 1155-61.
- Maccario, M., Grottoli, S., Procopio, M., Oleandri, S., Rossetto, R., Gauna, C., Arvat, E. and Ghigo, E. (2000). "The GH/IGF-I axis in obesity: influence of neuro-endocrine and metabolic factors." *Int J Obes* 24 S2: S96-S9.
- Makimura, H., Mizuno, T., Mastaitis, J., Agami, R. and Mobbs, C. (2002). "Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake." *BMC Neuroscience* 3(1): 18.
- Mantzoros, C., Flier, J.S., Lesem, M.D., Brewerton, T.D. and Jimerson, D.C. (1997). "Cerebrospinal Fluid Leptin in Anorexia Nervosa: Correlation with Nutritional Status and Potential Role in Resistance to Weight Gain." *J Clin Endocrinol Metab* 82(6): 1845-51.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. and Hill, R. (2002). "Leptin: a review of its peripheral actions and interactions " *Int J Obes*. 26(11): 1407-33.

- Marsh, D.J., Weingarh, D.T., Novi, D.E., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Guan, X.-M., Jiang, M.M., Feng, Y., Camacho, R.E., Shen, Z., Frazier, E.G., Yu, H., Metzger, J.M., Kuca, S.J., Shearman, L.P., Gopal-Truter, S., MacNeil, D.J., Strack, A.M., MacIntyre, D.E., Van der Ploeg, L.H.T. and Qian, S. (2002). "Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism." *PNAS* 99(5): 3240-5.
- Masuda, A., Shibasaki, T., Nakahara, M., Imaki, T., Kiyosawa, Y., Jibiki, K., Demura, H., Shizume, K. and Ling, N. (1985). "The effect of glucose on growth hormone (GH)-releasing hormone-mediated GH secretion in man." *J Clin Endocrinol Metab* 60(3): 523-6.
- Matsumoto, Y., Watanabe, T., Adachi, Y., Itoh, T., Ohtaki, T., Onda, H., Kurokawa, T., Nishimura, O. and Fujino, M. (2002). "Galanin-like peptide stimulates food intake in the rat." *Neuroscience Letters* 322(1): 67-9.
- Maxfield, F. and McGraw, T. (2004). "ENDOCYTIC RECYCLING." *NATURE REVIEWS MOLECULAR CELL BIOLOGY* 5: 121.
- McCowen, K.C., Chow, J.C. and Smith, R.J. (1998). "Leptin Signaling in the Hypothalamus of Normal Rats in Vivo." *Endocrinology* 139(11): 4442-7.
- McPherson, P.S., Kay, B.K. and Hussain, N.K. (2001). "Signaling on the Endocytic Pathway." *Traffic* 2(6): 375-84.
- Mercer, J., Lawrence, C. and Atkinson, T. (1996). "Regulation of galanin gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of the obese Zucker rat by manipulation of dietary macronutrients." *Brain Res Mol Brain Res.* 43: 202-8.
- Merchenthaler, I., Lopez, F.J. and Negro-Vilar, A. (1993). "Anatomy and physiology of central galanin-containing pathways." *Progress in Neurobiology* 40(6): 711-69.
- Mertani, H.C., Raccurt, M., Abbate, A., Kindblom, J., Tornell, J., Billestrup, N., Usson, Y., Morel, G. and Lobie, P.E. (2003). "Nuclear Translocation and Retention of Growth Hormone." *Endocrinology* 144(7): 3182-95.
- Miki, N., Ono, M., Murata, Y., Ohsaki, E., Tamitsu, K., Ri, T., Demura, H. and Yamada, M. (1995). "Thyroid Hormone Regulation of Gene Expression of the Pituitary Growth Hormone-Releasing Factor Receptor." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 217(3): 1087-93.
- Miller, S.G., De Vos, P., Guerre-Millo, M., Wong, K., Hermann, T., Staels, B., Briggs, M.R. and Auwerx, J. (1996). "The adipocyte specific transcription factor C/EBPalpha modulates human ob gene expression." *PNAS* 93(11): 5507-11.

- Miller, W.E. and Lefkowitz, R.J. (2001). "Expanding roles for [beta]-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking." *Current Opinion in Cell Biology* 13(2): 139-45.
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.-B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Foulfelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M.J., Stuck, B.J. and Kahn, B.B. (2004). "AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus." *Nature* 428(6982): 569-74.
- Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O.D., Fryer, L.G.D., Muller, C., Carling, D. and Kahn, B.B. (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." *Nature* 415(6869): 339-43.
- Mitchell, P.J., Wang, C. and Tjian, R. (1987). "Positive and negative regulation of transcription in vitro: Enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen." *Cell* 50(6): 847-61.
- Mitchell, S.E., Nogueiras, R., Rance, K., Rayner, D.V., Wood, S., Dieguez, C. and Williams, L.M. (2006). "Circulating hormones and hypothalamic energy balance: regulatory gene expression in the Lou/C and Wistar rats." *J Endocrinol* 190(3): 571-9.
- Mizuno, I., Okimura, Y., Takahashi, Y., Kaji, H., Abe, H. and Chihara, K. (1999). "Leptin stimulates basal and GHRH-induced GH release from cultured rat anterior pituitary cells in vitro." *Kobe J Med Sci.* 45: 221-7.
- Mizuno, T.M., Kleopoulos, S.P., Bergen, H.T., Roberts, J.L., Priest, C.A. and Mobbs, C.V. (1998). "Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin." *Diabetes* 47(2): 294-7.
- Mizuno, T.M., Makimura, H., Silverstein, J., Roberts, J.L., Lopingco, T. and Mobbs, C.V. (1999). "Fasting Regulates Hypothalamic Neuropeptide Y, Agouti-Related Peptide, and Proopiomelanocortin in Diabetic Mice Independent of Changes in Leptin or Insulin." *Endocrinology* 140(10): 4551-7.
- Mondal, M.S., Nakazato, M. and Matsukura, S. (2002). "Characterization of orexins (hypocretins) and melanin-concentrating hormone in genetically obese mice." *Regulatory Peptides* 104(1-3): 21-5.
- Morash, B., Imran, A., Wilkinson, D., Ur, E. and Wilkinson, M. (2003). "Leptin receptors are developmentally regulated in rat pituitary and hypothalamus." *Molecular and Cellular Endocrinology* 210(1-2): 1-8.

- Morash, B., Li, A., Murphy, P.R., Wilkinson, M. and Ur, E. (1999). "Leptin Gene Expression in the Brain and Pituitary Gland." *Endocrinology* 140(12): 5995-8.
- Morash, B., Wilkinson, D., Murphy, P., Ur, E. and Wilkinson, M. (2001). "Developmental regulation of leptin gene expression in rat brain and pituitary." *Molecular and Cellular Endocrinology* 185(1-2): 151-9.
- Morel, G., Gallego, R., Boulanger, L., Pintos, E., Garcia-Caballero, T. and Gaudreau, P. (1999). "Restricted presence of the growth hormone-releasing hormone receptor to somatotropes in rat and human pituitaries." *Neuroendocrinology*. 70: 128-36.
- Morel, G., Leroux, P. and Pelletier, G. (1985). "Ultrastructural autoradiographic localization of somatostatin-28 in the rat pituitary gland." *Endocrinology* 116(4): 1615-20.
- Morris, S.M. and Cooper, J.A. (2001). "Disabled-2 Colocalizes with the LDLR in Clathrin-Coated Pits and Interacts with AP-2." *Traffic* 2(2): 111-23.
- Morrison, C.D., Morton, G.J., Niswender, K.D., Gelling, R.W. and Schwartz, M.W. (2005). "Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(6): E1051-7.
- Morton, N.M., Emilsson, V., de Groot, P., Pallett, A.L. and Cawthorne, M.A. (1999). "Leptin signalling in pancreatic islets and clonal insulin-secreting cells." *J Mol Endocrinol* 22(2): 173-84.
- Morton, N.M., Emilsson, V., Liu, Y.-L. and Cawthorne, M.A. (1998). "Leptin Action in Intestinal Cells." *J. Biol. Chem.* 273(40): 26194-201.
- Muglia, L., Jacobson, L., Dikkes, P. and Majzoub, J.A. (1995). "Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need." *Nature* 373(6513): 427-32.
- Muller, M.B., Keck, M.E., Zimmermann, S., Holsboer, F. and Wurst, W. (2000). "Disruption of feeding behavior in CRH receptor I-deficient mice is dependent on glucocorticoids." *Neuroreport* 11: 1963-6.
- Munzberg, H. and Myers, M.G. (2005). "Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance." *Nat Neurosci* 8(5): 566-70.
- Murakami, T., Yamashita, T., Iida, M., Kuwajima, M. and Shima, K. (1997). "A Short Form of Leptin Receptor Performs Signal Transduction." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 231(1): 26-9.

Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D. and Lassar, A.B. (1989). "Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence." *Cell* 58(3): 537-44.

-N-

Nahon, J.L., Presse, F., Bittencourt, J.C., Sawchenko, P.E. and Vale, W. (1989). "The rat melanin-concentrating hormone messenger ribonucleic acid encodes multiple putative neuropeptides coexpressed in the dorsolateral hypothalamus." *Endocrinology* 125(4): 2056-65.

Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K. and Matsukura, S. (2001). "A role for ghrelin in the central regulation of feeding." *Nature* 409: 194-8

Nam, S.-Y., Kratzsch, J., Wook Kim, K., Rae Kim, K., Lim, S.-K. and Marcus, C. (2001). "Cerebrospinal Fluid and Plasma Concentrations of Leptin, NPY, and {alpha}-MSH in Obese Women and Their Relationship to Negative Energy Balance." *J Clin Endocrinol Metab* 86(10): 4849-53.

Namba, H., Morita, S. and Melmed, S. (1989). "Insulin-like growth factor-I action on growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels: interaction with somatostatin." *Endocrinology* 124(4): 1794-9.

Narazaki, M., Witthuhn, B.A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J.N., Kishimoto, T. and Taga, T. (1994). "Activation of JAK2 Kinase Mediated by the Interleukin 6 Signal Transducer gp130." *PNAS* 91(6): 2285-9.

Nass, R., Liu, J., Hellmann, P., Coschigano, K.T., Gaylinn, B., Berryman, D.E., Kopchick, J.J. and Thorner, M.O. (2004). "Chronic Changes in Peripheral Growth Hormone Levels Do Not Affect Ghrelin Stomach mRNA Expression and Serum Ghrelin Levels in Three Transgenic Mouse Models." *Journal of Neuroendocrinology* 16(8): 669-75.

Nickola, M.W., Wold, L.E., Colligan, P.B., Wang, G.-J., Samson, W.K. and Ren, J. (2000). "Leptin Attenuates Cardiac Contraction in Rat Ventricular Myocytes : Role of NO." *Hypertension* 36(4): 501-5.

Nishiyama, Makion, Asaba and Hasimoto (1999). "Leptin Effects on the Expression of Type-2 CRH Receptor mRNA in the Ventromedial Hypothalamus in the Rat." *Journal of Neuroendocrinology* 11(4): 307-14.

- Niswender, K.D., Morrison, C.D., Clegg, D.J., Olson, R., Baskin, D.G., Myers, M.G., Jr., Seeley, R.J. and Schwartz, M.W. (2003). "Insulin Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in the Hypothalamic Arcuate Nucleus: A Key Mediator of Insulin-Induced Anorexia." *Diabetes* 52(2): 227-31.
- Niswender, K.D. and Schwartz, M.W. (2003). "Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities." *Frontiers in Neuroendocrinology* 24(1): 1-10.
- Nogueiras, R., Tovar, S., Mitchell, S.E., Rayner, D.V., Archer, Z.A., Dieguez, C. and Williams, L.M. (2004). "Regulation of Growth Hormone Secretagogue Receptor Gene Expression in the Arcuate Nuclei of the Rat by Leptin and Ghrelin." *Diabetes* 53(10): 2552-8.

-O-

- Oh, P., McIntosh, D.P. and Schnitzer, J.E. (1998). "Dynammin at the Neck of Caveolae Mediates Their Budding to Form Transport Vesicles by GTP-driven Fission from the Plasma Membrane of Endothelium." *J. Cell Biol.* 141(1): 101-14.
- Okamoto, S., Kimura, K. and Saito, M. (2001). "Anorectic effect of leptin is mediated by hypothalamic corticotropin-releasing hormone, but not by urocortin, in rats." *Neuroscience Letters* 307(3): 179-82.
- Olson, B.R., Drutarosky, M.D., Chow, M.-S., Hruby, V.J., Stricker, E.M. and Verbalis, J.G. (1991). "Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats." *Peptides* 12(1): 113-8.
- Olson, B.R., Drutarosky, M.D., Stricker, E.M. and Verbalis, J.G. (1991). "Brain oxytocin receptors mediate corticotropin-releasing hormone-induced anorexia." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 260(2): R448-52.
- Ookuma, M., Ookuma, K. and York, D.A. (1998). "Effects of leptin on insulin secretion from isolated rat pancreatic islets." *Diabetes* 47(2): 219-23.
- Ozata, M., Dieguez, C. and Casanueva, F.F. (2003). "The Inhibition of Growth Hormone Secretion Presented in Obesity Is Not Mediated by the High Leptin Levels: A Study in Human Leptin Deficiency Patients." *J Clin Endocrinol Metab* 88(1): 312-6.

Ozata, M., Ozdemir, I.C. and Licinio, J. (1999). "Human Leptin Deficiency Caused by a Missense Mutation: Multiple Endocrine Defects, Decreased Sympathetic Tone, and Immune System Dysfunction Indicate New Targets for Leptin Action, Greater Central than Peripheral Resistance to the Effects of Leptin, and Spontaneous Correction of Leptin-Mediated Defects." *J Clin Endocrinol Metab* 84(10): 3686-95.

-P-

Paccaud, J.P., Siddle, K. and Carpentier, J.L. (1992). "Internalization of the human insulin receptor. The insulin-independent pathway." *J. Biol. Chem.* 267(18): 13101-6.

Pagesy, P., Li, J.Y., Rentier-Delrue, F., Le Bouc, Y., Martial, J.A. and Peillon, F. (1989). "Evidence of pre-prosomatostatin mRNA in human normal and tumoral anterior pituitary gland." *Mol Endocrinol* 3(8): 1289-94.

Pandya, N., DeMott-Friberg, R., Bowers, C.Y., Barkan, A.L. and Jaffe, C.A. (1998). "Growth Hormone (GH)-Releasing Peptide-6 Requires Endogenous Hypothalamic GH-Releasing Hormone for Maximal GH Stimulation." *J Clin Endocrinol Metab* 83(4): 1186-9.

Pearse, B.M.F. (1976). "Clathrin: A Unique Protein Associated with Intracellular Transfer of Membrane by Coated Vesicles." *PNAS* 73(4): 1255-9.

Pelkmans, L., Kartenbeck, J. and Helenius, A. (2001). "Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER." *Nat Cell Biol* 3(5): 473-83.

Perret-Vivancos, C., Abbate, A., Ardail, D., Raccurt, M., Usson, Y., Lobie, P.E. and Morel, G. (2006). "Growth hormone activity in mitochondria depends on GH receptor Box 1 and involves caveolar pathway targeting." *Experimental Cell Research* 312(3): 215-32.

Perrin, D., Soulage, C., Pequignot, J.M. and G  lo  n, A. (2003). "Resistance to obesity in Lou/C rats prevents ageing-associated metabolic alterations." *Diabetologia* 46(11): 1489-96.

Phillips, M.S., Liu, Q., Hammond, H.A., Dugan, V., Hey, P.J., Caskey, C.T. and Hess, J.F. (1996). "Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat." *Nat Genet* 13(1): 18-9.

- Pierroz, D.D., Catzeflis, C., Aebi, A.C., Rivier, J.E. and Aubert, M.L. (1996). "Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle inhibits both the pituitary-testicular axis and growth hormone and insulin-like growth factor I secretion in intact adult male rats." *Endocrinology* 137(1): 3-12.
- Pitcher, J.A., Payne, E.S., Csontos, C., DePaoli-Roach, A.A. and Lefkowitz, R.J. (1995). "The G-Protein-Coupled Receptor Phosphatase: A Protein Phosphatase Type 2A with a Distinct Subcellular Distribution and Substrate Specificity." *PNAS* 92(18): 8343-7.
- Pol, A., Calvo, M. and Enrich, C. (1998). "Isolated endosomes from quiescent rat liver contain the signal transduction machinery: Differential distribution of activated Raf-1 and Mek in the endocytic compartment." *FEBS Letters* 441(1): 34-8.
- Polonsky, K., Given, B. and Van Cauter, E. (1988). "Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects." *J Clin Invest* 81: 442-8.
- Popovic, V., Miljic, D., Micic, D., Damjanovic, S., Arvat, E., Ghigo, E., Dieguez, C. and Casanueva, F.F. (2003). "Ghrelin Main Action on the Regulation of Growth Hormone Release Is Exerted at Hypothalamic Level." *J Clin Endocrinol Metab* 88(7): 3450-3.
- Poppitt, S.D., Leahy, F.E., Keogh, G.F., Wang, Y., Mulvey, T.B., Stojkovic, M., Chan, Y.K., Choong, Y.S., McArdle, B.H. and Cooper, G.J.S. (2005). "Effect of high-fat meals and fatty acid saturation on postprandial levels of the hormones ghrelin and leptin in healthy men." *Eur J Clin Nutr* 60(1): 77-84.
- Press, M. (1988). "Growth hormone and metabolism." *Diabetes Metab Rev.* 4: 391-414.

-Q-

- Qian, S., Chen, H., Weingarh, D., Trumbauer, M.E., Novi, D.E., Guan, X., Yu, H., Shen, Z., Feng, Y., Frazier, E., Chen, A., Camacho, R.E., Shearman, L.P., Gopal-Truter, S., MacNeil, D.J., Van der Ploeg, L.H.T. and Marsh, D.J. (2002). "Neither Agouti-Related Protein nor Neuropeptide Y Is Critically Required for the Regulation of Energy Homeostasis in Mice." *Mol. Cell. Biol.* 22(14): 5027-35.
- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pellemounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, J., Kanarek, R. and Maratos-Flier, E. (1996). "A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour." *Nature* 380(6571): 243-7.

- Quest, A., Leyton, L. and Parraga, M. (2004). "Caveolins, caveolae, and lipid rafts in cellular transport, signaling, and disease." *Biochem Cell Biol.* 82: 129-44.
- Quintela, M., Senaris, R., Heiman, M.L., Casanueva, F.F. and Dieguez, C. (1997). "Leptin Inhibits in Vitro Hypothalamic Somatostatin Secretion and Somatostatin mRNA Levels." *Endocrinology* 138(12): 5641-4.

-R-

- Raposo, P.D., Pierroz, D.D., Broqua, P., White, R.B., Pedrazzini, T. and Aubert, M.L. (2001). "Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism." *Molecular and Cellular Endocrinology* 185(1-2): 195-204.
- Rasmussen, M., Hvidberg, A., Juul, A., Main, K., Gotfredsen, A., Skakkebaek, N., Hilsted, J. and Skakkebaek, N. (1995). "Massive weight loss restores 24-hour growth hormone release profiles and serum insulin-like growth factor-I levels in obese subjects." *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1407-15.
- Rauch, C., Li, J.Y., Croissandeau, G., Berthet, M., Peillon, F. and Pagesy, P. (1995). "Characterization and localization of an immunoreactive growth hormone- releasing hormone precursor form in normal and tumoral human anterior pituitaries." *Endocrinology* 136(6): 2594-601.
- Raynor, K., Murphy, W.A., Coy, D.H., Taylor, J.E., Moreau, J.P., Yasuda, K., Bell, G.I. and Reisine, T. (1993). "Cloned somatostatin receptors: identification of subtype-selective peptides and demonstration of high affinity binding of linear peptides." *Mol Pharmacol* 43(6): 838-44.
- Ren, D., Li, M., Duan, C. and Rui, L. (2005). "Identification of SH2-B as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice." *Cell Metabolism* 2(2): 95-104.
- Ren, J. and Relling, D.P. (2006). "Leptin-induced suppression of cardiomyocyte contraction is amplified by ceramide." *Peptides* 27(6): 1415-9.
- Renier, G. and Serri, O. (1991). "Effects of acute and prolonged glucose excess on growth hormone release by cultured rat anterior pituitary cells." *Neuroendocrinology.* 54: 521-5.

- Rentsch, J. and Chiesi, M. (1996). "Regulation of ob gene mRNA levels in cultured adipocytes." *FEBS Letters* 379(1): 55-9.
- Rettori, V., Milenkovic, L., Aguila, M.C. and McCann, S.M. (1990). "Physiologically significant effect of neuropeptide Y to suppress growth hormone release by stimulating somatostatin discharge." *Endocrinology* 126(5): 2296-301.
- Reyes, T.M., Lewis, K., Perrin, M.H., Kunitake, K.S., Vaughan, J., Arias, C.A., Hogenesch, J.B., Gulyas, J., Rivier, J., Vale, W.W. and Sawchenko, P.E. (2001). "Urocortin II: A member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors." *PNAS* 98(5): 2843-8.
- Ricci, E., Smallwood, S., Chouabe, C., Mertani, H., Raccurt, M., Morel, G. and Bonvallet, R. (2006). "Electrophysiological characterization of left ventricular myocytes obtained from obese Sprague-Dawley rats." *Obesity Res.* 14: 778-86.
- Roh, S.-G., Clarke, I., Xu, R., Goding, J., Loneragan, K. and Chen, C. (1998). "The in vitro Effect of Leptin on Basal and Growth Hormone-Releasing Hormone-Stimulated Growth Hormone Secretion from the Ovine Pituitary Gland." *Neuroendocrinology* 68: 361-4.
- Roh, S.-G., Nie, G.-Y., Loneragan, K., Gertler, A. and Chen, C. (2001). "Direct Modification of Somatotrope Function by Long-Term Leptin Treatment of Primary Cultured Ovine Pituitary Cells." *Endocrinology* 142(12): 5167-71.
- Rosenfeld, J., Knoll, B. and Moore, R. (2002). "Regulation of G-protein-coupled receptor activity by rab GTPases." *Receptors Channels.* 8: 87-97.
- 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. and 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(10): 4428-31.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.-S., Glenney, J.R. and Anderson, R.G.W. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." *Cell* 68(4): 673-82.
- Russell-Jones, D., Umpleby, A., Hennessy, T., Bowes, S., Shojaee-Moradie, F., Hopkins, K., Jackson, N., Kelly, J., Jones, R. and Sonksen, P. (1994). "Use of a leucine clamp to demonstrate that IGF-I actively stimulates protein synthesis in normal humans." *Am J Physiol.* 267: E591-8.

Russell-Jones, D., Weissberger, A., Bowes, S., Kelly, J., Thomason, M., Umpleby, A., Jones, R. and Sonksen, P. (1993). "The effects of growth hormone on protein metabolism in adult growth hormone deficient patients." *Clin Endocrinol (Oxf)*. 38: 427-31.

-S-

Sadir, R., Lambert, A., Lortat-Jacob, H. and Morel, G. (2001). "Caveolae and Clathrin-coated vesicles: two possible internalization pathways for IFN-gamma and IFN-gamma receptor." *Cytokine* 14(1): 19-26.

Sahu, A. (1998). "Evidence Suggesting That Galanin (GAL), Melanin-Concentrating Hormone (MCH), Neurotensin (NT), Proopiomelanocortin (POMC) and Neuropeptide Y (NPY) Are Targets of Leptin Signaling in the Hypothalamus." *Endocrinology* 139(2): 795-8.

Sahu, A., Carraway, R.E. and Wang, Y.-P. (2001). "Evidence that neurotensin mediates the central effect of leptin on food intake in rat." *Brain Research* 888(2): 343-7.

Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millot, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B. and Auwerx, J. (1995). "Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration." *Nature* 377(6549): 527-8.

Saleri, R., Giustina, A., Tamanini, C., Valle, D., Burattin, A., Wehrenberg, W. and Baratta, M. (2004). "Leptin Stimulates Growth Hormone Secretion via a Direct Pituitary Effect Combined with a Decreased Somatostatin Tone in a Median Eminence-Pituitary Perfusion Study." *Neuroendocrinology* 79: 221-8.

Saleri, R., Grasselli, F. and Tamanini, C. (2005). "Effects of different culture conditions and leptin on GH mRNA expression and GH secretion by pig pituitary cells." *Horm Metab Res*. 37: 214-9.

Sanacora, G., Kershaw, M., Finkelstein, J.A. and White, J.D. (1990). "Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation." *Endocrinology* 127(2): 730-7.

Sato, M. and Frohman, L.A. (1993). "Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH- releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats." *Endocrinology* 133(2): 793-9.

- Satoh, S., Nishimura, H., Clark, A.E., Kozka, I.J., Vannucci, S.J., Simpson, I.A., Quon, M.J., Cushman, S.W. and Holman, G.D. (1993). "Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action." *J. Biol. Chem.* 268(24): 17820-9.
- Scacchi, M., Pincelli, A. and Cavagnini, F. (2000). "Growth Hormone in obesity." *Int J Obes* 23: 260-71.
- Schoeller, D.A., Cella, L.K., Sinha, M.K. and Caro, J.F. (1997). "Entrainment of the Diurnal Rhythm of Plasma Leptin to Meal Timing." *J. Clin. Invest.* 100(7): 1882-7.
- Schwartz, M.W., Marks, J.L., Sipols, A.J., Baskin, D.G., Woods, S.C., Kahn, S.E. and Porte, D., Jr. (1991). "Central insulin administration reduces neuropeptide Y mRNA expression in the arcuate nucleus of food-deprived lean (Fa/Fa) but not obese (fa/fa) Zucker rats." *Endocrinology* 128(5): 2645-7.
- Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P. and Baskin, D.G. (1997). "Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus." *Diabetes* 46(12): 2119-23.
- Scott, M.G.H., Benmerah, A., Muntaner, O. and Marullo, S. (2002). "Recruitment of Activated G Protein-coupled Receptors to Pre-existing Clathrin-coated Pits in Living Cells." *J. Biol. Chem.* 277(5): 3552-9.
- Scrocchi, L.A., Brown, T.J. and Drucker, D.J. (1997). "Leptin sensitivity in nonobese glucagon-like peptide I receptor -/- mice." *Diabetes* 46(12): 2029-34.
- Segal-Lieberman, G., Bradley, R.L., Kokkotou, E., Carlson, M., Trombly, D.J., Wang, X., Bates, S., Myers, M.G., Jr., Flier, J.S. and Maratos-Flier, E. (2003). "Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype." *PNAS* 100(17): 10085-90.
- Segerson, T.P., Hoefler, H., Childers, H., Wolfe, H.J., Wu, P., Jackson, I.M. and Lechan, R.M. (1987). "Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain in situ hybridization." *Endocrinology* 121(1): 98-107.
- Senaris, R., Garcia-Caballero, T., Casabiell, X., Gallego, R., Castro, R., Considine, R.V., Dieguez, C. and Casanueva, F.F. (1997). "Synthesis of Leptin in Human Placenta." *Endocrinology* 138(10): 4501-4.
- Seoane, L.M., Lopez, M., Tovar, S., Casanueva, F.F., Senaris, R. and Dieguez, C. (2003). "Agouti-Related Peptide, Neuropeptide Y, and Somatostatin-Producing Neurons Are Targets for Ghrelin Actions in the Rat Hypothalamus." *Endocrinology* 144(2): 544-51.

- Shah, M., Patel, K., Mukhopadhyay, S., Xu, F., Guo, G. and Sehgal, P.B. (2006). "Membrane-associated STAT3 and PY-STAT3 in the Cytoplasm." *J. Biol. Chem.* 281(11): 7302-8.
- Shaul, P.W. and Anderson, R.G.W. (1998). "Role of plasmalemmal caveolae in signal transduction." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 275(5): L843-51.
- Shibasaki, T., Hotta, M., Masuda, A., Imaki, T., Obara, N., Demura, H., Ling, N. and Shizume, K. (1985). "Plasma GH responses to GHRH and insulin-induced hypoglycemia in man." *J Clin Endocrinol Metab* 60: 290.
- Shimabukuro, M., Koyama, K., Chen, G., Wang, M.-Y., Trieu, F., Lee, Y., Newgard, C.B. and Unger, R.H. (1997). "Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues." *PNAS* 94(9): 4637-41.
- Shimada, M., Tritos, N.A., Lowell, B.B., Flier, J.S. and Maratos-Flier, E. (1998). "Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean." *Nature* 396(6712): 670-4.
- Shimon, I., Taylor, J., Dong, J., Bitonte, R., Kim, S., Morgan, B., Coy, D., Culler, M. and Melmed, S. (1997). "Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation." *J Clin Invest.* 99: 789-98.
- Shimon, I., Yan, X., Magoffin, D.A., Friedman, T.C. and Melmed, S. (1998). "Intact Leptin Receptor Is Selectively Expressed in Human Fetal Pituitary and Pituitary Adenomas and Signals Human Fetal Pituitary Growth Hormone Secretion." *J Clin Endocrinol Metab* 83(11): 4059-64.
- Shin, H.-J., Oh, J., Kang, S.M., Lee, J.H., Shin, M.-J., Hwang, K.-C., Jang, Y. and Chung, J.H. (2005). "Leptin induces hypertrophy via p38 mitogen-activated protein kinase in rat vascular smooth muscle cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329(1): 18-24.
- Shuto, Y., Shibasaki, T., Otagiri, A., Kuriyama, H., Ohata, H., Tamura, H., Kamegai, J., Sugihara, H., Oikawa, S. and Wakabayashi, I. (2002). "Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity." *J. Clin. Invest.* 109(11): 1429-36.
- Shutter, J.R., Graham, M., Kinsey, A.C., Scully, S., Luthy, R. and 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(5): 593-602.
- Simpson, M., Asling, C. and Evans, H. (1950). "Some endocrine influences on skeletal growth and differentiation." *Yale J Biol Med* 23(1-27).

- Sinha, M.K., Ohannesian, J.P., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Magosin, S., Marco, C. and Caro, J.F. (1996). "Nocturnal Rise of Leptin in Lean, Obese, and Non-Insulin-dependent Diabetes Mellitus Subjects." *J. Clin. Invest.* 97(5): 1344-7.
- Smith, B.K., York, D.A. and Bray, G.A. (1994). "Chronic cerebroventricular galanin does not induce sustained hyperphagia or obesity." *Peptides* 15(7): 1267-72.
- Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H.T., Howard, A.D., Feighner, S.D., Cheng, K., Hickey, G.J., Wyvratt, M.J., Jr., Fisher, M.H., Nargund, R.P. and Patchett, A.A. (1997). "Peptidomimetic Regulation of Growth Hormone Secretion." *Endocr Rev* 18(5): 621-45.
- Smith, T.R., Elmendorf, J.S., David, T.S. and Turinsky, J. (1997). "Growth hormone-induced insulin resistance: role of the insulin receptor, IRS-1, GLUT-1, and GLUT-4." *Am J Physiol.* 272: E1071.
- Snel, Y., Brummer, R., Doerga, M., Zelissen, P. and Koppeschaar, H. (1995). "Energy and macronutrient intake in growth hormone-deficient adults: the effect of growth hormone replacement." *Eur J Clin Nutr.* 49: 492-500.
- Soderling, S.H. and Beavo, J.A. (2000). "Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions." *Current Opinion in Cell Biology* 12(2): 174-9.
- Sone, M., Nagata, H., Takekoshi, S. and Osamura, R. (2001). "Expression and localization of leptin receptor in the normal rat pituitary gland." *Cell Tissue Res.* 305: 351-6.
- Sone, M. and Osamura, R.Y. (2001). "Leptin and the pituitary." *Pituitary* 4: 15-23.
- Song, S.H., McIntyre, S.S., Shah, H., Veldhuis, J.D., Hayes, P.C. and Butler, P.C. (2000). "Direct Measurement of Pulsatile Insulin Secretion from the Portal Vein in Human Subjects." *J Clin Endocrinol Metab* 85(12): 4491-9.
- Sorkin, A., Eriksson, A., Heldin, C., Westermarck, B. and Claesson-Welsh, L. (1993). "Pool of ligand-bound platelet-derived growth factor beta-receptors remain activated and tyrosine phosphorylated after internalization." *J.Cell.Physiol.* 156: 373-82.
- Sorkin, A. and von Zastrow, M. (2002). "Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds" *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3(8): 600-14.
- Spanswick, D., Smith, M.A., Groppi, V.E., Logan, S.D. and Ashford, M.L.J. (1997). "Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels." *Nature* 390(6659): 521-5.
- Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr. and Yancopoulos, G.D. (1995). "Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors." *Science* 267(5202): 1349-53.

- Stanley, G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S. and Leibowitz, S.F. (1986). "Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: A powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity." *Peptides* 7(6): 1189-92.
- Steinberg, G.R., McAinch, A.J., Chen, M.B., O'Brien, P.E., Dixon, J.B., Cameron-Smith, D. and Kemp, B.E. (2006). "The suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) inhibits leptin activation of AMP-kinase in cultured skeletal muscle of obese humans." *J Clin Endocrinol Metab*: jc.2006-0638.
- Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Bue-Valleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H.M., Kriauciunas, A., MacKellar, W., Rosteck, P.R., Schoner, B., Smith, D., Tinsley, F.C., Zhang, X.-Y. and Heiman, M. (1995). "The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product." *Nature* 377(6549): 530-2.
- Stricker-Krongrad, A., Dimitrov, T. and Beck, B. (2001). "Central and peripheral dysregulation of melanin-concentrating hormone in obese Zucker rats." *Molecular Brain Research* 92(1-2): 43-8.
- Sun, X.J., Wang, L.-M., Zhang, Y., Yenush, L., Myers Jr, M.G., Glasheen, E., Lane, W.S., Pierce, J.H. and White, M.F. (1995). "Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling." *Nature* 377(6545): 173-7.
- Sun, Y., Ahmed, S. and Smith, R.G. (2003). "Deletion of Ghrelin Impairs neither Growth nor Appetite." *Mol. Cell. Biol.* 23(22): 7973-81.
- Sun, Y., Wang, P., Zheng, H. and Smith, R.G. (2004). "Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor." *PNAS* 101(13): 4679-84.
- Sweeney, G. (2002). "Leptin signalling." *Cellular Signalling* 14(8): 655-63.
- Sweeney, G., Keen, J., Somwar, R., Konrad, D., Garg, R. and Klip, A. (2001). "High Leptin Levels Acutely Inhibit Insulin-Stimulated Glucose Uptake without Affecting Glucose Transporter 4 Translocation in L6 Rat Skeletal Muscle Cells." *Endocrinology* 142(11): 4806-12.
- Szanto, I. and Kahn, C.R. (2000). "Selective interaction between leptin and insulin signaling pathways in a hepatic cell line." *PNAS* 97(5): 2355-60.

-T-

- Takatsu, Y., Matsumoto, H., Ohtaki, T., Kumano, S., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O. and Fujino, M. (2001). "Distribution of Galanin-Like Peptide in the Rat Brain." *Endocrinology* 142(4): 1626-34.
- Takaya, K., Ariyasu, H., Kanamoto, N., Iwakura, H., Yoshimoto, A., Harada, M., Mori, K., Komatsu, Y., Usui, T., Shimatsu, A., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Kojima, M., Kangawa, K. and Nakao, K. (2000). "Ghrelin Strongly Stimulates Growth Hormone Release in Humans." *J Clin Endocrinol Metab* 85(12): 4908-11.
- Takekawa, S., Asami, A., Ishihara, Y., Terauchi, J., Kato, K., Shimomura, Y., Mori, M., Murakoshi, H., Kato, K. and Suzuki, N. (2002). "T-226296: a novel, orally active and selective melanin-concentrating hormone receptor antagonist." *European Journal of Pharmacology* 438(3): 129-35.
- Tang-Christensen, M., Holst, J., Hartmann, B. and Vrang, N. (1999). "The arcuate nucleus is pivotal in mediating the anorectic effects of centrally administered leptin. ." *Neuroreport* 10: 1183-87.
- Tang-Christensen, M., Larsen, P.J., Thulesen, J., Romer, J. and Vrang, N. (2000). "The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake." *Nat Med* 6(7): 802-7.
- Tannenbaum, G.S., Epelbaum, J. and Bowers, C.Y. (2003). "Interrelationship between the Novel Peptide Ghrelin and Somatostatin/Growth Hormone-Releasing Hormone in Regulation of Pulsatile Growth Hormone Secretion." *Endocrinology* 144(3): 967-74.
- Tannenbaum, G.S., Gurd, W. and Lapointe, M. (1998). "Leptin Is a Potent Stimulator of Spontaneous Pulsatile Growth Hormone (GH) Secretion and the GH Response to GH-Releasing Hormone." *Endocrinology* 139(9): 3871-5.
- Tannenbaum, G.S., Lapointe, M., Gurd, W. and Finkelstein, J.A. (1990). "Mechanisms of impaired growth hormone secretion in genetically obese Zucker rats: roles of growth hormone-releasing factor and somatostatin." *Endocrinology* 127(6): 3087-95.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K.J., Smutko, J.S., Mays, G.G., Wool, E.A., Monroe, C.A. and Tepper, R.I. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." *Cell* 83(7): 1263-71.

- Thim, L., Kristensen, P., Nielsen, P.F., Wulff, B.S. and Clausen, J.T. (1999). "Tissue-specific processing of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptides in the rat." *PNAS* 96(6): 2722-7.
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M. and van Deurs, B. (2002). "Caveolae Are Highly Immobile Plasma Membrane Microdomains, Which Are not Involved in Constitutive Endocytic Trafficking." *Mol. Biol. Cell* 13(1): 238-50.
- Thorner, M.O. (2001). "Evidence that the orexigenic effect of ghrelin is mediated by a distinct GHS-R subtype." *Proceedings of the 83rd Annual Meeting of The Endocrine Society*: p169.
- Tolle, V., Zizzari, P., Tomasetto, C., Rio, M., Epelbaum, J. and Bluet-Pajot, M. (2001). "In vivo and in vitro Effects of Ghrelin/Motilin-Related Peptide on Growth Hormone Secretion in the Rat." *Neuroendocrinology* 73: 54-61.
- Toni, R., Jackson, I.M. and Lechan, R.M. (1990). "Neuropeptide-Y-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus." *Endocrinology* 126(5): 2444-53.
- Torri, C., Pedrazzi, P., Leo, G., Muller, E.E., Cocchi, D., Agnati, L.F. and Zoli, M. (2002). "Diet-induced changes in hypothalamic pro-opio-melanocortin mRNA in the rat hypothalamus." *Peptides* 23(6): 1063-8.
- Tortoriello, D.V., McMinn, J.E. and Chua, S.C. (2006). "Increased expression of hypothalamic leptin receptor and adiponectin accompany resistance to dietary-induced obesity and infertility in female C57BL//6J mice." *Int J Obes*.
- Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Mondal, M.S., Shimbara, T., Guan, J.-L., Wang, Q.-P., Funahashi, H., Sakurai, T., Shioda, S., Matsukura, S., Kangawa, K. and Nakazato, M. (2003). "Ghrelin-Induced Food Intake Is Mediated via the Orexin Pathway." *Endocrinology* 144(4): 1506-12.
- Toshinai, K., Mondal, M.S., Nakazato, M., Date, Y., Murakami, N., Kojima, M., Kangawa, K. and Matsukura, S. (2001). "Upregulation of Ghrelin Expression in the Stomach upon Fasting, Insulin-Induced Hypoglycemia, and Leptin Administration." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281(5): 1220-5.
- Tozawa, F., Suda, T., Yamada, M., Ushiyama, T., Tomori, N., Sumitomo, T., Nakagami, Y., Demura, H. and Shizume, K. (1988). "Insulin-induced hypoglycemia increases proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in rat anterior pituitary gland." *Endocrinology* 122(4): 1231-5.

- Traebert, M., Riediger, T., Whitebread, S., Scharrer, E. and Schmid, H.A. (2002). "Ghrelin Acts on Leptin-Responsive Neurons in the Rat Arcuate Nucleus." *Journal of Neuroendocrinology* 14(7): 580-6.
- Tschop, M., Smiley, D.L. and Heiman, M.L. (2000). "Ghrelin induces adiposity in rodents." *Nature* 407(6806): 908-13.
- Tschop, M., Wawarta, R., Riepl, R., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R. and Folwaczny, C. (2001). "Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels." *J Endocrinol Invest.* 24: RC19-21.
- Tschop, M., Weyer, C., Tataranni, P.A., Devanarayan, V., Ravussin, E. and Heiman, M.L. (2001). "Circulating Ghrelin Levels Are Decreased in Human Obesity." *Diabetes* 50(4): 707-9.
- Tsuchiya, T., Shimizu, H., Horie, T. and Mori, M. (1999). "Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor." *European Journal of Pharmacology* 365(2-3): 273-9.
- Turton, M.D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M.B., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., Wilding, J.P.H., Smith, D.M., Ghatel, M.A., Herbert, J. and Bloom, S.R. (1996). "A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding." *Nature* 379(6560): 69-72.

-U-

- Uehara, Y., Shimizu, H., Ohtani, K., Sato, N. and Mori, M. (1998). "Hypothalamic corticotropin-releasing hormone is a mediator of the anorexigenic effect of leptin." *Diabetes* 47(6): 890-3.
- Ueki, K., Kondo, T., Tseng, Y.-H. and Kahn, C.R. (2004). "Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse." *PNAS* 101(28): 10422-7.
- Uittenbogaard, A., Ying, Y.-s. and Smart, E.J. (1998). "Characterization of a Cytosolic Heat-shock Protein-Caveolin Chaperone Complex. INVOLVEMENT IN CHOLESTEROL TRAFFICKING." *J. Biol. Chem.* 273(11): 6525-32.
- Unger, R.H. (2003). "THE PHYSIOLOGY OF CELLULAR LIPOREGULATION." *Annual Review of Physiology* 65(1): 333-47.

Uotani, S., Bjorbaek, C., Tornøe, J. and Flier, J.S. (1999). "Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation." *Diabetes* 48(2): 279-86.

-V-

Vahl, N., Jorgensen, J., Skjaerbaek, C., Veldhuis, J., Orskov, H. and Christiansen, J. (1997). "Abdominal adiposity rather than age and sex predicts mass and regularity of GH secretion in healthy adults." *Am J Physiol.* 272: E1108-16.

Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B. and Froguel, P. (1998). "A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity." *Nat Genet* 20(2): 113-4.

Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E., Stoffel, M. and Friedman, J.M. (1996). "Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice." *Nat Genet* 14(1): 95-7.

van den Brink, G.R., O'Toole, T., Hardwick, J.C.H., van den Boogaardt, D.E.M., Versteeg, H.H., van Deventer, S.J.H. and Peppelenbosch, M.P. (2000). "Leptin Signaling in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells, Activation of p38 and p42/44 Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase and p70 S6 Kinase." *Molecular Cell Biology Research Communications* 4(3): 144-50.

Van Dielen, F.M.H., van 't Veer, C., Buurman, W.A. and Greve, J.W.M. (2002). "Leptin and Soluble Leptin Receptor Levels in Obese and Weight-Losing Individuals." *J Clin Endocrinol Metab* 87(4): 1708-16.

Van Haasteren, G.A., Linkels, E., Klootwijk, W., van Toor, H., Rondeel, J.M., Themmen, A.P., de Jong, F.H., Valentijn, K., Vaudry, H. and Bauer, K. (1995). "Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotrophin-releasing hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland." *J Endocrinol* 145(1): 143-53.

Van Vliet, G., Bosson, D., Rummens, E., Robyn, C. and Wolter, R. (1986). "Evidence against growth hormone-releasing factor deficiency in children with idiopathic obesity." *Acta Endocrinol Suppl.* 279: 403-10.

Vanderschueren-Lodeweyck, M. (1993). "The effect of simple obesity on growth and growth hormone." *Horm Res.* 40: 23-30.

- Veldhuis, J.D., Iranmanesh, A., Ho, K.K., Waters, M.J., Johnson, M.L. and Lizarralde, G. (1991). "Dual defects in pulsatile growth hormone secretion and clearance subserve the hyposomatotropism of obesity in man." *J Clin Endocrinol Metab* 72(1): 51-9.
- Veldhuis, J.D., Liem, A.Y., South, S., Weltman, A., Weltman, J., Clemmons, D.A., Abbott, R., Mulligan, T., Johnson, M.L. and Pincus, S. (1995). "Differential impact of age, sex steroid hormones, and obesity on basal versus pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay." *J Clin Endocrinol Metab* 80(11): 3209-22.
- Veyrat-Durebex, C., Alliot, J. and Gaudreau, P. (2005). "Regulation of the Pituitary Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor in Ageing Male and Female LOU Rats: New Insights into Healthy Ageing." *Journal of Neuroendocrinology* 17(11): 691-700.
- Vieira, A.V., Lamaze, C. and Schmid, S.L. (1996). "Control of EGF Receptor Signaling by Clathrin-Mediated Endocytosis." *Science* 274(5295): 2086-9.
- Vijayan, E. and McCann, S.M. (1977). "Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin releasing hormone (TRH)." *Endocrinology* 100(6): 1727-30.
- Vuagnat, B., Pierroz, D., Lalaoui, M., Englaro, P., Pralong, F., Blum, W. and Aubert, M. (1998). "Evidence for a Leptin-Neuropeptide Y Axis for the Regulation of Growth Hormone Secretion in the Rat." *Neuroendocrinology* 67(5): 291-300.

-W-

- Wang, C.F., Billington, C.J., Levine, A.S. and Kotz, C.M. (2000). "Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression." *Neuroreport* 11: 3251-5.
- Wang, M.-Y., Yan Ting, Z., Newgard, C.B. and Unger, R.H. (1996). "A novel leptin receptor isoform in rat." *FEBS Letters* 392(2): 87-90.
- Wang, Z., Zhou, Y.-T., Kakuma, T., Lee, Y., Kalra, S.P., Kalra, P.S., Pan, W. and Unger, R.H. (2000). "Leptin Resistance of Adipocytes in Obesity: Role of Suppressors of Cytokine Signaling." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277(1): 20-6.

- Watt, M.J., Dzamko, N., Thomas, W.G., Rose-John, S., Ernst, M., Carling, D., Kemp, B.E., Febbraio, M.A. and Steinberg, G.R. (2006). "CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK." *Nat Med* 12(5): 541-8.
- White, D. and Tartaglia, L. (1999). "Evidence for ligand-independent homo-oligomerization of leptin receptor (OB-R) isoforms: A proposed mechanism permitting productive long-form signaling in the presence of excess short-form expression." *Journal of Cellular Biochemistry* 73(2): 278-88.
- Wickens, M. (1990). "How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus." *Trends in Biochemical Sciences* 15(7): 277-81.
- Widdowson, P.S., Upton, R., Buckingham, R., Arch, J. and Williams, G. (1997). "Inhibition of food response to intracerebroventricular injection of leptin is attenuated in rats with diet-induced obesity." *Diabetes* 46(11): 1782-5.
- Wierup, N., Richards, W.G., Bannon, A.W., Kuhar, M.J., Ahren, B. and Sundler, F. (2005). "CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight." *Regulatory Peptides* 129(1-3): 203-11.
- Williams, G., Cardoso, H., Lee, Y.C., Ghatge, M.A., Flatt, P.R., Bailey, C.J. and Bloom, S.R. (1991). "Reduced hypothalamic neurotensin concentrations in the genetically obese diabetic (ob/ob) mouse: Possible relationship to obesity." *Metabolism* 40(10): 1112-6.
- Williams, T., Berelowitz, M., Joffe, S., Thorner, M., Rivier, J., Vale, W. and Frohman, L. (1984). "Impaired growth hormone responses to growth hormone-releasing factor in obesity. A pituitary defect reversed with weight reduction." *N Engl J Med*. 311: 1403-7.
- Wilsey, J., Zolotukhin, S., Prima, V. and Scarpace, P.J. (2003). "Central leptin gene therapy fails to overcome leptin resistance associated with diet-induced obesity." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285(5): R1011-20.
- Withers, D.J., Gutierrez, J.S., Towery, H., Burks, D.J., Ren, J.-M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G.I., Bonner-Weir, S. and White, M.F. (1998). "Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice." *Nature* 391(6670): 900-4.
- Wittmann, G., Sarkar, S., Hrabovszky, E., Liposits, Z., Lechan, R.M. and Fekete, C. (2004). "Galanin- but not galanin-like peptide-containing axon terminals innervate hypophysiotropic TRH-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus." *Brain Research* 1002(1-2): 43-50.

- Woods, S., Lotter, E., McKay, L. and Porte, D. (1979). "Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons." *Nature* 282: 503-5.
- Wren, A.M., Small, C.J., Abbott, C.R., Dhillon, W.S., Seal, L.J., Cohen, M.A., Batterham, R.L., Taheri, S., Stanley, S.A., Ghatei, M.A. and Bloom, S.R. (2001). "Ghrelin Causes Hyperphagia and Obesity in Rats." *Diabetes* 50(11): 2540-7.
- Wu, Z., Bidlingmaier, M., Liu, C., De Souza, E.B., Tschop, M., Morrison, K.M. and Strasburger, C.J. (2002). "Quantification of the Soluble Leptin Receptor in Human Blood by Ligand-Mediated Immunofunctional Assay." *J Clin Endocrinol Metab* 87(6): 2931-9.
- Wunderlich, W., Fialka, I., Teis, D., Alpi, A., Pfeifer, A., Parton, R.G., Lottspeich, F. and Huber, L.A. (2001). "A Novel 14-Kilodalton Protein Interacts with the Mitogen-activated Protein Kinase Scaffold MP1 on a Late Endosomal/Lysosomal Compartment." *J. Cell Biol.* 152(4): 765-76.

-X-

- Xu, B., Kalra, P.S., Farmerie, W.G. and Kalra, S.P. (1999). "Daily Changes in Hypothalamic Gene Expression of Neuropeptide Y, Galanin, Proopiomelanocortin, and Adipocyte Leptin Gene Expression and Secretion: Effects of Food Restriction." *Endocrinology* 140(6): 2868-75.

-Y-

- Yamanaka, A., Beuckmann, C.T., Willie, J.T., Hara, J., Tsujino, N., Mieda, M., Tominaga, M., Yagami, K.-i., Sugiyama, F. and Goto, K. (2003). "Hypothalamic Orexin Neurons Regulate Arousal According to Energy Balance in Mice." *Neuron* 38(5): 701-13.
- Yamanaka, A., Sakurai, T., Katsumoto, T., Masashi, Y. and Goto, K. (1999). "Chronic intracerebroventricular administration of orexin-A to rats increases food intake in daytime, but has no effect on body weight." *Brain Research* 849(1-2): 248-52.
- Yamashita, S. and Melmed, S. (1986). "Effects of insulin on rat anterior pituitary cells. Inhibition of growth hormone secretion and mRNA levels." *Diabetes* 35(4): 440-7.

Yasuda, T., Masaki, T., Kakuma, T. and Yoshimatsu, H. (2004). "Hypothalamic Melanocortin System Regulates Sympathetic Nerve Activity in Brown Adipose Tissue." *Experimental Biology and Medicine* 229(3): 235-9.

-Z-

Zabolotny, J.M., Bence-Hanulec, K.K., Stricker-Krongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Elmquist, J.K., Tartaglia, L.A., Kahn, B.B. and Neel, B.G. (2002). "PTP1B Regulates Leptin Signal Transduction In Vivo." *Developmental Cell* 2(4): 489-95.

Zarjevski, N., Cusin, I., Vettor, R., Rohner-Jeanrenaud, F. and Jeanrenaud, B. (1993). "Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity." *Endocrinology* 133(4): 1753-8.

Zerial, M. and McBride, H. (2001). "RAB PROTEINS AS MEMBRANE ORGANIZERS " *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2: 107-17.

Zhang, F., Basinski, M.B., Beals, J.M., Briggs, S.L., Churgay, L.M., Clawson, D.K., DiMarchi, R.D., Furman, T.C., Hale, J.E., Hsiung, H.M., Schoner, B.E., Smith, D.P., Zhang, X.Y., Wery, J.-P. and Schevitz, R.W. (1997). "Crystal structure of the obese protein leptin-E100." 387(6629): 206-9.

Zhang, J.Z., Davletov, B.A., Sudhof, T.C. and Anderson, R.G.W. (1994). "Synaptotagmin I is a high affinity receptor for clathrin AP-2: Implications for membrane recycling." *Cell* 78(5): 751-60.

Zhang, R. and Reisin, E. (2000). "Obesity-hypertension: the effects on cardiovascular and renal systems." *American Journal of Hypertension* 13(12): 1308-14.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J.M. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* 372(6505): 425-32.

Zhang, Y.-z., Moheban, D.B., Conway, B.R., Bhattacharyya, A. and Segal, R.A. (2000). "Cell Surface Trk Receptors Mediate NGF-Induced Survival While Internalized Receptors Regulate NGF-Induced Differentiation." *J. Neurosci.* 20(15): 5671-8.

Zhao, A.Z., Bornfeldt, K.E. and Beavo, J.A. (1998). "Leptin Inhibits Insulin Secretion by Activation of Phosphodiesterase 3B." *J. Clin. Invest.* 102(5): 869-73.

- Zhao, A.Z., Huan, J.-N., Gupta, S., Pal, R. and Sahu, A. (2002). "A phosphatidylinositol 3-kinase-phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding." *Nat Neurosci* 5(8): 727-8.
- Zhao, A.Z., Shinohara, M.M., Huang, D., Shimizu, M., Eldar-Finkelman, H., Krebs, E.G., Beavo, J.A. and Bornfeldt, K.E. (2000). "Leptin Induces Insulin-like Signaling That Antagonizes cAMP Elevation by Glucagon in Hepatocytes." *J. Biol. Chem.* 275(15): 11348-54.
- Zhou, S., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S. and Lechleider, R.J. (1993). "SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences." *Cell* 72(5): 767-78.
- Zhou, Y., Xu, B.C., Maheshwari, H.G., He, L., Reed, M., Lozykowski, M., Okada, S., Cataldo, L., Coschigamo, K., Wagner, T.E., Baumann, G. and Kopchick, J.J. (1997). "A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse)." *PNAS* 94(24): 13215-20.
- Zhou, Y.-T., Shimabukuro, M., Koyama, K., Lee, Y., Wang, M.-Y., Trieu, F., Newgard, C.B. and Unger, R.H. (1997). "Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation." *PNAS* 94(12): 6386-90.
- Zieba, D.A., Amstalden, M., Morton, S., Gallino, J.L., Edwards, J.F., Harms, P.G. and Williams, G.L. (2003). "Effects of leptin on basal and GHRH-stimulated GH secretion from the bovine adenohypophysis are dependent upon nutritional status." *J Endocrinol* 178(1): 83-9.

Annexes

Les neuropeptides hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la balance énergétique.

I. Les neuropeptides orexigènes de premier ordre.

I.1. Le neuropeptide Y (NPY).

Le NPY appartient à la famille des polypeptides pancréatiques. Ce neuropeptide existe de façon ubiquitaire dans le cerveau, avec un niveau d'expression particulièrement élevé au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus (ARC). Son expression hypothalamique est régulée par le statut métabolique de l'organisme. Ainsi, l'expression et la libération de NPY est stimulée par le jeûne et inhibée par la prise alimentaire (Sanacora G *et al.* 1990).

Chez le rat et la souris, l'injection de NPY au niveau hypothalamique augmente la prise alimentaire (Glenn Stanley B *et al.* 1986), diminue la dépense énergétique en réduisant la thermogénèse (Billington CJ *et al.* 1991) et l'activité du système nerveux autonome (Egawa M *et al.* 1991). L'injection répétée de NPY au niveau du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus induit l'obésité chez le rat (Zarjevski N *et al.* 1993).

NPY est donc un neuropeptide orexigène et logiquement, sa synthèse au niveau du noyau arqué est inhibée par l'insuline et la leptine (Schwartz MW *et al.* 1991; Stephens TW *et al.* 1995).

Chez les rats obèses Zucker (*fa/fa*), l'expression de NPY est augmentée au niveau de l'ARC (Beck B *et al.* 1990). Chez l'homme cependant, son expression ne semble pas être affectée dans les cas d'obésité (Brunani A *et al.* 1995; Nam S-Y *et al.* 2001) bien que quelques études témoignent d'une augmentation.

Etonnamment, les souris « knock out » (KO) pour NPY sont caractérisées par une prise alimentaire physiologique. L'importance du NPY dans la prise alimentaire étant démontrée, cette observation suggère des circuits neuronaux anaboliques parallèles, compensant l'absence de NPY par l'utilisation d'autres neuropeptides orexigènes.

I.2. Le « Agouti Related Peptide » (AgRP).

L'AgRP a été découvert chez la souris obèse *agouti*, nommée ainsi à cause de la couleur de son pelage. Cette couleur est due à l'expression de la protéine Agouti au niveau des poils, et à son effet antagoniste sur le système mélanocortine. Au niveau du SNC, ce neuropeptide est principalement exprimé au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus,

(Shutter JR *et al.* 1997). Comme Agouti, l'AgRP est un antagoniste des récepteurs MC3R et MC4R impliqués dans le système mélanocortine (Lu D *et al.* 1994).

Une seule injection au niveau central d'AgRP induit une augmentation de la prise alimentaire pouvant durer 7 jours (Rossi M *et al.* 1998). Ce temps d'action incroyable fait de l'AgRP un neuropeptide anabolique puissant (en comparaison au NPY dont l'effet sur la prise alimentaire n'est que de 6h environ). Les souris modifiées génétiquement pour surexprimer l'AgRP sont hyperphagiques et fortement obèses (Graham M *et al.* 1997).

L'expression et la libération de l'AgRP sont stimulées par le jeûne, et inhibées par la prise alimentaire, la leptine, l'insuline et le glucose (Mizuno TM *et al.* 1999; Morrison CD *et al.* 2005). Les rats rendus obèses par l'alimentation (rat DIO pour « Diet Induced Obesity ») présentent une augmentation de la concentration d'AgRP au niveau hypothalamique (Harrold JA *et al.* 1999). Un polymorphisme du gène AgRP est également en relation avec le développement de l'obésité chez l'homme (Argyropoulos G *et al.* 2002).

En plus de son rôle dans la prise alimentaire, AgRP influence négativement la dépense énergétique. Ainsi, son injection centrale inhibe l'expression de UCP1 (« uncoupling protein 1) dans le tissu adipeux brun (Yasuda T *et al.* 2004). De plus, l'injection centrale d'ARN antisens de l'AgRP induit chez le rat une réduction de poids, sans pour autant modifier la prise alimentaire (Makimura H *et al.* 2002). L'AgRP inhibe également l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien (HPT) et la sécrétion des hormones thyroïdiennes fortement impliquées dans le contrôle des dépenses énergétiques (Fekete C *et al.* 2002).

Comme dans le cas de NPY, les souris KO AgRP ne présentent pas de défauts majeurs dans la régulation de la prise alimentaire (Gao Q *et al.* 2004). La même observation a été réalisée chez les souris double KO pour NPY et AgRP, suggérant l'implication d'autres circuits neuronaux et d'autres neuropeptides anaboliques dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique, neuropeptides qu'ils restent peut-être à découvrir ou à redécouvrir (Gao Q *et al.* 2004).

II. Les neuropeptides orexigènes de second ordre.

II.1. Les orexines ou hypocretines.

La famille des orexines est composée de deux peptides, orexine A et orexine B, issues du clivage protéolytique du précurseur prépro-orexine. Les neurones synthétisant l'orexine sont principalement localisés dans l'aire hypothalamique latérale (LHA) et l'aire périfornicale (PFA).

L'expression ARN de la prépro-orexine au niveau de l'hypothalamus est augmentée par un jeûne complet de 48h mais n'est pas affectée par une prise alimentaire simplement réduite (Cai XJ *et al.* 1999). Chez les rongeurs, l'injection centrale d'orexine A induit une augmentation de la prise alimentaire, mais sur le très court terme (Haynes AC *et al.* 1999). En effet, suite à cette injection un mécanisme compensatoire s'installe, et il n'y a ni modification significative de la prise alimentaire sur 24h, ni gain de poids (Yamanaka A *et al.* 1999). L'injection d'orexine B ne modifie pas la prise alimentaire chez le rat.

Les neurones à orexines expriment l'isoforme longue du récepteur de la leptine, et l'injection de leptine au niveau central si elle induit une diminution de la production d'orexine A, n'a curieusement pas d'effet sur l'expression de son précurseur dans des conditions standards (Beck B et Richy S 1999; Cai XJ *et al.* 1999). De façon contradictoire, l'obésité est associée à une baisse de l'expression de la prépro-orexine chez le rat Zucker fa/fa (Cai XJ *et al.* 2000).

Les orexines semblent avoir un rôle prédominant dans la sensibilité au taux de glucose sanguin. En effet, les neurones orexines interagissent avec les neurones sensibles au glucose de l'hypothalamus. Les « glucose-responsive cells » sont stimulées par une hyperglycémie et l'orexine A. Les « glucose-sensitive neurons » stimulés par une hypoglycémie, l'orexine B et inhibée par l'orexine A (Liu XH *et al.* 2001). De plus, une glycémie faible augmente la synthèse d'orexine B mais pas d'orexine A au niveau hypothalamique (Cai XJ *et al.* 2001).

En plus de son action dans la régulation de la balance énergétique, ce neuropeptide est également très impliqué dans la régulation des cycles du sommeil et des rythmes circadiens en général. Les souris KO orexines ne présentent pas d'anomalies dans la régulation de la prise alimentaire mais sont cependant narcoleptiques.

II.2. La « Melanin-Concentrating Hormone » ou MCH.

La MCH est à la fois un neurotransmetteur et une hormone. Elle est synthétisée au niveau de l'intestin, du pancréas, du tube digestif et du cerveau, *via* le clivage protéolytique d'une pro-hormone, la Pmch. Celle-ci code également pour les neuropeptides EI (NEI) et GE (NGE) qui pourraient également jouer un rôle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Nahon JL *et al.* 1989). Dans l'hypothalamus, les neurones synthétisant la MCH sont localisés principalement au niveau du LHA (Bittencourt J *et al.* 1992).

Le jeûne augmente l'expression de la MCH dans l'hypothalamus. L'injection centrale de MCH augmente la prise alimentaire et l'infusion centrale de MCH conduit même à une

obésité légère (Qu D *et al.* 1996). L'injection centrale de leptine inhibe l'expression de la MCH dans le LHA (Sahu A 1998). Si la MCH semble insensible au taux de glucose circulant (Bayer L *et al.* 2000), l'injection centrale d'insuline semble curieusement augmenter l'expression de MCH dans le LHA (Bahjaoui-Bouhaddi M *et al.* 1994).

Les rats obèses Zucker (fa/fa), les souris ob/ob et db/db sont caractérisés par expression accrue de MCH au niveau de l'hypothalamus (Stricker-Krongrad A *et al.* 2001; Mondal MS *et al.* 2002).

Les souris modifiées génétiquement pour surexprimer la MCH au niveau du LHA présentent une hyperphagie associée à une forte obésité et un diabète de type II (Ludwig DS *et al.* 2001).

Contrairement aux souris KO pour le NPY, l'AgRP et les orexines, les souris Pmch KO présentent une diminution de la prise alimentaire, une masse grasse réduite et une augmentation du métabolisme basal (Shimada M *et al.* 1998). Ces résultats montrent l'importance du système MCH, qui ne semble pas présenter de redondance avec les autres circuits neuronaux orexigène. Ce système représente donc une cible thérapeutique de choix pour contrecarrer l'obésité. De plus les souris issues d'un croisement entre les souris ob/ob et les souris Pmch KO présentent une atténuation du phénotype obèse (Segal-Lieberman G *et al.* 2003). Cependant ces souris doubles KO présentent une hyperphagie, du même ordre que les souris ob/ob ; l'atténuation de l'obésité observée est le résultat d'un métabolisme basal augmenté, caractérisé par une température corporelle élevée et une forte activité locomotrice.

L'injection centrale d'antagoniste du récepteur à la MCH, le MCHR-1 réduit la prise alimentaire et induit une perte de poids chez les rats DIOs (Borowsky B *et al.* 2002; Takekawa S *et al.* 2002). De manière surprenante, les souris MCHR-1 KO sont hyperphagiques mais conservent un poids normal, grâce à un métabolisme exagéré et une hyperactivité (Sleeman *et al.* 2004).

L'ensemble de ces résultats désigne la MCH comme un neuropeptide orexigène de grande importance, aussi bien dans la régulation de la prise alimentaire que dans la régulation de la dépense énergétique.

II.3. La Galanine.

Ce neuropeptide est exprimé dans l'ensemble du cerveau et plus précisément au niveau des noyaux paraventriculaires (PVN) de l'hypothalamus (Merchenthaler I *et al.* 1993).

Chez les rongeurs, un jeûne complet de 48h n'induit pas de modifications de l'expression de la Galanine. L'injection centrale de Galanine augmente la prise alimentaire mais plus faiblement que les principaux neuropeptides orexigènes et n'induit ni gain de poids ni obésité (Smith BK *et al.* 1994). L'injection centrale de leptine inhibe l'expression de la Galanine.

Les rats Zucker obèses (fa/fa) sont caractérisés par une surexpression de Galanine au niveau du PVN (Mercer J *et al.* 1996). Chez l'homme, des données contradictoires sont publiées chez les patients obèses, sans modification ou une légère augmentation de l'expression centrale de la Galanine.

Cependant, Les souris KO ou surexprimant la Galanine ne présentent pas de modifications de la prise alimentaire ou du métabolisme basal.

L'ensemble de ces résultats montre que la Galanine ne semble pas jouer un rôle important dans le contrôle de la balance énergétique. Néanmoins, la Galanine agit sur d'autres voies neuroendocriniennes comme l'axe GH, et l'axe HPT contrôlant la sécrétion des hormones thyroïdiennes, impliqués dans le contrôle des dépenses énergétiques (Wittmann G *et al.* 2004).

II.4. Le « Galanine-like Peptide » (GALP) .

Le GALP est proche structurellement de la Galanine et possède même une forte affinité pour le récepteur de la Galanine GAL2R. GALP est exprimé dans des neurones spécifiques du noyau arqué et de l'éminence médiane qui ne semblent pas exprimer d'autres neuropeptides orexigènes. Ces neurones expriment ObRb (Takatsu Y *et al.* 2001).

L'injection centrale de GALP entraîne une augmentation de la prise alimentaire 10 fois supérieure à celle induite par la Galanine (Matsumoto Y *et al.* 2002). Cependant, de façon surprenante pour un neuropeptide orexinogène, le jeûne induit chez le rat une baisse de l'expression de GALP, et cette diminution peut être contrecarrée par une injection de leptine (Jureus A *et al.* 2000).

Chez les souris ob/ob et les rats fa/fa, l'expression de GALP au niveau du noyau arqué est diminuée (Jureus A *et al.* 2001). Ces caractéristiques font de GALP un peptide orexinogène particulier, caractérisé par des actions opposées sur la balance énergétique.

III. Les neuropeptides anorexigènes de premier ordre.

III.1. La « Pro-OpioMelanoCortin » (POMC) et les Mélanocortines.

La « Pro-OpioMelanoCortin » (POMC) est synthétisée principalement au niveau de l'hypophyse, du noyau arqué de l'hypothalamus et du tractus solitaire. Cette pro-hormone est clivée par les « prohormones convertases » 1 et 2 (PC 1 et 2), pour produire plusieurs peptides regroupés sous la famille des Mélanocortines, comprenant entre autres l'« α -Melanocyte-Stimulating Hormone » (α MSH) et l'hormone adrénocorticotropine (ACTH). L' α MSH est considérée comme le membre de cette famille le plus important dans le contrôle de la balance énergétique au niveau central.

Le jeûne inhibe l'expression de POMC au niveau du noyau arqué, tandis que la prise alimentaire la stimule (Mizuno TM *et al.* 1998). L'injection centrale des mélanocortines α MSH et ACTH₍₁₋₂₄₎ induit une baisse de la prise alimentaire (Brown KS *et al.* 1998).

Les neurones POMC du noyau arqué expriment ObRb. L'injection de leptine induit une augmentation de l'expression de la POMC et active ces neurones en augmentant la fréquence des potentiels d'action (Schwartz MW *et al.* 1997; Cowley MA *et al.* 2001). L'insuline stimule également l'expression de la POMC (Tozawa F *et al.* 1988).

Les effets des mélanocortines sont médiés par une famille de récepteur (MCR) comprenant 5 membres. MC3-R et MC4-R sont fortement exprimés dans le cerveau. Ces 2 récepteurs peuvent lier l'ensemble des mélanocortines et sont impliqués dans le contrôle de la balance énergétique au niveau central. MC4-R est considéré comme le MCR le plus important dans la régulation de la prise alimentaire par les mélanocortines. MC4-R possède une forte affinité pour l' α MSH. Les souris KO pour MC4-R présentent une sévère obésité et un métabolisme perturbé. Des mutations de ce récepteur sont également retrouvées dans des cas d'obésité humaine (Vaisse C *et al.* 1998). Les souris MC3R KO ne présentent pas de modifications de la prise alimentaire, ni un gain de poids, mais présente une masse adipeuse supérieure (en % de poids total) et une dépense énergétique réduite (Butler AA *et al.* 2000).

Comme nous l'avons vu le neuropeptide orexinogène AgRP est un antagoniste de ces récepteurs suggérant une inhibition réciproque entre les neurones orexinogènes et anorexinogènes de premier ordre.

III.2. Les « Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript » (CART).

Les CART sont un ensemble de peptides issus du clivage d'un précurseur commun (Thim L *et al.* 1999). Les CART sont principalement exprimés au niveau du noyau arqué, dans les mêmes neurones exprimant POMC.

Le jeûne induit une baisse de l'expression de CART dans le noyau arqué. L'injection de CART entraîne une baisse de la prise alimentaire et une perte de poids même chez l'obèse (Larsen PJ *et al.* 2000). Les neurones CART expriment ObRb et l'injection de leptine augmente l'expression de CART au niveau du noyau arqué (Kristensen P *et al.* 1998).

L'injection de CART induit également une augmentation des « UnCoupling Protein » (UCP) I, II et III dans le tissu adipeux et le muscle, suggérant un rôle important de CART dans le métabolisme énergétique (Wang CF *et al.* 2000).

La prise alimentaire des souris KO pour CART n'est pas modifiée, mais celles-ci présentent une augmentation de poids faible mais significative témoin d'une modification de la balance énergétique (Wierup N *et al.* 2005).

IV. Les neuropeptides anorexigènes de second ordre.

IV.1. La « Corticotropin-Releasing Hormone » (CRH) et les Urocortines.

CRH est en réalité une famille de neuropeptides comprenant au moins 4 membres : la CRH elle-même et les Urocortines I, II et III (UCNI, II, III). La CRH est un neuropeptide impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques comme le stress, la fonction cardiaque, l'inflammation, la prise alimentaire.

Au niveau de l'hypothalamus, la CRH est localisée principalement au niveau du noyau paraventriculaire. Son injection centrale inhibe la prise alimentaire chez les rongeurs et induit également une modification de l'activité du système nerveux sympathique ainsi qu'une augmentation de l'activité locomotrice.

Selon l'« état métabolique » la leptine semble avoir des effets opposés sur la CRH. L'injection centrale de cette hormone inhibe l'expression de ce neuropeptide et l'activité des neurones CRH dans les périodes de jeûne, et stimule au contraire son expression et l'activité des neurones CRH dans les périodes de satiété (Huang Q *et al.* 1998; Uehara Y *et al.* 1998).

CRH est également exprimé dans l'hypophyse et participe fortement à l'axe hypothalamo-hypophysaire-adrenal (HPA) en stimulant la synthèse d'ACTH et donc de glucocorticoïdes au niveau de la glande adrénale.

Les souris KO pour CRH ne présentent pas de modification majeure de leur balance énergétique malgré une perturbation de l'axe HPA et une déficience en glucocorticoïdes (Muglia L *et al.* 1995). Cependant les souris KO pour MCHR-1 (ayant une affinité préférentielle pour la CRH) présentent une modification de la prise alimentaire (Muller MB *et al.* 2000).

L'UCNI est exprimé au niveau périphérique et central, principalement au niveau de l'aire hypothalamique latérale. Chez le rat, l'injection d'UCNI entraîne des effets plus importants sur la régulation de la prise alimentaire que la CRH.

La leptine ne semble pas intervenir *via* UCNI pour médier ses effets anorexinogènes (Okamoto S *et al.* 2001). Cependant, le transport de UCNI à travers la barrière hémato-encéphalique est stimulé par la leptine (Kastin AJ *et al.* 2000), et l'expression CRH2-R (ayant une forte affinité pour les Urocortines), est corrélé aux niveaux plasmatiques de leptine (Nishiyama *et al.* 1999). Les souris KO pour MCHR-2 sont hypersensitives au stress, s'alimentent normalement excepté suite à une période de jeûne prolongé ou elles diminuent leur prise alimentaire (Bale TL *et al.* 2000).

UCNII est exprimé dans de nombreuses structures du cerveau, dont les noyaux arqués et paraventriculaire. Elle inhibe également la prise alimentaire chez le rat (Reyes TM *et al.* 2001). Les rôles de l'UCNIII sont encore mal définis.

IV.2. La “Thyrotropin-Releasing Hormone” (TRH).

Le clivage de la préproTRH produit plusieurs peptides regroupés sous le terme TRH. La TRH est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques dont le contrôle de la balance énergétique, la régulation de fonctions cognitives, la douleur... La TRH est fortement exprimé au niveau du noyau hypothalamique paraventriculaire (PVN), qui est le centre principal de l'action de la TRH sur la balance énergétique (Segerson TP *et al.* 1987).

Ce neuropeptide est également primordial dans le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien (HPT): la TRH, en stimulant la sécrétion de la « thyroïd-stimulating hormone » (TSH) au niveau hypophysaire, contrôle la sécrétion des hormones Thyroxine (T4) et Triiodothyroxine (T3) par la glande thyroïde. C'est *via* T4 et surtout T3 (l'hormone active) que la TRH induit une grande partie de ses effets physiologiques.

En période de jeûne total, l'expression de la préproTRH dans le PVN et la sécrétion de TRH diminuent (Van Haasteren GA *et al.* 1995). L'injection centrale de TRH inhibe la prise alimentaire (Vijayan E et McCann SM 1977). En période de jeûne, l'injection central de leptine (mais pas d'insuline) chez le rat induit une augmentation de l'expression de préproTRH chez le rat (Fekete C *et al.* 2006).

Les neurones TRH du PVN sont innervés par les neurones orexigènes (NPY et AgRP) et anorexigènes (POMC et CART) du noyau arqué de l'hypothalamus (Toni R *et al.* 1990). Chez les rongeurs, l' α MSH stimule la synthèse de preproTRH (Kim MS *et al.* 2000) tandis que l'injection centrale de NPY réduit les taux plasmatiques de T3/T4 et l'expression de la préproTRH au niveau du PVN (Fekete C *et al.* 2001).

Plus que son action sur la prise alimentaire, le rôle de la TRH est de contrôler les dépenses énergétiques. Ainsi, la TRH et les hormones thyroïdes stimulent la thermogenèse, et l'activité locomotrice. Curieusement, chez les patients obèses, les taux circulants de T3/T4, TRH et TSH semblent comparables aux individus sains. Cependant, ces résultats varient selon les études menées. Ainsi des cas d'obésité ont été associés avec un taux de T3 supérieur à la normale, et d'autres avec une sensibilité de la TSH pour la TRH accrue (pour revue : Douyoun L, *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 31, 173-89). Dans tous les cas, les modifications de l'axe HPT ne semblent n'être qu'une réponse adaptative à l'état physiologique qu'est l'obésité, et ne semblent pas participer à l'étiologie de cette pathologie.

IV.3. L'ocytocine.

L'ocytocine est exprimée par des neurones localisés dans le noyau hypothalamique PVN. L'ocytocine est également sécrétée en tant qu'hormone au niveau du lobe postérieur de la neurohypophyse. L'ocytocine est impliquée dans la régulation de la prise alimentaire, de la mobilité gastrique. Elle joue également un rôle important dans l'accouchement et la lactation (voir chapitre sur la neurohypophyse). L'injection centrale de ce neuropeptide induit une réduction de la prise alimentaire (Olson BR *et al.* 1991a). Les neurones à ocytocine expriment ObRb (Hakansson M-L *et al.* 1998), et une libération d'ocytocine en réponse à une administration cérébrale de leptine contribue à la limitation de la prise de nourriture chez le rat (Blevins JE *et al.* 2004).

L'ocytocine est également stimulée par la CRH (Bruhn TO *et al.* 1986). De plus les récepteurs de CRH (CRHR-1 et CRHR-2) sont exprimés dans les neurones à ocytocine du

PVN (Arima H et Aguilera G 2000). L'injection d'antagoniste de l'ocytocine bloque également l'effet anorexigène induit par la CRH (Olson BR *et al.* 1991b). L'ocytocine est donc le médiateur des effets de la CRH, au moins ceux concernant la prise alimentaire.

IV.4. La neurotensine (NT).

La neurotensine est produite par le clivage protéique de son précurseur, la préproneurotensine. Ce neuropeptide est exprimé principalement au niveau des noyaux arqués, paraventriculaire, et dorsomédian de l'hypothalamus.

L'injection de neurotensine inhibe la prise alimentaire (Levine AS *et al.* 1983). Les neurones à neurotensine expriment le récepteur de la leptine (Hakansson M-L *et al.* 1998), et l'injection de cette hormone adipocytaire induit une augmentation de l'expression de préproneurotensine/neurotensine et le traitement avec des antagonistes de la neurotensine semble bloquer l'effet anorexigène de la leptine (Sahu A *et al.* 2001). De plus, l'expression de la préproneurotensine est réduite dans les modèles d'obésité génétiques (souris ob/ob et rats Zucker fa/fa) (Beck B *et al.* 1989; Williams G *et al.* 1991).

IV.5. Les « Glucagon-like peptide » 1 et 2 (GLP1 et GLP2).

Les GLP1 et GLP2 possèdent une forte homologie avec le glucagon et sont produits à partir du proglucagon. Ces 2 peptides sont exprimés au niveau du tube digestif, de l'hypothalamus et du noyau du tractus solitaire au niveau central (Drucker DJ et Asa S 1988).

Chez les rongeurs, le jeûne induit une diminution de l'expression du proglucagon et des niveaux de GLP1 au niveau central, diminution qui peut être compensée par l'injection de leptine (Goldstone AP *et al.* 2000). Les taux circulants de GLP2 sont également réduits en période de jeûne (Brubaker PL *et al.* 1997).

L'injection de GLP1 et GLP2 réduit la prise alimentaire chez le rat (Turton MD *et al.* 1996; Tang-Christensen M *et al.* 2000). Dans les deux cas, la période de réduction de la prise alimentaire est courte, et le poids total des rats sur 24h ne semble pas évoluer. De plus les souris GLP1 KO ne présentent pas de modifications de la prise alimentaire, et répondent de la même manière à la leptine que les souris sauvages (Scrocchi LA *et al.* 1997). GLP1 ne semble donc pas jouer un rôle prépondérant dans la régulation de la prise alimentaire. Cependant ces souris KO présentent une modification du métabolisme du glucose et une sensibilité à l'insuline qui semble accrue.

L'injection de GLP1 induit un phénomène d'aversion qui pourrait en partie expliquer ses effets anorexigènes. En partie seulement, car les neurones à GLP1 innervent les noyaux arqué et paraventriculaire, où ils inhibent les effets de NPY sur la prise alimentaire (Furuse M *et al.* 1997).

Publications

Article 1

Article soumis (2007)

Endocytosis of Ob-Rb is Constitutive and Necessary for Full Leptin Signalling to Occur

Short running title: Endocytosis of Ob-Rb

Sébastien Smallwood¹, Martina Pyrski², Amanda Morris³, Perry Barrett³, Janice E. Drew³, Hichem C. Mertani¹, Wolfgang Meyerhof², Gérard Morel¹, Lynda M. Williams³

¹CNRS UMR 5123, Université Claude Bernard, Lyon, France, ²Department of Molecular Genetics, German Institute of Human Nutrition, Potsdam-Rehbruecke, Nuthetal, Germany, ³Metabolic Health Group, Rowett Research Institute, Greenburn Rd, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9SB United Kingdom.

Corresponding author Sébastien Smallwood, CNRS UMR 5123, Bâtiment R. Dubois/404, 3e étage, Université Claude Bernard Lyon 1, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex
Tel. 33 (0) 4 72 43 29 27 Fax 33 (0) 4 72 43 29 27 sebastien.smallwood@univ-lyon1.fr

Abstract

Receptor endocytosis is an important mechanism in the regulation of agonist stimulated cell signalling. Both leptin stimulated and leptin independent constitutive endocytosis of the long signalling form of the leptin receptor (Ob-Rb) have been reported in separate studies. In the present study using HEK 293 cells, transfected with Ob-Rb tagged with green fluorescent protein (Ob-Rb-GFP), both leptin independent constitutive endocytosis and leptin induced down-regulation of Ob-Rb at the cell surface were demonstrated. Fluorescence microscopy revealed that, in both unstimulated and leptin challenged cells, Ob-Rb-GFP was found at the plasma membrane, in early endosomes and mainly in the Golgi/Trans-Golgi network (Golgi/TGN). The size of the Golgi/TGN pool increased in leptin challenged cells while receptor number at the cell membrane, measured by [¹²⁵I]leptin binding, diminished. Cyclohexamide pre-treatment of cells prevented the leptin induced accumulation of Ob-Rb-GFP in the Golgi/TGN, indicating that it consisted of *de novo* synthesised Ob-Rb-GFP. Hypertonic sucrose, an inhibitor of clathrin dependent endocytosis had no discernable effect on the leptin stimulated receptor accumulation indicating that endocytosed receptors did not contribute greatly to this process. Inhibition of receptor endocytosis, by co-transfection with dominant negative dynamin construct, K44A, prevented leptin stimulated activation of STAT3 but the IRS1-PI3K and MAPK pathways were largely unaffected indicating that receptor endocytosis is required for full leptin signalling to take place and thus plays a key role in the cellular response to leptin but does not appear to control Ob-Rb residency at the cell surface.

Article 2

Obesity (Silver Spring)
2006 May;14(5):778-86

Electrophysiological Characterization of Left Ventricular Myocytes from Obese Sprague-Dawley Rat

Estelle Ricci, Sébastien Smallwood, Christophe Chouabe, Hichem C. Mertani, Mireille Raccurt, Gérard Morel, and Robert Bonvallet

Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 5123, Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, Université Lyon I, Campus La Doua, Villeurbanne, France.

Corresponding author Robert Bonvallet, Unité Mixte de Recherche Centre National de la Recherche Scientifique 5123, Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, Université Lyon I, Campus La Doua, 69622 Villeurbanne, France. E-mail: Robert.Bonvallet@univ-lyon1.fr

Objective: Obesity is a complex multifactorial disease that is often associated with cardiac arrhythmias. Various animal models have been used extensively to study the effects of obesity on physiological functions, but no study related to ionic membrane currents has been performed on isolated cardiac myocytes. Therefore, we examined the electrophysiological characteristics of four ionic currents from isolated left ventricular myocytes of a high-energy (HE)-induced obesity rat model.

Research Methods and Procedures: Male Sprague-Dawley rats were fed with either a control diet or a diet containing 33% kcal as fat (HE) for 14 weeks starting at 6 weeks of age. Voltage-clamp experiments were performed on ventricular myocytes. Leptin receptor expression was measured using ObR enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: In the HE group, rats designated as obese did not develop a cardiac hypertrophy, either at the organ level or at the cellular level. Densities and kinetics of the L-type calcium current, the transient outward potassium current, the delayed rectifier potassium current, and the sodium-calcium exchange current (INCX) were not significantly different between control and obese rats. A down-regulation of leptin receptor expression was evidenced in the heart of obese rats compared with controls. Acute exposure (5 minutes) of leptin (100 nM) did not induce a significant modification in the current densities either in control or in obese rats, except for INCX density measured in control rats.

Discussion: The absence of effect of leptin on INCX in obese rats could be a potential arrhythmogenic substrate in obesity.

Key Words: diet-induced obesity • cardiac ionic currents • leptin receptors

Online Article : <http://www.obesityresearch.org/cgi/content/abstract/14/5/778>

Article 3

Neuroendocrinology
Vol. 82, No. 5-6, 2005

Cloning, Expression and Regulation of Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factors (COUP-TFII and EAR-2) in the Rat Anterior Pituitary Gland

Mireille Raccurt^a, Sébastien Smallwood^a, Hichem C. Mertani^a, Dominic Devost^b, Khédidja Abbaci^a, Jean-Marie Boutin^c, Gérard Morel^a

^aUMR 5123 CNRS Université Claude Bernard Lyon I, Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, Villeurbanne, France;

^bDepartments of Medicine, Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal,

^cDivision of Endocrinology, Centre Hospitalier de l'Hôtel-Dieu, Université de Montréal, Montréal, Canada

Corresponding author Gérard Morel UMR 5123 CNRS UCBL, Bât. R. Dubois, Université Claude Bernard-Lyon 1 43, Boulevard du 11 Novembre 1918 FR-69622 Villeurbanne Cedex (France)
Tel./Fax +33 472 432 927, E-Mail gerard.morel@univ-lyon1.fr

Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors (COUP-TF)-II (NR2F2) and EAR-2 (NR2F6) are structurally related orphan members of the nuclear receptors superfamily. There are growing evidences that these factors play important roles during processes of differentiation and proliferation of several tissues. To better understand their role in the differentiated adult rat pituitary gland, we cloned COUP-TFII and EAR-2 cDNAs from an anterior pituitary cDNA library. Subsequently, we raised and characterized specific antibodies to the N-terminal domain of both nuclear receptors. We next examined their cellular and subcellular distribution in the pituitary gland and determined their regulation during pregnancy. COUP-TFII and EAR-2 pituitary genes display, respectively, 90 and 100% homologies with their human and mouse homologues. Cellular expression of both nuclear receptors was mainly detected in the lactotropes of male and female rats, with a prominent distribution in the nuclear compartment for EAR-2, and interestingly both proteins were significantly upregulated in pituitaries of pregnant vs. cycling female rats. Thus, our results have characterized cloning of rat pituitary COUP-TFII and EAR-2 genes, demonstrated that they are both specifically expressed in lactotropes, and strongly suggested that they may play an important role in modulating prolactin (PRL) gene expression during pregnancy

Key Words: Orphan receptors; Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factors; Cloning; Prolactin; Pregnancy; Immunohistochemistry; Molecular neuroendocrinology

Online Article : <http://dx.doi.org/10.1159/000092752>

Article 4

Proc Natl Acad Sci U S A.
2005 Nov 15;102(46):16880-5

Revealing the large-scale network organization of growth hormone-secreting cells

Xavier Bonnefont^{*,†}, Alain Lacampagne^{†,‡}, Angela Sanchez-Hormigo^{*,†}, Elodie Fino^{*,§}, Audrey Creff^{*,¶}, Marie-Noelle Mathieu^{*}, Sébastien Smallwood^{*,||}, Danielle Carmignac^{**,¶}, Pierre Fontanaud^{*}, Pierre Travo^{††}, Gérard Alonso^{*}, Nathalie Courtois-Coutry^{*}, Steve M. Pincus^{††}, Iain C. A. F. Robinson^{**,§§}, and Patrice Mollard^{*,§§}

^{*}Department of Endocrinology, Institute of Functional Genomics, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5203, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U661, Universities of Montpellier 1 and 2, 141 Rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 05, France; [†]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U637, Centre Hospitalier Universitaire Arnaud de Villeneuve, 34295 Montpellier Cedex 05, France; ^{**}Division of Molecular Neuroendocrinology, National Institute of Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, United Kingdom; ^{††}Montpellier RIO Imaging, Centre de Recherches de Biochimie Macromoléculaire, Formation de Recherche en Evolution 2593, Centre National de la Recherche Scientifique, 1919 Route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 05, France; and ^{††}990 Moose Hill Road, Guilford, CT 06437

Corresponding author Patrice Mollard, Department of Endocrinology, Institute of Functional Genomics, 141 Rue de la Cardonille, 34094 Montpellier Cedex 05, France. E-mail: patrice.mollard@igf.cnrs.fr.

Pituitary growth hormone (GH)-secreting cells regulate growth and metabolism in animals and humans. To secrete highly ordered GH pulses (up to 1,000-fold rise in hormone levels *in vivo*), the pituitary GH cell population needs to mount coordinated responses to GH secretagogues, yet GH cells display an apparently heterogeneous scattered distribution in 2D histological studies. To address this paradox, we analyzed in 3D both positioning and signaling of GH cells using reconstructive, two-photon excitation microscopy to image the entire pituitary in GH-EGFP transgenic mice. Our results unveiled a homologous continuum of GH cells connected by adherens junctions that wired the whole gland and exhibited the three primary features of biological networks: robustness of architecture across lifespan, modularity correlated with pituitary GH contents and body growth, and connectivity with spatially stereotyped motifs of cell synchronization coordinating cell activity. These findings change our view of GH cells, from a collection of dispersed cells to a geometrically connected homotypic network of cells whose local morphology and connectivity can vary, to alter the timing of cellular responses to promote more coordinated pulsatile secretion. This large-scale 3D view of cell functioning provides a powerful approach to identify and understand other networks of endocrine cells that are thought to be scattered *in situ*. Many dispersed endocrine systems exhibit pulsatile outputs. We suggest that cell positioning and associated cell-cell connection mechanisms will be critical parameters that determine how well such systems can deliver a coordinated secretory pulse of hormone to their target tissues.

Key Words: biological rhythms; endocrinology; systems biology; connectivity; calcium

Online Article : <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0508202102>

Full Text (Open Access Article) : <http://www.pnas.org/cgi/content/full/102/46/16880>