



HAL
open science

Le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique : impact de l'environnement maternel et implication du CNTF

Odile Couvreur

► **To cite this version:**

Odile Couvreur. Le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique : impact de l'environnement maternel et implication du CNTF. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T112 . tel-00769940

HAL Id: tel-00769940

<https://theses.hal.science/tel-00769940>

Submitted on 4 Jan 2013

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.

UNIVERSITE PARIS-SUD 11
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

Année universitaire 2010-2011

N°

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11

Spécialité Neuroendocrinologie
Ecole Doctorale « Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie »

Présentée et soutenue publiquement par

Odile COUVREUR

21 décembre 2011

Le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique :
impact de l'environnement maternel et implication du CNTF

Directeurs de thèse : **Dr Claire-Marie VACHER & Pr. Mohammed TAOUIS**

JURY

M^{me} Anne GUIOCHON-MANTEL
Mr Jacques EPELBAUM
Mr Didier VIEAU
M^{me} Monique LAVIALLE
M^{me} Valérie GRANGE-MESSENT
Mr. Ralph JOCKERS
Mr Mohammed TAOUIS
M^{me} Claire-Marie VACHER

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Examinateur
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

UNIVERSITE PARIS-SUD 11
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

Année universitaire 2010-2011

N°

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD 11

Spécialité Neuroendocrinologie
Ecole Doctorale « Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie »

Présentée et soutenue publiquement par

Odile COUVREUR

21 décembre 2011

Le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique :
impact de l'environnement maternel et implication du CNTF

Directeurs de thèse : **Dr Claire-Marie VACHER & Pr. Mohammed TAOUIS**

JURY

M^{me} Anne GUIOCHON-MANTEL
Mr Jacques EPELBAUM
Mr Didier VIEAU
M^{me} Monique LAVIALLE
M^{me} Valérie GRANGE-MESSENT
Mr Ralph JOCKERS
Mr Mohammed TAOUIS
M^{me} Claire-Marie VACHER

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Examinateur
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

Résumé

Le maintien de l'homéostasie énergétique est placé sous le contrôle de cytokines qui agissent dans le système nerveux central, notamment au niveau de l'hypothalamus. En particulier, la leptine, cytokine produite par le tissu adipeux, diminue la prise alimentaire et stimule la perte de poids. L'obésité est une épidémie mondiale qui progresse de façon alarmante, notamment chez les enfants et souvent associée à des pathologies sévères et des désordres endocriniens comme la résistance à la leptine ou à l'insuline. Le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) est une neurocytokine de la même famille que la leptine dont l'un des principaux avantages est qu'il stimule la perte de poids dans les cas de leptino-résistance en activant les mêmes voies de signalisation que la leptine (Benomar et al., 2009). Face à l'épidémie mondiale d'obésité, chez la population adulte comme infantile, il apparaît nécessaire de décrypter les mécanismes impliqués dans la genèse de la maladie ainsi que les potentiels agents thérapeutiques.

L'objectif premier de ce travail de thèse a été de caractériser l'impact d'une alimentation maternelle hyperlipidique (HF) sur les capacités de contrôle de l'homéostasie énergétique chez la descendance. En effet, le concept de « programmation métabolique » propose que des perturbations de l'environnement périnatal puissent influencer durablement la descendance, la rendant plus susceptible de développer une obésité dans un contexte nutritionnellement riche. Des études menées au sein du laboratoire ont montré qu'un régime maternel HF pouvait programmer l'acquisition de la leptino-résistance chez la descendance à l'âge adulte (Ferezou-Viala et al., 2007b). Nous avons donc testé la prédisposition de ces animaux à prendre du poids lorsqu'ils étaient nourris avec un régime hypercalorique (P). Nos données ont montré qu'étonnamment, le régime maternel HF protégeait la descendance contre le gain de poids induite par le régime P, induisait des modifications d'expression des marqueurs de l'homéostasie énergétique dans le foie et l'hypothalamus, ainsi que de profondes réorganisations cytoarchitectoniques dans le noyau arqué. Plus précisément, le régime maternel HF était associé à une réorganisation de la couverture astrocytaire périvasculaire dans le noyau arqué de la descendance qui persistait à l'âge adulte.

Dans une seconde partie de la thèse, nous avons étudié les mécanismes d'action du CNTF. En effet, notre équipe a récemment mis en évidence que le CNTF endogène pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Les niveaux hypothalamiques de cette cytokine, présente dans les astrocytes et les neurones du noyau arqué, augmentent chez les animaux résistants à une alimentation hypercalorique. Cela pourrait suggérer un rôle protecteur du CNTF contre la prise de poids chez certains individus (Vacher et al., 2008). A ce jour, les mécanismes d'action du CNTF restent cependant mal compris car ce dernier ne possède pas de peptide signal et n'est donc pas sécrété selon des mécanismes d'exocytose classiques. Partant du constat que le CNTF et ses sous-unités réceptrices étaient distribuées de façon similaire dans les cellules du noyau arqué, nous avons émis l'hypothèse que le CNTF pourrait exercer une action intracellulaire sur les cellules de cette structure. Dans cette étude nous démontrons que le CNTF peut interagir directement avec ses récepteurs dans le noyau des neurones anorexigènes du noyau arqué, pour réguler leur activité transcriptionnelle. Ces données proposent ainsi un nouveau mécanisme à l'action anorexigène du CNTF.

Mots-clefs : homéostasie énergétique - leptino-résistance - noyau arqué- régime maternel HF - CNTF - noyau - astrocytes - microscopie confocale- microscopie électronique à transmission-immunohistochimie - *run on*

Publications et communications

Publications soumises à un comité de lecture

Couvreur O., Aubourg A., Crépin D., Degrouard J., Gertler A., Taouis M., Vacher CM. The anorexigenic cytokine Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) activates its receptor in the nucleus of hypothalamic neurons that control energy balance. En revision dans American Journal of Physiology - Endocrinology & Metabolism

Couvreur O., Ferezou J, Gripois D, Serougne C, Crépin D, Aubourg A, Gertler A, Vacher CM, Taouis M. Unexpected Long-Term Protection of Adult Offspring Born to High-Fat Fed Dams against Obesity Induced by a Sucrose-Rich Diet. PLoS One. 2011 Mar 25;6(3)

Vacher C.-M. Crépin D., Aubourg A., Couvreur O., Bailleux V., Nicolas V., Férézou J, Gripois D., Gertler A., Taouis M. A putative physiological role of hypothalamic CNTF in the control of energy homeostasis. FEBS Letters, 2008.

Publications non soumise à un comité de lecture

Vacher CM., Couvreur O., Basire E., Aubourg A., Crépin D., Berthou F., Vicaire N., Taouis M. Brain Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) and hypothalamic control of energy homeostasis. OCL, 2011.

Communications

Couvreur O., Aubourg, A., Crépin, D., Degrouard, J., Gertler, A., Taouis, M., Vacher, C.-M. The anorexigenic cytokine Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) activates its receptor in the nucleus of hypothalamic neurons that control energy balance. 10e colloque de la Société des Neurosciences. Marseille 2011. Communication affichée

Couvreur O., Ferezou J., Crépin D., Aubourg A., Gripois D., Sérougne C., Gertler A., Vacher CM., Taouis M. Impact of a maternal high fat diet on rat hypothalamic development. Congrès « Lipids and brain » de la Société Française de l'Etude des Lipides. Paris 2011. Communication affichée

Couvreur O., Férézou-Viala J, Crépin D, Aubourg A, Basire E, Gripois D, Taouis M & Vacher CM. Impact of a maternal hyperlipidic diet on the expression of hypothalamic regulators of energy homeostasis in rats. 36e Colloque de la Société de Neuroendocrinologie. Nice 2009. Communication affichée

Vacher C.-M. Crépin D., Aubourg A., Couvreur O., Bailleux V., Nicolas V., Férézou J, Gripois D., Gertler A., Taouis M. Le CNTF : un modulateur endogène de la prise alimentaire. Journée IFR 144 Neurosud-Paris. Gif-sur-Yvette. Novembre 2008. Communication orale.

Vacher CM., Aubourg A., Crépin D., Couvreur O., Grillier M., Nicolas V., Degrouard J., Jaillard D., Taouis M. Localization and expression regulation of CNTF and its receptor subunits in the rat arcuate nucleus. 8e Colloque de la Société des Neurosciences. Montpellier. 2007. Communication affichée.

Encadrements de stagiaires et enseignements

Année universitaire 2009-2010 : Université Paris-Sud 11

Stage de L2, François Sengelen : « Impact d'une alimentation hypercalorique sur la couverture astrocytaire du noyau arqué de rat »

Année universitaire 2010-2011 : Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

LSBI 338 : TP « Physiologie de la glande mammaire » Niveau L2 (15 heures)

LSBI 434 : TP « Clairance rénale » Niveau L2 (24 heures)

LSBI 434 : TD « Fonctionnement harmonieux du coeur et des reins » Niveau L2 (15 heures)

LSBI 635 : TP « Absorption intestinale du glucose » Niveau L3 (8 heures)

Année universitaire 2009-2010 : Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

LSBI 338 : TP « Physiologie de la glande mammaire » Niveau L2 (20 heures)

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury qui me font l'honneur d'avoir accepté de juger ce travail de thèse malgré leurs charges respectives :

Messieurs **Jacques Epelbaum** et **Didier Vieau**, pour l'intérêt qu'ils ont manifesté pour ces travaux en acceptant d'être rapporteurs et pour l'attention qu'ils porteront à la lecture de ce manuscrit

Mesdames **Monique Lavielle** et **Valérie Grange-Messent** et Monsieur **Ralph Jockers**, qui ont accepté de me faire bénéficier de leurs grandes compétences en tant qu'examineurs

Madame **Anne Guiochon-Mantel**, qui a bien voulu délaissé un instant ses patients pour présider ce jury

Mes remerciements iront ensuite vers mes encadrants de thèse :

Madame **Claire-Marie Vacher** pour la confiance qu'elle m'a témoignée en m'acceptant d'abord en tant que stagiaire puis comme étudiante en thèse. Je la remercie d'avoir jonglé entre cours, travaux de recherche et stagiaires pour s'impliquer dans l'encadrement de ma thèse. Je retiendrai son formidable enthousiasme scientifique ainsi que la confiance totale qu'elle m'a accordée.

Monsieur **Mohammed Taouis** qui a succédé à Madame **Jacqueline Férézou** dans l'encadrement de ma thèse. Je leur suis particulièrement reconnaissante de m'avoir guidée dans la démarche scientifique à suivre tout au long de ces années, toujours avec gentillesse, compréhension et respect.

Merci à l'ensemble de l'équipe de Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire pour m'avoir si gentiment accueillie au sein du groupe, et tout particulièrement à Monsieur **Alain Aubourg** et Madame **Delphine Crépin** pour leur aide lors des manipulations.

Je remercie enfin les personnes qui m'ont permis d'acquérir une première expérience réussie de l'enseignement :

Madame **Iman Laziz**, Monsieur **Nicolas Meunier** et Mademoiselle **Stéphanie Rimbaud**, qui ont fait des heures de TP, TD et des réunions-enseignement des moments très enrichissants scientifiquement et que je n'oublierai pas.

LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS	11
LISTE DES ILLUSTRATIONS	13
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
Partie A. Le contrôle central de l'homéostasie énergétique.....	16
1. Définition de l'homéostasie énergétique	16
2. L'hypothalamus	16
2.1. Présentation de l'hypothalamus	16
2.1.1. Localisation anatomique.....	16
2.1.2. Connexions et principales fonctions.....	17
2.1.3. Rôle de l'hypothalamus dans le contrôle de la prise alimentaire	17
2.2. Neuroanatomie de l'hypothalamus ventro-médian	19
2.2.1. Les noyaux hypothalamiques de 1 ^{er} ordre	19
Le noyau arqué : ARC	19
2.2.2. Les noyaux hypothalamiques de 2 nd ordre	22
Le noyau hypothalamique paraventriculaire : PVN ou PVH	23
Le noyau hypothalamique ventromédian : VMH	23
Le noyau hypothalamique dorsomédian : DMH	24
L'aire hypothalamique latérale : LHA	25
3. Les signaux de régulation de la prise alimentaire.....	27
3.1. Les Signaux de régulation à court terme	27
3.1.1. Les nutriments	27
Les protéines et acides aminés	27
Le glucose	28
Les acides gras libres	29
3.1.2. Les hormones gastro-intestinales.....	29
Les cholecystokinines : CCK	29
Les Glucagon-Like-Peptides : GLP-1 et GLP-2	30
Le peptide YY : PYY₃₋₃₆	30
La Ghréline	31
3.2. Les Signaux de régulation à long terme	33
3.2.1. La leptine.....	33
Découverte de la leptine et clonage du gène « obese »	33
Synthèse et sécrétion	34
L'isoforme longue : ObRb.....	38
L'isoforme soluble : ObRe	41
Les isoformes courtes : ObRa, c, d, f.....	41

Effets biologiques	43
Effets biologiques au niveau du système nerveux central.....	43
Le contrôle de l'homéostasie énergétique.....	43
La plasticité cellulaire et la cognition.....	45
Effets biologiques au niveau des organes périphériques.....	46
3.3. Bilan sur les signaux de régulation.....	48
3.4. Les voies d'entrée des signaux dans l'hypothalamus.....	49
3.4.1. Les interfaces sang,LCR (Liquide-Céphalo-Rachidien)/cerveau.....	49
Historique	49
La barrière hémato-encéphalique : BHE	49
Les organes circumventriculaires et les plexus choroïdes	51
Les organes circumventriculaires : CVOs.....	51
Un exemple d'organe circumventriculaire : l'éminence médiane.....	52
Les plexus choroïdes (PC).....	52
Les interfaces du noyau arqué	53
Accès des signaux de régulation de l'homéostasie énergétique	54
Transport de la leptine au niveau central.....	55
Partie B. La programmation métabolique	57
1. Le concept de programmation.....	57
1.1. Définition.....	57
1.2. Programmation métabolique et obésité.....	58
1.2.1. L'hypothèse du phénotype économe.....	58
1.2.2. Le poids de naissance : un indicateur du poids adulte ?.....	59
2.1. Période périnatale et développement de l'hypothalamus chez le rongeur.....	60
2.2.1. Cinétique de développement des circuits hypothalamiques.....	60
Neurogenèse	61
Développement des projections neuronales	61
2.2.2. Signaux développementaux.....	62
Les effets développementaux de la leptine	63
2.2. Période périnatale et leptino-résistance maternelle.....	66
2.1.1. La leptino-résistance : présentation.....	66
Définition, mécanismes et modèles animaux	66
Contrecarrer la leptino-résistance avec le CNTF	67
Découverte.....	67
Séquence et structure.....	67
Synthèse et sécrétion.....	68
Signalisation.....	70
La signalisation du CNTF.....	70
<i>Présentation succincte</i>	70
<i>Le récepteur du CNTF</i>	71
La sous-unité réceptrice α : le CNTFR α	72
Activation du récepteur du CNTF.....	75

<i>Les voies de signalisation du CNTF</i>	76
Les effets biologiques du CNTF	76
2.1.2. Gestation, lactation et leptino-résistance maternelle	80
3. Perturbations de la nutrition maternelle : modèles rongeurs	80
3.1. La sous-nutrition maternelle.....	81
3.2. La suralimentation maternelle	83
Partie C. Objectifs du travail de thèse	85
PROCEDURES EXPERIMENTALES.....	87
1. Animaux.....	89
1.1 Provenance et reproduction	89
1.2 Hébergement	89
1.3 Modèles et régimes alimentaires	89
1.3.1 Modèle d'obésité induite par l'alimentation : le rat DIO (Diet Induced Obésity)	89
1.3.2. Modèle de programmation métabolique.....	91
Modifier l'environnement périnatal	91
Modifier l'environnement gestationnel et postnatal : le protocole « long »	91
Modifier l'environnement postnatal : le protocole « court »	92
Tester la prédisposition de la descendance à devenir obèse	93
1.3.3. Modèle Zucker.....	94
2. Immunohistochimie	95
2.1. Protocole succinct	95
2.1.1. Préparation des tissus.....	95
2.2. Marqueurs de la plasticité hypothalamique.....	96
2.2.1. La glie et le compartiment vasculaire.....	96
2.2.2 Le CNTF et ses sous-unités réceptrices.....	97
2.3. Evaluation de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique.....	97
2.3.1. Mesure de la diffusion du bleu trypan dans l'ARC	97
Principe	97
Protocole	98
3. Microscopie.....	98
3.1. Microscopie confocale	98
3.2. Microscopie électronique en transmission	98
3.3. Traitement des images.....	99
3.3.1. Images acquises par microscopie confocale.....	99
Analyses des particules : immunomarquages S100β	99
Analyses des surfaces : immunomarquages GFAP, Glut-1, Vimentine, Lectine, Laminine, diffusion du bleu trypan dans l'ARC	99
Analyses des doubles marquages GFAP-Laminine	99
3.3.2. Images acquises par microscopie électronique à transmission.....	100
Analyses des particules d'or	100

Distribution cellulaire	100
4. Statistiques	100
RESULTATS	102
Etude 1	104
Présentation de l'étude	105
Principaux résultats	106
Etude 2	113
Présentation de l'étude	114
Principaux résultats	115
DISCUSSION	116
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	130
ANNEXES	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136

Liste des principales abréviations

AgRP : *Agouti related Protein*

ALH : aire hypothalamique latérale

α -MSH : *alpha-melanocyte-stimulating hormone*

ARC : noyau arqué

ARNm : acide ribonucléique messenger

BHE : barrière hémato-encéphalique

C : régime croquettes

CNTF : *Ciliary Neurotrophic Factor*

CNTFR : *Ciliary Neurotrophic Factor Receptor*

DIO : *Diet Induced Obesity*

DMH : noyau hypothalamique dorsomédian

GFAP : *Glial fibrillary acidic protein*

HF : *High-Fat*

IHC : immunohistochimie

IR : *insulin receptor*

IRS : *insulin receptor substrate*

JAK2 : *Janus Kinase 2*

MAP : *Mitogen Activated Protein Kinase*

MCH : *melanin concentrating hormone*

NPY : neuropeptide Y

ObR : récepteur de la leptine

Or.A : orexine A

Abréviations

Or.B : orexine B

P: régime haute palatabilité

PI3 K : *Phosphatidyl Inositol 3 Kinase*

POMC : *Pro-opiomelanocortin*

PTP-1B : Protein Tyrosine Phosphatase-1B

PVN : noyau paraventriculaire

qRT-PCR : *Real Time quantitative Reverse Transcription PCR*

SOCS-3 : *Suppressor of Cytokine Signaling-3*

STAT3 : *Signal Transducer and Activator of Transcription*

VMH : noyau ventromédian

WB : Western blot

Liste des illustrations

<i>Figure 1 : Localisation de l'hypothalamus dans l'encéphale</i>	16
<i>Figure 2 : Voies hypothalamiques impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique</i>	19
<i>Figure 3 : Activation des neurones du noyau arqué</i>	22
<i>Figure 4 : La régulation de la satiété et de la faim au niveau de l'hypothalamus</i>	32
<i>Figure 5 : Modélisation de la structure de la leptine</i>	34
<i>Figure 6 : Les différentes isoformes du récepteur de la leptine</i>	36
<i>Figure 7 : Domaine extracellulaire de la leptine</i>	37
<i>Figure 8 : Voies de signalisation de la leptine</i>	40
<i>Figure 9 : Régulation de l'expression d'ObR à la membrane plasmique par ObRGRP</i>	42
<i>Figure 10 : récapitulatif des facteurs de régulation de la prise alimentaire</i>	48
<i>Figure 11 : anatomie de la barrière-hémato-encéphalique</i>	49
<i>Figure 12 : distribution des principaux organes circumventriculaires et des plexus choroïdes</i> <i>dans l'encéphale</i>	51
<i>Figure 13 : périodes critiques du développement périodes critiques du développement</i>	57
<i>Figure 14 : développement des projections hypothalamiques</i>	62
<i>Figure 15 : structures tridimensionnelles du CNTF (A), de l'IL-6 (B) et du LIF (C)</i>	68
<i>Figure 16 : la famille des ligands de gp130 et leurs récepteur</i>	70
<i>Figure 17 : les récepteurs aux cytokines de classe I</i>	71
<i>Figure 18 : contenu énergétique des régimes Normal-Fat (C) et High-Fat (HF)</i>	90
<i>Figure 19 : protocole « long »</i>	91
<i>Figure 20 : protocole « court »</i>	92
<i>Figure 21 : protocole d'administration du régime « High-Palatable» P</i>	93
<i>Figure 22 : contenu énergétique des régimes Normal-Fat (C) et High-Palatable (P)</i>	94
<i>Figure 23 : schéma de synthèse des modèles animaux utilisés suivant la thématique</i>	101
<i>Figure 24 : résumé des principaux résultats de l'étude (Expérience 2)</i>	106

Introduction bibliographique

Ce chapitre offre une synthèse bibliographique du contrôle central de l'homéostasie énergétique et des désordres métaboliques qui lui sont liés.

A. Le contrôle central de l'homéostasie énergétique

Mots clefs : Prise alimentaire - Hypothalamus - Noyau arqué – Neuroanatomie - Signaux de régulation - Leptine

B. La programmation métabolique

Mots clefs : Obésité - Leptino-résistance - CNTF - Nutrition maternelle- Développement

C. Objectifs du travail de thèse

Partie A. Le contrôle central de l'homéostasie énergétique

1. Définition de l'homéostasie énergétique

L'homéostasie énergétique se définit comme un état d'équilibre entre les apports fournis par la prise alimentaire et les dépenses énergétiques de l'organisme. La stabilité du poids corporel et de la masse grasse sont le reflet de cet état d'équilibre. En effet, hormis certaines périodes de la vie au cours desquelles le poids corporel n'est pas stabilisé (croissance, gestation, allaitement ou encore vieillesse), les mécanismes régulateurs du poids corporel à long terme s'avèrent particulièrement efficaces (erreur de l'ordre de 2% tous les 20 ans, soit en moyenne 1,5 kg pour une personne de 70 kg en 20 ans).

2. L'hypothalamus

2.1. Présentation de l'hypothalamus

2.1.1. Localisation anatomique

Chez les Vertébrés, l'hypothalamus est une structure du système nerveux central appartenant au diencephale. Il est situé à la base du cerveau, au-dessus du tronc cérébral et sous le thalamus et se trouve divisé par le 3^{ème} ventricule [Fig. 1 ; (Baroncini et al., 2012)]. La libération de neurohormones hypothalamiques dans le système porte hypothalamo-hypophysaire ou directement dans la circulation générale permet à l'hypothalamus de participer au dialogue existant entre le système nerveux et le système endocrinien.

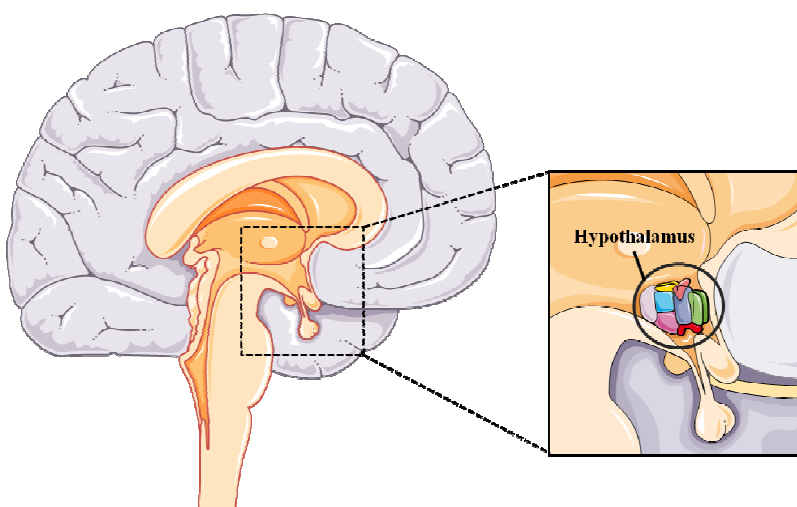


Figure 1 : Localisation de l'hypothalamus dans l'encéphale [Source : <http://www.servier.fr>]

L'hypothalamus est situé à la base de l'encéphale, au-dessus de l'hypophyse avec laquelle il forme l'axe hypothalamo-hypophysaire. Il intervient dans la régulation de processus physiologiques et comportementaux variés et participe au contrôle de l'homéostasie énergétique.

2.1.2. Connexions et principales fonctions

L'hypothalamus établit des connexions afférentes comme efférentes avec de nombreuses régions cérébrales du télencéphale jusqu'au myélocéphale telles que la rétine, le cortex cérébral, l'hippocampe, l'amygdale, les organes circumventriculaires ou le tronc cérébral, (Lemaire et al., 2011; Saper, 2000). L'organisation de l'hypothalamus ainsi que les connexions qu'il établit avec le reste de l'encéphale lui confèrent un rôle majeur dans la régulation de processus physiologiques et comportementaux variés tels que la thermorégulation, la soif, les rythmes circadiens, la différenciation sexuelle, la reproduction, la lactation, la respiration, le rythme cardiaque, ou encore l'homéostasie énergétique qui a fait l'objet des études de cette thèse.

2.1.3. Rôle de l'hypothalamus dans le contrôle de la prise alimentaire

L'implication de l'hypothalamus, au moins en partie, dans le contrôle de l'homéostasie énergétique est connue depuis très longtemps, puisque dès 1830 un syndrome d'obésité humaine, connu sous le nom de « Fröhlich's syndrom », fut corrélé aux modifications anatomiques observées dans l'hypothalamus ventromédian (Mohr B., 1830). Ces observations ont d'abord été attribuées à un dysfonctionnement de l'hypophyse dont les conséquences se seraient répercutées au niveau de l'hypothalamus (Keller et al., 1936). Cependant, au début du XX^{ème} siècle, Erdheim constata que les cas d'obésité humaine étaient souvent associés à la présence de tumeurs restreintes à la base du cerveau et donc absentes au niveau de l'hypophyse. Il émit donc l'hypothèse que l'hypothalamus serait seul responsable du développement de la pathologie. Ce concept évolua jusqu'au milieu des années 1930 au cours desquelles des études de lésions de l'hypothalamus ventromédian chez le chien démontrèrent l'implication de cette structure dans le développement de l'hyperphagie et de l'obésité (Bailey et al., 1921).

Dans les années 1930, des expériences de lésions ou de stimulations électriques de l'hypothalamus ventro-médian ou latéral ont confirmé l'implication de cette structure cérébrale dans le contrôle du comportement alimentaire chez le rat, le chat ainsi que le singe (Hetherington et al., 1930 ; Anand & Brobeck, 1951). De ces expériences naquirent les concepts de « centre de la satiété » pour l'hypothalamus ventro-médian (dont la lésion induit une hyperphagie chronique conduisant *in fine* à l'obésité) et de « centre de la faim » pour l'aire latérale de l'hypothalamus (dont la lésion induit une diminution de la prise alimentaire associée à une perte de poids).

Les notions de centres fonctionnels de la faim et de la satiété ont depuis évolué pour laisser place à une organisation hypothalamique plus complexe sous forme de groupes de neurones spécialisés, les noyaux hypothalamiques, exprimant des peptides spécifiques et modulés par des signaux reflétant le statut énergétique de l'organisme (Schwartz et al., 2000; Williams et al., 2001).

Notons cependant que si l'hypothalamus est la principale structure exerçant un rôle dans le maintien de l'homéostasie énergétique, elle n'est pas la seule zone cérébrale impliquée (Berthoud, 2006). En effet, diverses études ont montré l'implication de structures extra-hypothalamiques telles que le noyau du tractus solitaire (Emond et al., 2001; Moran et al., 2001; Sutton et al., 2004), le noyau parabrachial (Hajnal et al., 2009), le cortex piriforme et l'area postrema (Beverly et al., 1990; Gietzen and Magrum, 2001; Leung and Rogers, 1971; Truong et al., 2002) ou encore le noyau accumbens et l'amygdale (Ahn and Phillips, 2002; Primeaux et al., 2006; Will et al., 2003) ainsi que le cortex cérébral et l'hippocampe (Davidson et al., 2009).

2.2. Neuroanatomie de l'hypothalamus ventro-médian

L'hypothalamus est organisé en noyaux paires. Il est possible d'établir une distinction entre les noyaux dits de 1^{er} ordre (noyaux arqués), lesquels établissent des projections sur les noyaux dits de 2nd ordre (noyaux paraventriculaires, dorso et ventromédians, aires hypothalamiques latérales) (Fig 2A). Les noyaux hypothalamiques sont organisés symétriquement par rapport au 3^{ème} ventricule médian et agissent de concert pour adapter la prise alimentaire aux besoins énergétiques de l'organisme (Fig. 2B).

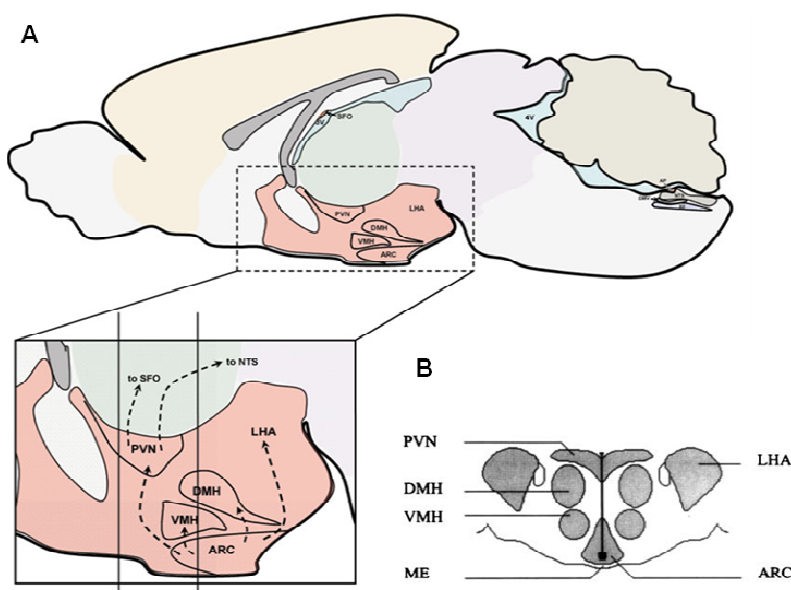


Figure 2 : Voies hypothalamiques impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique

[Source : (Smith and Ferguson, 2008; Williams et al., 2001)]

Fig. 2A : coupe sagittale d'encéphale de rat

Fig. 2B : coupe frontale d'encéphale de rat

(ARC : noyau arqué, DMH : noyau dorso-médian, LHA : aire hypothalamique latérale, ME : éminence médiane, NTS : noyau du tractus solitaire, PVN : noyau paraventriculaire, SFO : organe

subfornica, VMH : noyau ventro-médian).

L'hypothalamus ventromédian est composé de noyaux répartis symétriquement de part et d'autre du 3^{ème} ventricule.

Le noyau arqué, accolé au 3^{ème} ventricule et proche de l'éminence médiane, est un noyau hypothalamique de 1^{er} ordre. Il contacte les noyaux hypothalamiques de 2^d ordre : le noyau paraventriculaire, les noyaux ventro et dorso-médian ainsi que l'aire hypothalamique latérale.

Ces noyaux de 2^d ordre vont eux-mêmes émettre des projections vers des structures extra-hypothalamiques comme le noyau du tractus solitaire.

2.2.1. Les noyaux



hypothalamiques de 1^{er} ordre

Le noyau arqué : ARC

Le noyau arqué s'étend de manière rostrocaudale sur la moitié postérieure de l'hypothalamus.

Il est situé à la base du troisième ventricule et se trouve accolé à l'éminence médiane, organe

circumventriculaire perméable aux peptides et protéines circulants tels que l'insuline et la leptine. Cette disposition lui accorde des propriétés particulières d'accessibilité aux signaux périphériques qui seront présentées par la suite. Cette localisation anatomique fait du noyau arqué le 1^{er} relai hypothalamique existant entre les organes périphériques et le système nerveux central, intégrant ainsi les signaux périphériques nécessaires au maintien de l'homéostasie énergétique (Funahashi et al., 2000; Niswender et al., 2004).

L'implication de cette structure dans la régulation de la prise alimentaire a été mise en évidence par des expériences de lésions [Hetherington et al., 1940 ; (Olney, 1969)] et des observations cliniques sur des patients obèses (Bray and Gallagher, 1975).

Le noyau arqué est constitué des corps cellulaires de neurones pouvant être classés en deux populations :

- une population de neurones anorexigènes situés dans le noyau arqué ventrolatéral (Meister, 2007) et exprimant la POMC (*Pro-opiomélanocortine*), précurseur protéique de deux classes de peptides : les mélanocortines (comme l' α -MSH : *Melanocyte Stimulating Hormone*) et les β -endorphines. La plupart des neurones à POMC du noyau arqué expriment aussi le peptide CART (*Cocaine and Amphetamine-Related Transcript*). Les peptides α -MSH et CART exercent une action inhibitrice sur la prise alimentaire (Elias et al., 1998; Fan et al., 1997; Kristensen et al., 1998). La délétion du gène codant POMC induit le développement de l'obésité (Butler and Cone, 2002; Smart et al., 2006; Yaswen et al., 1999). Cette dernière donnée est en adéquation avec les observations effectuées chez les patients présentant des mutations dans le gène codant POMC (Challis et al., 2002; Krude et al., 1998).

Les neurones à POMC sont glutamatergiques (Collin et al., 2003), GABAergiques pour un tiers d'entre eux (Hentges et al., 2004), ou cholinergiques (Meister et al., 2006).

- une population de neurones orexigènes co-exprimant le NPY (neuropeptide Y), et l'AgRP (*Agouti related Protein*), regroupés dans le noyau arqué ventromédian (Allen et al., 1983; Broberger et al., 1997; Chronwall et al., 1985; de Quidt and Emson, 1986; Hahn et al., 1998; Kalra et al., 1999). Les neuropeptides exprimés par ces cellules stimulent la prise alimentaire (Clark et al., 1984; Levine and Morley, 1984; Ollmann et al., 1997; Stanley and Leibowitz, 1985). Ces neurones présentent un phénotype de nature GABAergique [Fig. 3B ; (Meister, 2007; Ovesjo et al., 2001)]. Bien que les données pharmacologiques démontrent l'implication

du neuropeptide Y et de l'AgRP dans la régulation de la prise alimentaire, contrairement aux neurones POMC, la délétion des gènes codant NPY et AgRP ne conduit pas à des modifications majeures du poids corporel, suggérant l'existence de mécanismes compensatoires (Qian et al., 2002; Ste Marie et al., 2005). La compréhension des mécanismes sous-tendant ces observations nécessite la mise en place de nouvelles stratégies d'étude telles que l'ablation spécifique des neurones NPY/AgRP (Bewick et al., 2005; Gropp et al., 2005; Luquet et al., 2005).

Diverses études morphologiques ont démontré l'existence d'interactions entre les deux populations neuronales coexistant dans le noyau arqué (Csiffary et al., 1990) ; (Fig. 3A). Ces interactions sont notamment assurées par la forme 1 du récepteur au NPY (Y1R) majoritairement présent sur les neurones POMC et par la forme 2 du récepteur au NPY (Y2R) présent sur les neurones NPY (Broberger et al., 1997) ; (Fig. 3C).

Les neurones du noyau arqué constituent de plus un site d'expression privilégié des récepteurs aux signaux de régulation de la prise alimentaire tels que la leptine (Cheung et al., 1997; Elmquist et al., 1998b; Huang et al., 1996; Mercer et al., 1996; Schwartz et al., 1997) ou l'insuline (Benoit et al., 2002; Marks et al., 1990; van Houten et al., 1980; Werther et al., 1987). En réponse à ces signaux satiétogènes, les neurones à NPY sont hyperpolarisés et voient leur taux de décharge des potentiels d'action diminuer (Cowley et al., 2003; van den Top et al., 2004). Le tonus inhibiteur qu'ils exerçaient sur les neurones à POMC est alors levé (Cowley et al., 2001) et les neurones à POMC sont dépolarisés (Jobst et al., 2004) permettant *in fine* d'inhiber la prise alimentaire.

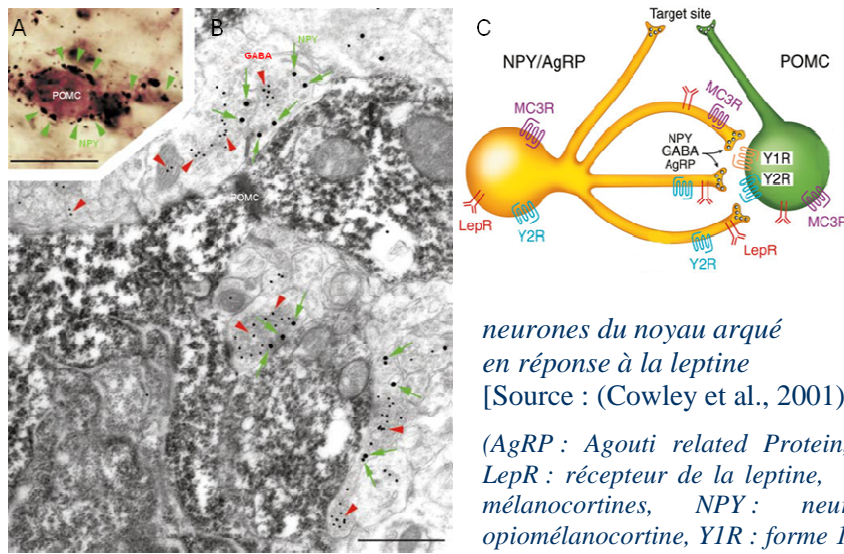


Figure 3 : Activation des

neurones du noyau arqué
en réponse à la leptine

[Source : (Cowley et al., 2001)]

(AgRP : Agouti related Protein, GABA : acide- γ -aminobutyrique, LepR : récepteur de la leptine, MC3R : forme 3 du récepteur aux mélanocortines, NPY : neuropeptide Y, POMC : pro-opiomélanocortine, Y1R : forme 1 du récepteur au NPY, Y2R : forme 2 du récepteur au NPY)

Fig. 3A –B : détection des neurones POMC et NPY en microscopie électronique à transmission.

Le noyau arqué de l'hypothalamus est composé de deux populations neuronales :

- des neurones orexigènes GABAergiques coexprimant le NPY et l'AgRP
- des neurones anorexigènes majoritairement glutamatergiques coexprimant POMC et CART, de phénotype

Fig. 3C : Les neurones orexigènes comme anorexigènes expriment en surface les récepteurs des signaux de régulation de la prise alimentaire. Il existe une communication intrinsèque au noyau arqué entre les neurones orexigènes et anorexigènes, ainsi qu'une communication extrinsèque avec les neurones des autres noyaux hypothalamiques.

Les neurones de 1^{er} ordre du noyau arqué constituent donc un relai essentiel entre la périphérie et le système nerveux central. Leur activité est modulée en réponse aux signaux périphériques. Ces neurones émettent aussi des projections vers les neurones de 2nd ordre des noyaux paraventriculaires et de l'aire hypothalamique latérale (Fig. 2A); (Williams et al., 2001).

2.2.2. Les noyaux hypothalamiques de 2nd ordre

Situés de part et d'autre du troisième ventricule, les noyaux paraventriculaires, dorsomédians et ventromédians sont trois structures anorexigènes. Ils sont le lieu de convergence de projections NPY et α -MSH provenant du noyau arqué (Elmqvist et al., 1998b; Elmqvist et al., 1999). Ces noyaux contiennent des neurones de 2nd ordre se projetant vers des structures du

système nerveux autonome telles que le noyau du tractus solitaire ou le noyau moteur dorsal (Smith and Ferguson, 2008).

Le noyau hypothalamique paraventriculaire : PVN ou PVH



Le noyau paraventriculaire est adjacent à la partie supérieure du 3^{ème} ventricule au niveau de l'hypothalamus antérieur. Au sein de cette structure se distinguent les neurones parvocellulaires et magnocellulaires (Swanson and Sawchenko, 1983). Des expériences de lésion du noyau paraventriculaire ont permis de démontrer son implication dans la régulation de la balance énergétique (Gold, 1973; Sims and Lorden, 1986).

Le noyau paraventriculaire constitue un centre intégrateur. Il est notamment le lieu de convergence des projections des neurones à NPY/AgRP et POMC/ α -MSH du noyau arqué (Elmqvist et al., 1998b; Elmqvist et al., 1999) ainsi que des neurones exprimant les orexines en provenance de l'aire hypothamique latérale (Elmqvist et al., 1999; Nambu et al., 1999). Les neurones de ce noyau hypothalamique expriment, d'une part, la forme 4 du récepteur aux mélanocortine (MC4R) ayant pour agoniste l' α -MSH et antagoniste l'AgRP et, d'autre part, la forme 1 du récepteur au NPY (Y1R). Ainsi, des micro-injections intracébroventriculaires de neuropeptide Y ont une action stimulatrice sur la prise alimentaire (Leibowitz, 1991; Stanley et al., 1985) tandis que des micro-injections intracébroventriculaires de neuropeptides anorexigènes tels que l' α -MSH (Wirth et al., 2001) ou CART (Wang et al., 2000) exercent une action inhibitrice.

Le noyau paraventriculaire est le lieu de synthèse de neuropeptides anorexigènes de 2nd ordre tels que la CRH (*Corticotropin Releasing Hormone*) ou la TRH (*Thyrotropin Releasing Hormone*) (Egawa et al., 1990; Kow and Pfaff, 1991; Schwartz et al., 2000).

De par les afférences qu'il reçoit du noyau suprachiasmatique, la principale horloge circadienne chez les Mammifères, le noyau paraventriculaire participe au contrôle circadien de l'innervation autonome d'organes périphériques tels que le pancréas, le foie, le tissu adipeux ou encore les glandes surrénales (Kalsbeek and Buijs, 2002; la Fleur et al., 2000).

Le noyau hypothalamique ventromédian : VMH



Longtemps considéré comme le « centre de la satiété », et présenté en tant « qu'annexe » du noyau arqué, le noyau ventromédian est le plus volumineux des noyaux hypothalamiques. La

stimulation électrique de cette structure induit une inhibition de la prise alimentaire (King, 2006) et des lésions de cette zone ont provoqué des syndromes d'hyperphagie et d'obésité (Sato et al., 1997b).

Ce noyau est riche en neurones gluco-sensibles capables d'adapter leur activité à la glycémie, pour réguler l'homéostasie glucidique (King, 2006). Des études électrophysiologiques ont montré que l'activité des neurones du noyau ventromédian variait en fonction des distensions de la paroi gastrique. Cette dernière information est relayée de l'estomac vers le VMH via le nerf vague (Sun et al., 2006).

Globalement, le VMH émet des projections vers les noyaux paraventriculaires et dorsomédians et donc indirectement vers l'aire hypothalamique latérale (Williams et al., 2001). Notons cependant que la région dorsomédiane du VMH, particulièrement sensible à la leptine, n'émet pas de telles projections neuronales, mais innerve par contre d'autres régions cérébrales, créant ainsi un réseau parallèle (Simerly, 2008).

Le noyau hypothalamique dorsomédian : DMH



Ce noyau est accolé au noyau ventro-médian et établit des connexions avec tous les noyaux hypothalamiques médians et latéraux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire (Bellinger and Bernardis, 2002; Elmquist et al., 1998b; Kalra et al., 1999). Ses multiples connexions font du noyau dorsomédian un centre intégrateur impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel (Bellinger and Bernardis, 2002; Bernardis, 1970). Tout comme pour le noyau paraventriculaire, des micro-injections de neuropeptide Y au niveau du noyau dorsomédian stimulent la prise alimentaire (Stanley et al., 1985).

Le noyau dorsomédian reçoit les projections des neurones à NPY et POMC du noyau arqué ; en revanche, seuls certains neurones de ce noyau expriment le NPY (Gehlert et al., 1987). Par ailleurs, à la différence des noyaux arqués et paraventriculaires (Sahu et al., 1988), le jeûne n'induit une augmentation des niveaux d'expression du NPY dans le noyau dorsomédian que dans des situations d'obésité et d'hyperphagie (Li et al., 1998a, b).

En effet, les neurones du DMH présentent une différence de sensibilité aux signaux périphériques régulant la prise alimentaire par rapport à ceux du noyau arqué (Draper et al., 2010) ; en revanche, leur phénotype neurochimique reste le même puisqu'ils synthétisent eux-aussi le GABA.

Le noyau dorsomédian reçoit des afférences en provenance du noyau suprachiasmatique et se trouve impliqué, au moins partiellement, dans la régulation de rythmes circadiens (Chou et al., 2003) tels que la rythmicité de la prise de nourriture (Gooley et al., 2006; Mieda et al., 2006).

L'aire hypothalamique latérale : LHA



Cette région a longtemps été considérée comme le « centre de la faim ». En effet, sa lésion entraîne une diminution de la prise alimentaire ainsi que du poids corporel, tandis que la stimulation électrique de ce noyau provoque une augmentation de la prise alimentaire, et ce même chez des animaux rassasiés (Smith and Ferguson, 2008; Williams et al., 2001).

La forme 5 du récepteur au NPY (Y5R) est retrouvée dans l'aire périfornicale de cette région hypothalamique (Hu et al., 1996). D'autre part, l'aire hypothalamique latérale comporte des terminaisons neuronales, exprimant le neuropeptide Y (Broberger et al., 1998; Horvath et al., 1999), en étroit contact avec les neurones exprimant des neuropeptides orexigènes que sont les orexines A et B (encore appelées hypocréline 1 et 2), et la MCH (*Melanin Concentrating Hormone*). La majorité des neurones de la LHA exprimant les orexines sont de phénotype glutamatergique, tandis que ceux exprimant la MCH sont considérés comme GABAergiques (Elias et al., 2001; Meister, 2007).

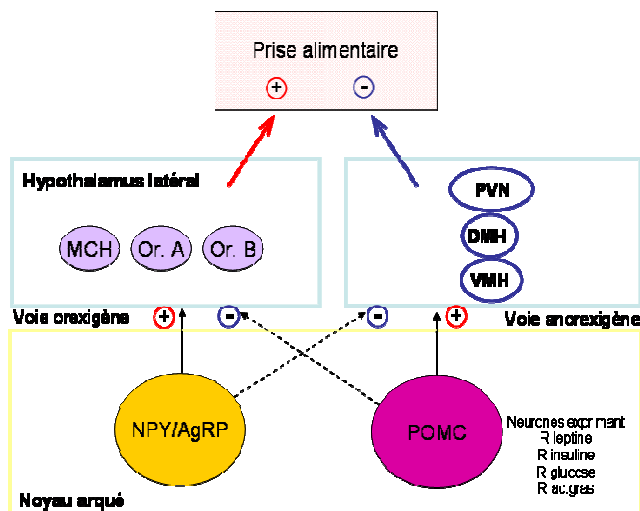
Grâce à la présence de neurones gluco-sensibles, l'aire hypothalamique latérale participe au contrôle de l'homéostasie glucidique (Bernardis, 1970; Burdakov et al., 2005).

La LHA émet des projections vers le tronc cérébral et la moelle épinière, contrôlant ainsi la composante parasympathique du système nerveux autonome et se trouve impliquée dans la régulation de prise alimentaire à court comme à long terme.

Via les afférences qu'ils reçoivent du noyau arqué, les noyaux hypothalamiques de 2nd ordre constituent un niveau d'intégration supérieur des signaux régulant l'homéostasie énergétique. Il serait toutefois inexact de considérer qu'ils remplissent un simple rôle d'intégrateurs « passifs » des signaux envoyés par le noyau arqué. En effet un dialogue réciproque ainsi qu'un trafic bidirectionnel existent entre les noyaux de 1^{er} et de 2nd ordre. Ainsi, les noyaux de 2nd ordre envoient eux aussi des prolongements en direction du noyau arqué, modifiant activement les informations qui leur seront transmises par la suite (Arase et al., 1988; Elmquist et al., 1998a; Schwartz et al., 2000; Williams et al., 2001).

Synthèse : noyaux hypothalamiques et contrôle de l'homéostasie énergétique

Situé à la base du diencephale, l'**hypothalamus** est une structure primordiale pour le maintien de l'**homéostasie énergétique**. Il est organisé sous forme de groupes de cellules spécialisées, les **noyaux hypothalamiques**, qui agissent de concert pour adapter la prise alimentaire aux besoins énergétiques de l'organisme (Fig. 4). Ces noyaux sont caractérisés par les **neuropeptides** qu'ils synthétisent (dont nous avons fait une présentation non exhaustive) ainsi que par les **connexions** qu'ils établissent avec les autres noyaux de l'hypothalamus ou avec des structures extra-hypothalamiques.



Synthèse 1 : Schéma récapitulatif des voies hypothalamiques orexigènes et anorexigènes de l'hypothalamus

(AgRP : Agouti related Protein, DMH : noyau dorsomédian, MCH : Melanin Concentrating Hormone, NPY : neuropeptide Y, Or.A : orexine A, Or.B : orexine B, POMC : Pro-opiomélanocortine, PVN : noyau paraventriculaire, VMH : noyau ventro-médian)

Le **noyau arqué**, de par la coexistence en son sein de **deux populations neuronales** aux effets antithétiques bien que complémentaires et la présence des **récepteurs** aux signaux de régulation de la prise alimentaire, est une région essentielle au maintien de l'homéostasie énergétique. Considéré comme un **centre intégrateur métabolique**, ce noyau constitue un **relai hypothalamique** entre la périphérie et le système nerveux central.

3. Les signaux de régulation de la prise alimentaire

Le maintien de l'homéostasie énergétique nécessite un contrôle des apports énergétiques fournis par la prise alimentaire et de la dépense énergétique. La régulation de ce processus physiologique est complexe et fait intervenir des signaux environnementaux (stress, olfaction, goût), nerveux (via le nerf vague), endocriniens (leptine, insuline, ghréline, adiponectine...) ou métaboliques (glucose, acides gras libres, acides aminés). Ces signaux périphériques (en provenance notamment du foie, des muscles, du tissu adipeux et du pancréas) convergent tous vers le système nerveux central par voie sanguine et/ou nerveuse et le renseignent sur le statut énergétique de l'organisme. En réponse à ces informations, le système nerveux central délivre des signaux adaptés vers la périphérie via le système nerveux autonome et le complexe hypothalamo-hypophysaire. Il existe donc une boucle de régulation entre le système nerveux central et la périphérie permettant une adaptation précise des apports énergétiques aux besoins de l'organisme.

La régulation de la prise alimentaire s'effectue à court, moyen et long terme. Diverses molécules (glucose, acides aminés, acides gras libres, hormones...) élaborées au cours de la digestion exercent une action inhibitrice sur l'appétit, ce sont des signaux dits de satiété ou à court terme. Conjointement, des signaux de nature hormonale dont les concentrations plasmatiques dépendent de la masse grasse (leptine et insuline notamment) exercent une action retardée sur le comportement alimentaire. Ce sont des signaux d'adiposité, ou signaux à long terme.

3.1. Les Signaux de régulation à court terme

Les signaux de régulation à court terme, ou signaux de satiété sont directement liés à la prise alimentaire. Elaborés pendant le repas, la digestion et la métabolisation des aliments, leur durée d'action coïncide avec la période inter-prandiale. Ces signaux agissent sur la durée et le volume des repas ainsi que sur la durée de la période inter-prandiale consécutive au repas.

3.1.1. Les nutriments

Les protéines et acides aminés

L'implication des protéines alimentaires et des concentrations circulantes en acides aminés dans la régulation de la prise alimentaire a été suggéré dès les années 70 (Mellinkoff et al., 1997). Ces premiers travaux ont émis l'hypothèse d'une adéquation entre les variations de

concentrations plasmatiques en acides aminés et les modifications du comportement alimentaire (Bray, 1997). Les protéines alimentaires exercent un rôle satiétogène à court terme (Porrini et al., 1997). A l'inverse, un régime alimentaire appauvri en protéines a un effet stimulateur sur la prise alimentaire (Bensaid et al., 2003; Gibson et al., 1995; Gietzen, 1993), notamment via l'activation des neurones orexigènes de l'aire hypothalamique latérale (Monda et al., 1997).

Si la teneur en acides aminés du régime alimentaire est importante, la composition l'est tout autant. En effet, des études ont démontré que l'administration de phénylalanine ou de tryptophane, précurseurs des neurotransmetteurs de la classe des monoamines, induisait une diminution de la prise alimentaire (Rogers and Blundell, 1994). Le tryptophane étant le précurseur de la sérotonine, neurotransmetteur à l'action anorexigène, les ratios plasmatiques de tryptophane par rapport aux reste des acides aminés exercent ainsi une influence sur les niveaux sérotoninergiques et donc sur la prise alimentaire (Fernstrom, 1985; Fernstrom and Fernstrom, 2001; Fernstrom and Wurtman, 1972). La leucine exerce quant à elle son effet satiétogène en stimulant les neurones POMC (Blouet et al., 2009).

Le glucose

Outre le rôle de substrat énergétique primordial au fonctionnement cérébral, il est désormais bien établi que le glucose joue un rôle de signal métabolique permettant de réguler la prise alimentaire (Mayer, 1996). En effet, des études menées chez l'homme et/ou l'animal ont montré que l'hypoglycémie étaient liée à une augmentation de la sensation de faim et de la prise alimentaire (Smith and Epstein, 1969; Thompson and Campbell, 1977). Dans le système nerveux central, une perfusion intracérébroventriculaire de glucose induit une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique (Fujita et al., 2003; Le Feuvre et al., 1991). A l'inverse, l'induction d'une glucopénie dans l'hypothalamus latéral induit une diminution de la dépense énergétique (Egawa et al., 1989).

Certains neurones de l'hypothalamus ont une activité modulée en fonction de la concentration en glucose ; il s'agit des neurones GR (*Glucose Responsive*) dont l'activité augmente lorsque la glycémie augmente et des neurones GS (*Glucose Sensitive*) dont l'activité est inhibée par de fortes concentrations de glucose. Ces neurones ont d'abord été identifiés dans le noyau ventromédian et l'aire hypothalamique latérale (Anand et al., 1964; Oomura et al., 1969), cependant il est désormais acquis que les noyaux arqué et paraventriculaire présentent aussi de tels neurones (Penicaud et al., 2002; Routh, 2010). Les mécanismes cellulaires et

moléculaires par lesquels ces neurones détectent des variations de glycémie feraient intervenir des acteurs communs à ceux décrits dans le pancréas, notamment le transporteur Glut-2 (Leloup et al., 1998), la glucokinase (Yang et al., 1999) ou encore les canaux potassiques ATP-dépendant (Miki et al., 2001).

Les acides gras libres

Des études ont montré que l'administration intracérébroventriculaire d'acide oléique induisait une diminution des niveaux d'expression de NPY dans l'hypothalamus associés à une diminution de la prise alimentaire (Obici et al., 2002). Une injection intracérébroventriculaire de triglycérides (sous forme d'émulsion) altère la sécrétion d'insuline (Clement et al., 2002).

3.1.2. Les hormones gastro-intestinales

Plusieurs hormones synthétisées par le tractus gastro-intestinal régulent la prise alimentaire à court terme. Ces peptides sont produits en réponse à l'activation des baro- et chémorécepteurs signalant au tractus gastro-intestinal la présence et la densité énergétique des aliments ingérés. L'information est ensuite relayée au système nerveux central, permettant alors de réguler la prise de nourriture (Wynne et al., 2004).

Parmi les signaux gastro-intestinaux se distinguent les signaux anorexigènes : peptide YY₃₋₃₆, cholecystokinines, leptine (part produite par l'estomac qui ne sera pas présentée dans ce paragraphe) et le seul signal orexigène connu à ce jour : la ghréline.

Les cholecystokinines : CCK

La cholécystokinine est une hormone peptidique sécrétée principalement par la partie proximale de l'intestin grêle mais aussi par le système nerveux central (Beinfeld et al., 1981; Polak et al., 1975). Elle est présente sous différentes formes dérivées du produit d'un même gène telles que CCK-8, CCK22, CCK-33 et CCK58 (Cummings and Overduin, 2007; Reeve et al., 1994) cependant la forme CCK58 serait biologiquement la plus active (Glatzle et al., 2008; Reeve et al., 2003).

Les CCK régulent la motricité intestinale et stimule les sécrétions pancréatiques et gastriques en périphérie via le récepteur CCK-R1 (ou CCK-RA) (Moran, 2004; Moran and Schwartz, 1994; Morley, 1982). Dans le système nerveux central, elle agit préférentiellement via le récepteur CCK-R2 (ou CCK-RB) notamment au niveau de l'aire hypothalamique latérale, du noyau dorsomédian, du noyau paraventriculaire ainsi que du noyau du tractus solitaire (Bi et al., 2001; Ciofi and Tramu, 1990; Schick et al., 1994; Ueta et al., 1993). Diverses études ont

démontré que la CCK endogène exerçait un rôle de facteur de satiété à court terme régulant ainsi la taille du repas (Konturek et al., 2003; Moran, 2000).

L'administration de CCK au niveau périphérique ou central réduit la taille et la durée du repas (Figlewicz et al., 1986; Kissileff et al., 2003).

Les Glucagon-Like-Peptides : GLP-1 et GLP-2

Le Glucagon-Like-Peptide 1 est un peptide anorexigène de 30 acides aminés, dérivé du transcrite du gène codant le proglucagon et synthétisé par le tractus intestinal pendant la phase post-prandiale, proportionnellement au contenu énergétique du repas (Hoyt et al., 1996).

En périphérie, le GLP-1 module la digestion et stimule la sécrétion d'insuline (Nauck et al., 1997). Au niveau central, le GLP-1 agit via l'activation de son récepteur, GLP-1R, majoritairement localisé dans l'hypothalamus médian (noyaux arqués et paraventriculaires) et le tronc cérébral (Dakin et al., 2004; Merchenthaler et al., 1999).

L'administration chronique de GLP-1 par voie veineuse ou par injection intracérébroventriculaire induit une diminution de la prise alimentaire associée à une diminution du poids corporel (Schmidt et al., 2003; Turton et al., 1996; Wynne et al., 2004). Ces réactions sont principalement assurées par l'inactivation de la transmission NPYergique au niveau du noyau paraventriculaire (Acuna-Goycolea and van den Pol, 2004; McMahon and Wellman, 1997; Turton et al., 1996).

Le GLP-2, autre forme du transcrite du gène codant le proglucagon, agit de manière complémentaire au GLP-1. Au niveau central, le GLP-2 est essentiellement dans le noyau dorsomédian (Kinzig et al., 2002). Une injection intracérébroventriculaire de GLP-2 induit une diminution de la prise alimentaire via l'activation des neurones du noyau dorsomédian (Tang-Christensen et al., 2001).

Le peptide YY : PYY₃₋₃₆

Le peptide YY₃₋₃₆ est la forme active anorexigène du peptide YY (l'autre forme connue étant le peptide YY₁₋₃₆). Ce peptide de 36 acides aminés est synthétisé par les cellules L de la partie distale de l'intestin mais aussi par certains neurones du tronc cérébral (Glavas et al., 2008). En périphérie, le PYY₃₋₃₆ agit sur la mobilité gastrique et l'absorption d'eau et d'électrolytes par les intestins (Allen et al., 1984; Chen and Rogers, 1995; Hoentjen et al., 2001). Au niveau central, il stimule la libération d' α -MSH, inhibe la production de NPY au niveau du noyau arqué (Batterham et al., 2002; Wynne et al., 2004). Le PYY₃₋₃₆ présente une homologie de

séquence avec le NPY (Conlon, 2002) et se lie avec une haute affinité au récepteur Y2R (Larhammar, 1996; Murphy and Bloom, 2006) et, avec une moindre affinité, aux formes Y1R et Y5R.

L'administration périphérique de PYY₃₋₃₆ inhibe la prise alimentaire et diminue le poids corporel (Batterham et al., 2002; Batterham et al., 2007; Challis et al., 2003).

La production de PYY₃₋₃₆ a lieu pendant la phase post-prandiale, proportionnellement au contenu énergétique du repas (Adrian et al., 1985; Lin and Chey, 2003).

La Ghréline

La ghréline est l'unique signal périphérique orexigène connu à ce jour (Cummings et al., 2005). Isolée à partir d'estomacs de rat (Kojima et al., 1999), son rôle dans la régulation de la balance énergétique est désormais acquis (Tschop et al., 2000). Il a été envisagé de considérer la ghréline comme le produit d'un gène « économe », favorisant la consommation de nourriture et le stockage des graisses et permettant ainsi à l'organisme de s'adapter aux différentes périodes de famine (Cummings et al., 2005).

Ce peptide de 28 acides aminés est principalement synthétisé par les cellules endocrines de l'épithélium stomacal ainsi que par la partie supérieure de l'intestin (Date et al., 2000), mais aussi par les cellules α -pancréatiques (Date et al., 2002) ou encore le placenta, les ovaires, les poumons, l'hypophyse, etc... Au niveau de l'hypothalamus, la ghréline a été détectée dans les neurones du noyau arqué (Lu et al., 2002).

En se fixant sur son récepteur GHS-R (récepteur du sécrétagogue de l'hormone de croissance), la ghréline produite par le noyau arqué stimule la sécrétion de l'hormone de croissance par l'hypophyse ainsi que de nombreux peptides tels que la prolactine (Arvat et al., 2001). Au niveau du noyau arqué, elle active les neurones orexigènes, stimule la production de NPY et d'AgRP, et inhibe les neurones anorexigènes, s'opposant à l'action de la leptine et induisant ainsi une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel (Cowley et al., 2003; Dickson and Luckman, 1997; Greenman et al., 2004; Shintani et al., 2001; van den Top et al., 2004).

Des études menées chez l'animal ont montré que l'administration intracérébroventriculaire de ghréline induisait une augmentation de la sensation de faim couplée à une augmentation de la prise alimentaire et de la masse adipeuse ainsi qu'à des sécrétions acides au niveau gastrique (Szentirmai et al., 2007; Tschop et al., 2000; Wren et al., 2001).

Chez l'homme, les niveaux de ghréline plasmatique augmentent en période de jeûne (Ariyasu et al., 2001) et atteignent un pic de manière transitoire durant la phase pré-prandiale, suggérant un rôle de l'hormone dans l'initiation de la prise alimentaire (Cummings et al., 2001).

Récemment, un second peptide a été isolé à partir du gène codant la proghréline (Zhang et al., 2005). Il s'agit de l'obestatine, décrite comme une hormone anorexigène. Si son rôle n'est pas encore totalement défini (Mondal et al., 2008), ce peptide pourrait représenter un frein potentiel à l'action orexigène de la ghréline (Epelbaum et al., 2010).

L'action des signaux précédemment décrits est indispensable au contrôle de la prise alimentaire, cependant elle n'est pas suffisante pour induire à elle seule des modifications durables de la balance énergétique. La régulation à plus long terme est assurée par des signaux périphériques dits signaux d'adiposité. Dans la suite de cette introduction, nous présenterons deux de ces signaux, parmi les plus décrits dans la littérature : la leptine (produite par le tissu adipeux) et l'insuline (produite par le pancréas).

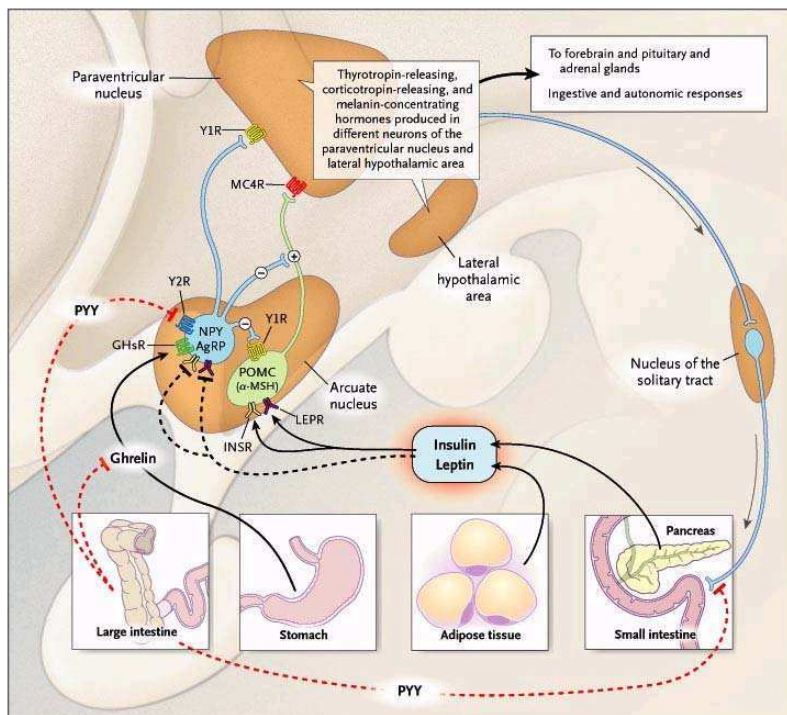


Figure 4 : La régulation de la satiété et de la faim au niveau de l'hypothalamus

La régulation de la satiété et de la faim au niveau de l'hypothalamus

[Source : (Korner and Leibel, 2003)]

Les signaux de régulation à court terme (signaux de satiété) provenant du tractus gastro-intestinal et les signaux de régulation à long terme tels que la leptine et l'insuline sécrétés proportionnellement au degré d'adiposité, sont intégrés au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus. Les neurones du noyau arqué émettent

ensuite des projections vers les noyaux hypothalamiques de 2^d ordre tels que le noyau paraventriculaire ou l'aire hypothalamique latérale. Une boucle de régulation s'établit entre le système nerveux central et la périphérie via le système nerveux autonome.

3.2. Les Signaux de régulation à long terme

Conjointement à l'action des signaux à court terme, les signaux de régulation à long terme, ou signaux d'adiposité exercent une action retardée sur le comportement alimentaire. De nature hormonale, leurs concentrations plasmatiques dépendent de la masse adipeuse. Ces signaux périphériques sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le parenchyme nerveux. L'insuline et la leptine sont deux signaux d'importance capitale pour la régulation à long terme de l'homéostasie énergétique. Une fois fixées sur leurs récepteurs respectifs au sein de l'hypothalamus, ces deux hormones induisent l'activation de cascades de signalisation permettant de moduler l'activité des noyaux hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire (Fig. 4).

3.2.1. La leptine

Découverte de la leptine et clonage du gène « obese »

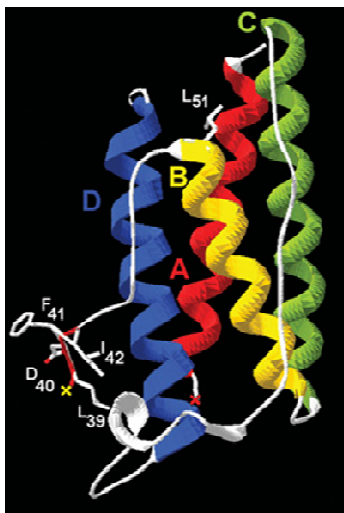
La mise en évidence du gène codant la leptine est relativement récente (Zhang et al., 1994), en revanche, le concept d'un facteur de satiété circulant capable d'agir au niveau de l'hypothalamus pour réguler la prise alimentaire est né dès les années 50 suite à des expériences de parabiose menées chez le rat (Hervey, 1959; Huff et al., 1950) puis chez la souris (Coleman, 1978). L'étymologie du mot « leptine » est leptos qui signifie « mince » en grec. En effet, cette hormone, produit du gène ob (obese), lequel a été cloné pour la première fois à partir du tissu adipeux de souris génétiquement obèses, les souris ob/ob, est sécrétée dans la circulation sanguine proportionnellement à la quantité de tissu adipeux et agit comme facteur de satiété pour diminuer la prise alimentaire (Zhang et al., 1994).

Chez l'homme, le gène codant la leptine contient 3 exons et 2 introns et se situe sur le chromosome 7 (Green et al., 1995; Isse et al., 1995).

Séquence et structure

La leptine est une protéine composée de 167 acides aminés (16 kDa). Vingt-et-un acides aminés constituent un peptide signal, qui, une fois clivé donne naissance à une protéine mature de 146 acides aminés (Zhang et al., 1994). 67 % de la séquence peptidique de la leptine a été conservée au cours de l'évolution, preuve du rôle primordial joué par cette hormone pour la survie des espèces (Ogawa et al., 1995). Il existe 83% d'homologie entre les leptines de rat et de souris contre 84% d'homologie entre les leptines murines et humaines (Zhang et al., 1997).

Composée de quatre hélices antiparallèles, la structure tridimensionnelle de la leptine est caractéristique de la famille des cytokines de type I, qui compte parmi ses membres l'IL-6 (Interleukine-6), le LIF (*Leukaemia Inhibitory Factor*) ou encore le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) qui fera l'objet du second chapitre de cette étude bibliographique. Des expériences de superposition entre la structure tridimensionnelle de la leptine avec celles des autres membres de la famille des interleukines 6 ont permis de mettre en évidence les trois sites de liaison de l'hormone avec son récepteur. Depuis lors, différentes expériences de mutations spécifiques au niveau de certains acides aminés ont permis d'identifier le rôle de chacun des sites de liaison et de générer des leptines mutées (ou mutéines) d'activité réduite ou nulle et agissant comme des antagonistes de la leptine sauvage (Niv-Spector et al., 2005; Solomon et al., 2006). Ces molécules ont été développées chez plusieurs espèces et représentent aujourd'hui de précieux outils moléculaires à l'étude de l'action de la leptine [pour exemple : (Attig et al., 2008)].



*Figure 5 : Modélisation de la structure de la leptine
[Source : (Niv-Spector et al., 2005)]*

La leptine comporte 4 hélices en position antiparallèle, composées de 25 à 28 acides aminés. Les acides aminés notés L39, D40 et F41 sont situés au niveau de la boucle AB, composante de l'un des sites de liaison de la leptine à son récepteur.

Des expériences de mutagenèse dirigée au niveau de ces acides aminés ont permis le développement d'un antagoniste compétitif de la leptine : le L39A/D40A/F41A.

Synthèse et sécrétion

La synthèse de leptine a initialement été attribuée au seul tissu adipeux ; majoritairement par les adipocytes blancs (Green et al., 1995; Zhang et al., 1994) et en moindre partie par le tissu adipeux brun (Cinti et al., 1997). Cette production étant proportionnelle à la quantité de tissu adipeux (Maffei et al., 1995), les niveaux plasmatiques de leptine sont donc le reflet du statut énergétique d'un individu. Depuis, une synthèse ectopique de l'hormone par d'autres tissus a été mise en évidence. Ainsi, l'estomac (Bado et al., 1998; Sobhani et al., 2000), l'épithélium intestinal (Sitaraman et al., 2004), le foie (Taouis et al., 1998), le muscle squelettique (Wang et al., 1998), la peau (Glasow et al., 2001), les gonades (Cioffi et al., 1997; Ryan et al., 2002),

ou encore la glande mammaire et le placenta (Bonnet et al., 2002; Casabiell et al., 1997; Hoggard et al., 1997; Masuzaki et al., 1997; Smith-Kirwin et al., 1998) produisent aussi la leptine. Au niveau central, la leptine est exprimée dans le cortex cérébral, l'hypophyse et l'hypothalamus (Morash et al., 1999).

Toutefois, les adipocytes blancs sont toujours considérés comme le lieu de production majeur de l'hormone et les niveaux d'expression de la leptine dans les autres tissus restent insuffisants pour participer de manière significative aux niveaux systémiques de l'hormone. Il reste néanmoins plausible de supposer que l'expression de l'hormone dans quantité de tissus différents lui permet de participer à la régulation d'un panel de fonctions, ce qui sera discuté par la suite.

Suivant le tissu considéré, la sécrétion de leptine est soumise à diverses régulations. Au niveau du tissu adipeux, de nombreux facteurs régulant la synthèse de leptine ont été répertoriés (Margetic et al., 2002). Nous retiendrons que cette sécrétion est de type pulsatile (Bagnasco et al., 2002; Licinio et al., 1997) et sensible aux statuts nutritionnel, physiologique et hormonal (Ahima and Flier, 2000; Gautron and Elmquist, 2011). Ainsi, chez le rongeur et l'homme, une restriction alimentaire ou une période de jeûne induiront une diminution de la sécrétion de leptine, tandis que la prise de nourriture et la suralimentation induiront une stimulation de la production de leptine (Porte et al., 1998). Il existe d'autre part un lien étroit entre les taux d'insuline et de leptine. L'insuline est l'un des facteurs hormonaux stimulant la production de leptine (Ceddia et al., 1998), la prolactine en est un autre exemple (Balci et al., 2009; Gualillo et al., 1999).

D'autre part, la sécrétion de leptine par le tissu adipeux humain comme murin réponds aux rythmes circadiens diurnes et ultradiens (Kalra et al., 2003; Saladin et al., 1995; Schoeller et al., 1997). A une échelle de temps plus importante, cette sécrétion varie aussi en fonction de l'âge (Zhao et al., 2002). Enfin, un pic de leptine postnatal a été mis en évidence chez la souris (Ahima et al., 1998). Ce pic de leptine postnatal est encore sujet à de nombreuses études, néanmoins, certaines données ont d'ores et déjà montré l'importance de ce dernier pour le déclenchement de la puberté ainsi que le développement des connexions hypothalamiques régulant la prise alimentaire (Bouret et al., 2008). Ce dernier topique sera présenté plus en détail dans le paragraphe dédié au développement de l'hypothalamus.

Signalisation

A ce jour, six isoformes du récepteur à la leptine, ObR (ou encore LepR), ont été mises en évidence (Fig. 6). Ces différentes isoformes, nommées d'ObRa à ObRf sont produites par épissage alternatif à partir du gène *db* (*diabetes*, aujourd'hui nommé *lepr*) chez la souris. Ce sont les travaux de Tartaglia qui ont les premiers caractérisé l'une des isoformes du récepteur de la leptine, ObRa, dans le plexus choroïde de souris (Tartaglia et al., 1995).

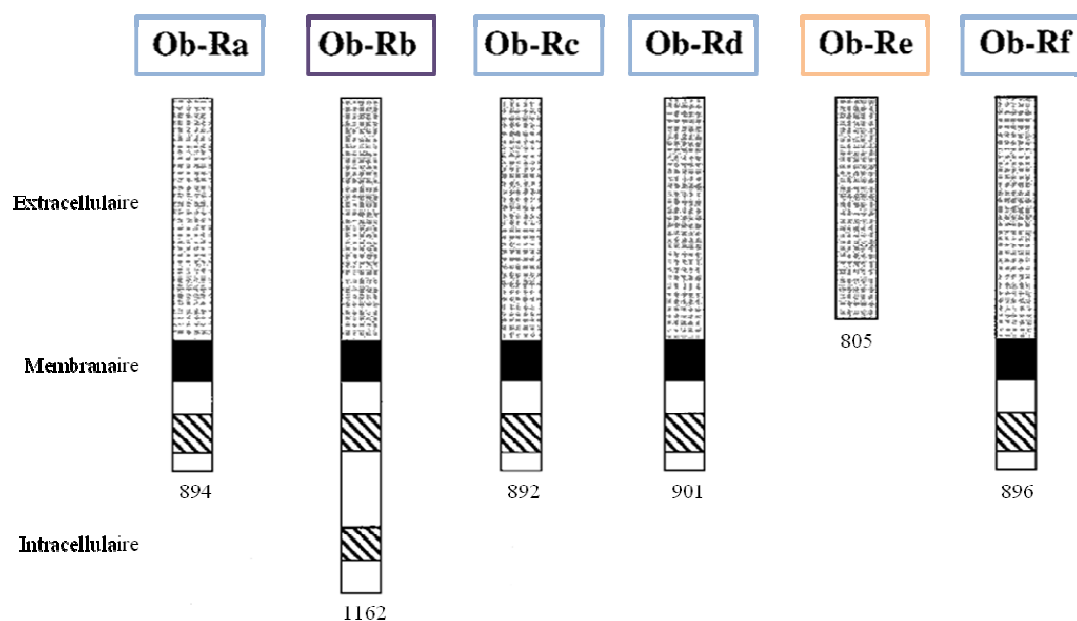


Figure 6 : Les différentes isoformes du récepteur de la leptine
[Source : (Ahima and Flier, 2000)]

Le récepteur de la leptine appartient à la famille des récepteurs aux cytokines de classe I et ne possède donc pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque.

Toutes les isoformes du récepteur partagent un domaine extracellulaire commun en position amino-terminale qui contient le site de liaison à la leptine. Le domaine intracellulaire carboxy-terminal varie entre les différents isoformes :

- ObRb, forme longue du récepteur, est la seule à posséder un domaine intracellulaire complet, comportant les motifs nécessaires à la fixation des protéines JAK (Janus Kinase) et STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) et donc à la transduction du signal
- ObRe, forme soluble du récepteur, ne possède ni domaine transmembranaire ni domaine intracellulaire. Cette isoforme est considérée comme la protéine de liaison de la leptine dans le plasma
- ObRa, c, d et f, formes courtes du récepteur, possèdent un domaine intracellulaire tronqué. Ces isoformes sont parfois présentées comme des transporteurs potentiels de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique

Les différentes isoformes du récepteur de la leptine possèdent un domaine extracellulaire de 816 acides aminés en position N-Terminale comportant le site de liaison de l'hormone

(Fig. 7).

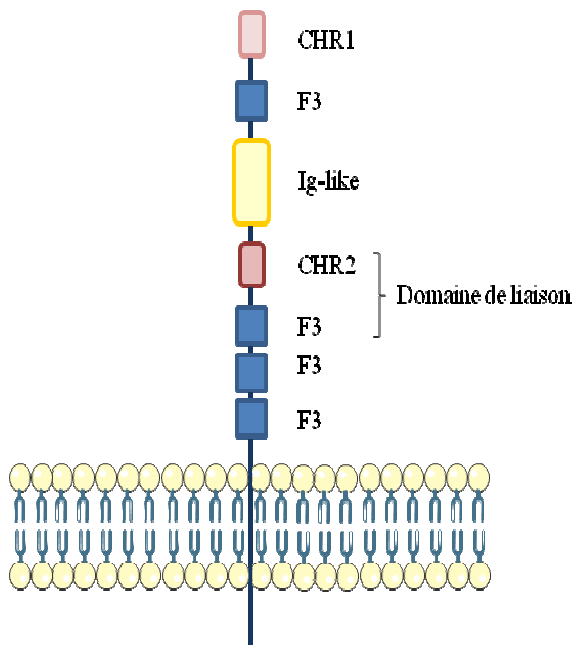


Figure 7 : Domaine extracellulaire de la leptine
[Source : (Fong et al., 1998)]

La portion extracellulaire d'ObR comporte deux domaines CRH (Cytokine Receptor Homology Domain) : CHR1 et CHR2 qui sont composés des motifs Trp-Ser-X-Trp-Ser caractéristiques de la famille des récepteurs aux cytokines de classe I (Heim et al., 1996). La partie extracellulaire d'ObR est aussi composée d'un domaine « Immunoglobuline-like » et de quatre domaines F3 (motifs d'homologie à la fibronectine de type III). L'association du domaine CHR2 et d'un motif F3 constitue le site de liaison à la leptine, tandis que le domaine CHR1 et les motifs Ig-like sont indispensables à l'activation du récepteur par l'hormone (Zabeau et al., 2004).

Le segment transmembranaire ainsi que le domaine intracellulaire C-Terminal du récepteur permettent de classer les différentes isoformes en trois catégories :

- une isoforme longue : ObRb
- une isoforme soluble : ObRe
- des isoformes courtes : ObRa,c,d,f

En absence de leptine, ObR peut être présent sous forme d'homodimères ObRb/ObRb et ObRa/ObRa ou d'hétérodimères ObRb/ObRa au niveau de la membrane plasmique (Biener et al., 2005), cependant ces derniers ne seraient pas capables d'induire la transduction du signal. En présence de leptine, cette dernière se fixe sur le domaine de liaison de son récepteur selon une stochiométrie 1:1, formant au final un complexe tétramérique composé de deux molécules de leptine et de deux molécules d'ObRa ou de deux molécules d'ObRb (Devos et al., 1997).

L'isoforme longue : ObRb

Cette isoforme assure de façon majoritaire l'activation des voies de signalisation de la leptine. Comme tout récepteur aux cytokines de classe I, ObR ne possède pas d'activité kinase intrinsèque. La présence de protéines tyrosines kinases constitutivement associées au récepteur est donc nécessaire à la transduction du signal (Baumann et al., 1996; Devaskar et al., 1997). Ce sont les protéines JAK-2 (*Janus Kinase*) qui remplissent ce rôle. En effet, ObRb possède au niveau de son domaine intracellulaire de 302 acides aminés des domaines de liaisons aux protéines kinases JAK-2 ainsi qu'aux protéines STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) toutes deux impliquées dans la cascade de signalisation décrite ci-après [Fig 8 ; (Bahrenberg et al., 2002; Baumann et al., 1996)].

1) La fixation de la leptine à son récepteur induit un changement de conformation chez ce dernier (Biener et al., 2005; Couturier and Jockers, 2003; Niv-Spector et al., 2005) permettant l'activation des protéines JAK par transphosphorylation. Bien qu'il existe 4 protéines JAK, la transduction du signal de la leptine est majoritairement médiée par la protéine JAK2 (Bjorbaek et al., 1997) ainsi que par JAK1 dans une moindre mesure.

2) Une fois les protéines JAK activées, ces dernières phosphorylent le récepteur leptine au niveau des résidus tyrosine 985, 1077 et 1138 situés dans le domaine intracytoplasmique d'ObR (Ihle and Kerr, 1995).

3) La phosphorylation d'ObRb sur son résidu 1138 permet le recrutement de protéines et l'activation par phosphorylation sur résidu tyrosine de protéines STAT (Stahl et al., 1995). La phosphorylation des protéines STAT provoque leur dissociation du récepteur de la leptine ainsi que leur dimérisation. Les dimères formés transloquent ensuite dans le noyau, se fixent à l'ADN via leur domaine de liaison et régulent ainsi la transcription de gènes cibles. En effet, les protéines STAT sont des facteurs de transcription constituant la voie de signalisation majoritaire des cytokines (Ihle and Kerr, 1995; Leonard, 2001). Chez les mammifères, sept membres composent cette famille (STAT1 à STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6). In vivo, la signalisation associée au récepteur de la leptine dans l'hypothalamus fait majoritairement intervenir la protéine STAT3 (Benomar et al., 2005b; Vaisse et al., 1996).

Si la voie de signalisation JAK2/STAT3 est particulièrement impliquée dans la régulation de la prise alimentaire par la leptine au niveau hypothalamique, l'hormone est cependant susceptible d'activer d'autres voies de signalisation que sont les voies IRS/PI3K (*Insulin*

Receptor Substrate/ Phosphatidylinositol-3 Kinase) (Benomar et al., 2005a; Benomar et al., 2005b; Bjorbaek et al., 1997; Niswender et al., 2001) et le module des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Bjorbaek et al., 1997). L'activation de la voie des MAPK fait intervenir la protéine SHP-2 (*SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase*), phosphorylée par JAK2 ou directement activée au niveau du domaine intracellulaire d'ObRb. SHP-2 se complexe ensuite à la protéine Grb-2 (*Growth factor receptor binding protein*) pour activer *in fine* les protéines Ras et Raf (Fig. 8; (Rahmouni et al., 2009).

La voie de signalisation IRS/PI3K est majoritairement associée à l'insuline, cependant ObRb est aussi capable de recruter certains acteurs de la voie de signalisation, soit directement, soit via JAK2 (Berti et al., 1997 ; Bjorbaek et al., 1997 ; Szanto & Kahn, 2000). L'activation de la PI3K aboutit à la phosphorylation de la protéine kinase B : Akt et de la protéine kinase C : PKC. Bien que l'activation d'Akt par la leptine reste minoritaire en regard des autres voies impliquées dans la transduction du signal, cette voie offre néanmoins des possibilités de dialogue entre l'insuline et la leptine, leur permettant d'agir en synergie ou de manière opposée (Benomar et al., 2005a; Berthou et al., 2011; Carvalheira et al., 2005).

par ses différents voies de signalisations, la leptine régule l'expression de gènes cibles impliqués dans le contrôle de différents processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, le développement, l'apoptose, ou encore le métabolisme. L'internalisation du complexe ObRb-leptine et sa dégradation par les lysosomes signe la terminaison du signal (Couturier et al., 2007; Uotani et al., 1999).

Les voies de signalisation de la leptine sont sous le contrôle de boucles de régulation faisant intervenir des régulateurs négatifs endogènes que sont les protéines SOCS (*Suppressor of Cytokine Signaling*) et PTP-1B (*Protein Tyrosine Phosphatase 1B*) [Fig. 8 ; (Couturier et al., 2007; Uotani et al., 1999)].

Les protéines SOCS agissent au niveau des récepteurs de la leptine soit en empêchant le recrutement de STAT par encombrement sérique (Nicholson et al., 2000), en inhibant les protéines JAK (Sasaki et al., 1999) ou en induisant l'ubiquitination des protéines de la voie de signalisation, programmant ainsi leur dégradation par le protéasome. L'expression hypothalamique de SOCS-3 est augmentée lors d'un traitement à la leptine La transcription du gène codant SOCS-3 est activée par la fixation du facteur de transcription STAT3 au niveau de séquences spécifiques de l'ADN (Fig. 8). Nous verrons par la suite que SOCS-3 peut s'avérer un bon marqueur des états de leptino-résistance (Bjorbaek et al., 1999).

La phosphatase PTP-1B est un second régulateur négatif de la signalisation associée au récepteur de la leptine. PTP-1B déphosphoryle les protéines JAK2 et STAT3 (Lund et al., 2005). Outre son rôle dans la régulation de la voie JAK2/STAT3, PTP-1B agit également sur les voies de signalisation médiées par l'insuline et apparaît comme un élément important du dialogue existant entre les voies de signalisation de la leptine et de l'insuline (Benomar et al., 2009).

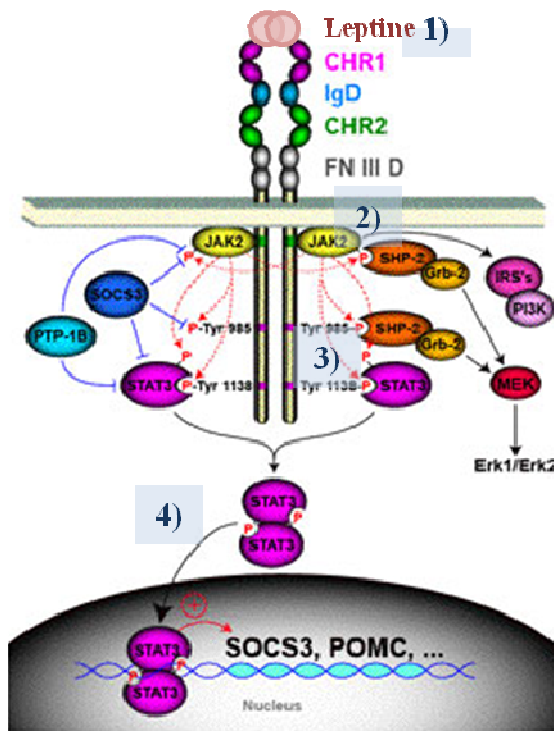


Figure 8 : Voies de signalisation de la leptine
[source : d'après Futura Science 2008]

- 1) Liaison de la leptine à son récepteur selon une stoechiométrie 1:1, formation d'un complexe tétramérique et changement de conformation du récepteur
 - 2) Activation de la protéine kinase JAK2 constitutivement associée à ObRb par transphosphorylation
 - 3) Phosphorylation d'ObRb sur les résidus tyrosine 985, 1077 et 1138, recrutement et activation de STAT3 au niveau du résidu tyrosine 1138
 - 4) Dimérisation et translocation de STAT3 dans le compartiment nucléaire pour réguler la transcription de gènes cibles tels que SOCS-3 ou POMC.
- SOCS-3 et PTP-1B sont deux régulateurs négatifs de la signalisation induite par la leptine.

Initialement, l'isoforme ObRb a exclusivement été décrite dans le système nerveux central, par opposition à ObRa, décrite en périphérie. Depuis, une faible expression d'ObRb a aussi été mise en évidence au niveau de nombreux organes périphériques tels que le tissu adipeux, les glandes surrénales, les reins, les poumons, le cœur, les muscles, les intestins, le pancréas, le foie, la glande mammaire et le placenta (Fei et al., 1997).

Au niveau du système nerveux central, ObRb est majoritairement exprimé par l'hypothalamus, mais aussi par des structures cérébrales extra-hypothalamiques telles que l'hippocampe, le cortex frontal, le thalamus, le cervelet, l'amygdale et la substance noire ou encore certains noyaux du tronc cérébral comme le noyau du tractus solitaire (Burgos-Ramos et al., 2010; Elmquist et al., 1998b; Grill et al., 2002; Hakansson et al., 1998; Mercer et al., 1996). Dans l'hypothalamus, ObRb est majoritairement exprimé par les neurones orexigènes et anorexigènes du noyau arqué (Baskin et al., 1999; Cheung et al., 1997; Elmquist et al.,

1998b; Mercer et al., 1996; Schwartz et al., 1997; van den Top et al., 2004), des noyaux dorso et ventro-médians (Funahashi et al., 1999; Meister et al., 1989) ainsi que de l'aire hypothalamique latérale (Leininger et al., 2009) et du noyau paraventriculaire (Mercer et al., 1996; Scott et al., 2009). Les cellules astrocytaires expriment aussi l'isoforme longue du récepteur de la leptine notamment dans des modèles d'obésité, suggérant l'importance de ce type cellulaire dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Hsueh et al., 2009a; Hsueh et al., 2009b; Pan et al., 2008a; Pan et al., 2011).

L'isoforme soluble : ObRe

Cette isoforme est dépourvue de segment transmembranaire et de domaine intracellulaire. Elle est qualifiée de protéine de liaison de la leptine (Lammert et al., 2001). Il est proposé qu'ObRe assurerait le transport de la leptine dans le compartiment plasmatique, stabiliserait la leptine plasmatique et régulerait la proportion de leptine dans le plasma (Lou et al., 2010). Une autre hypothèse présente ObRe comme un antagoniste au passage de la leptine par la barrière hémato-encéphalique, la piégeant ainsi dans le compartiment plasmatique (Pan et al., 2008a; Tu et al., 2008). Aujourd'hui, ObRe, reste le sujet de nombreuses études, notamment dans des cas d'obésité humaine (Guran et al., 2009; Ogawa et al., 2004; van Dielen et al., 2002; Wu et al., 2002). En effet, si chez l'homme ObRe n'est pas produit par épissage alternatif l'isoforme est néanmoins présente dans la circulation sanguine. Différents auteurs ont suggéré que la forme humaine d'ObRe résulterait du clivage protéolytique d'ObRa ou ObRb (Maamra et al., 2001), exerçant ainsi un rôle majeur dans le contrôle des effets physiologiques assurés par la leptine. A ce jour, le rôle joué par ObRe dans la régulation de l'homéostasie énergétique n'est pas encore totalement compris.

L'isoforme ObRe est exprimée par les plexus choroïdes au niveau central et par le foie, les poumons, le cœur, la rate, les reins ou encore les testicules au niveau périphérique (Lollmann et al., 1997).

Les isoformes courtes : ObRa, c, d, f

Ces isoformes possèdent un domaine intracellulaire tronqué de 30 à 40 acides aminés. La capacité de l'isoforme ObRa à activer les voies de signalisation reste sujette à débat. Certaines études ont montré qu'ObRa était capable d'activer les voies de signalisation IRS1 et MAPK (Bjorbaek et al., 1997; Yamashita et al., 1998), tandis que d'autres auteurs supposent qu'ObRa ne possède pas les motifs intracellulaires nécessaires à l'activation des JAK (Kloek et al., 2002).

Si les isoformes ObRd et f sont assez peu exprimées, en revanche, ObRa ubiquitaire, comme le démontrent une myriade d'études (Fei et al., 1997; Hoggard et al., 1997; Laud et al., 1999; Lollmann et al., 1997; Lostao et al., 1998; Margetic et al., 2002). Au niveau central, ObRa et ObRc sont présents au niveau des plexus choroïdes ainsi que des micro-vaisseaux (Hileman et al., 2002; Tartaglia et al., 1995), suggérant un rôle potentiel de la protéine dans le passage de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique (Banks et al., 1996; Bouret, 2008; Hileman et al., 2002; Tartaglia et al., 1995). Les mécanismes de transport de la leptine depuis la périphérie jusqu'au parenchyme nerveux ne sont pas encore totalement décryptés de nos jours et seront présentés dans la suite de ce manuscrit.

ObRGRP

Outre les isoformes d'ObR précédemment décrites, un autre transcrite est généré à partir du même promoteur. Ce transcrite code pour l'ObRGRP (ObR Gene-Related-Protein) aussi appelé LEPROT (Leptin Receptor Overlapping Transcript), protéine de 14 kDa qui ne présente pas d'homologie de séquence mais une distribution tissulaire similaire à celle d'ObR, notamment au niveau de l'hypothalamus (Bailleul et al., 1997; Huang et al., 2001; Mercer et al., 2000).

ObRGRP est impliqué dans le trafic intracellulaire du récepteur de la leptine, modulant sa dégradation par les lysosomes et par conséquent sont expression en surface des cellules (Belgareh-Touze et al., 2002; Couturier et al., 2007).

Au niveau cellulaire, ObRGRP inhibe la translocation membranaire d'ObR et réprime les voies de signalisation associées au récepteur. En revanche, l'inhibition de l'expression d'ObRGRP dans le noyau arqué augmente de façon significative le nombre de récepteurs de la leptine en surface des cellules, permettant ainsi d'augmenter la sensibilité des cellules à la leptine [Fig. 9 ; (Couturier et al., 2007)].

ObRGRP apparaît donc comme un agent capable de prévenir les cas de leptino-résistance induits par une alimentation hypercalorique (modèle *DIO* : *Diet Induced Obesity*)

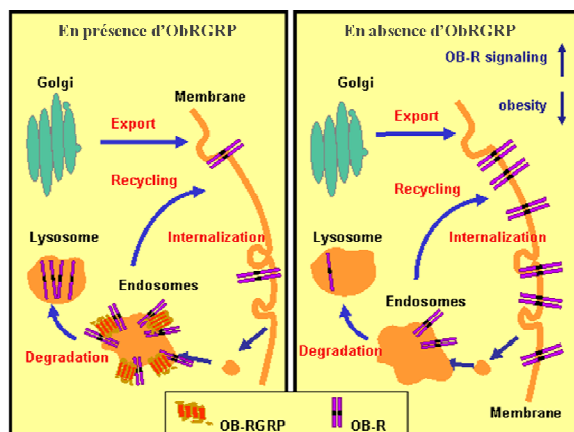


Figure 9 : Régulation de l'expression d'ObR à la membrane plasmique par ObRGRP
[Source : (Couturier et al., 2007)]

ObRGRP module la distribution d'ObR entre le cytoplasme et la membrane plasmique. L'absence d'ObRGRP induit une augmentation de l'expression d'ObR en surface des cellules.

Effets biologiques

L'expression ubiquitaire de la leptine et de son récepteur, lui permettent d'intervenir au niveau de nombreux tissus et organes pour réguler des processus physiologiques variés tels que le métabolisme, la reproduction, l'immunité, le remodelage osseux ou encore la vascularisation. Les modèles murins présentant des mutations du gène codant la leptine (modèle ob/ob) ou de celui codant son récepteur (modèle db/db) ont permis l'étude des effets biologiques médiés par la leptine.

Effets biologiques au niveau du système nerveux central

Le contrôle de l'homéostasie énergétique

La leptine agit au niveau système nerveux central pour inhiber la prise alimentaire. Chez le modèle murin ob/ob présentant une mutation du gène codant la leptine, l'injection intracérébroventriculaire de l'hormone inhibe la prise de nourriture et diminue le poids corporel (Ahima and Flier, 2000; Elmquist et al., 1999). Dans le système nerveux central, l'hypothalamus représente une cible majeure à l'action anorexigène de la leptine. En effet, diverses études ont montré que des injections intrapéritonéales de leptine, produite proportionnellement à la masse adipeuse, induisaient l'activation des neurones des noyaux hypothalamiques (Ahima, 2000; Elmquist et al., 1998a; Hakansson et al., 1998; Schwartz et al., 1996).

Au niveau du noyau arqué, la leptine module l'activité des neurones orexigènes et anorexigènes. En effet, elle inhibe l'expression des neuropeptides orexigènes NPY et AgRP (Morrison et al., 2005; Schwartz et al., 1996; Stephens et al., 1995) et active l'expression des neuropeptides anorexigènes POMC et CART (Elias et al., 1998; Thornton et al., 1997) via l'activation des voies de signalisation JAK2/(Gong et al., 2008; Munzberg et al., 2003; Xu et al., 2007; Yang et al., 2009) et dans une moindre mesure IRS/PI3K (Pardini et al., 2006).

D'un point de vue électrophysiologique, la leptine module l'ouverture des canaux potassiques ATP-dépendants des neurones du noyau arqué (Spanswick et al., 1997), inhibant ainsi l'activité de ces neurones. Au niveau des neurones anorexigènes, la leptine induit l'activation de cette population neuronale via la voie IRS/PI3K (Yang et al., 2010). La leptine induit d'une part par la dépolarisation des neurones POMC/CART (Cowley et al., 2001; Hill et al., 2008) et d'autre part par la levée des inhibitions gabaergiques exercées par les neurones orexigènes sur les neurones anorexigènes (Jobst et al., 2004; van den Top et al., 2004). Si la participation des cellules astrocytaires dans la régulation leptine-dépendante de l'activité

synaptique des neurones n'est à ce jour pas encore totalement décryptée, plusieurs auteurs ont néanmoins suggéré que les astrocytes pourraient jouer un rôle dans ce processus au niveau de l'hypothalamus (Hsueh et al., 2009a; Hsueh et al., 2009b; Pan et al., 2008a; Pan et al., 2011). Garcia-Caceres et ses collaborateurs ont récemment démontré que la morphologie des astrocytes hypothalamiques est modifiée suite à des injections intracérébroventriculaires de leptine (Garcia-Caceres et al., 2011), renforçant l'hypothèse d'une intervention des cellules gliales de l'hypothalamus dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

Diverses études présentent le noyau arqué comme le centre d'action primaire de la leptine, selon le modèle présenté par Schwartz. Ce modèle s'appuie notamment sur l'expression prédominante d'ObRb dans les cellules du noyau arqué (Morton et al., 2003) ainsi que sur l'abolition de l'action anorexigène d'une injection intracérébroventriculaire de leptine lorsque le noyau arqué est lésé (Dawson et al., 1997). Des expériences de microinjections de leptine localement au niveau du noyau arqué suffisent par ailleurs à induire une réponse anorexigène (Satoh et al., 1997a).

Un second modèle a été proposé, s'appuyant notamment sur le fait que les neurones de 1^{er} ordre ne peuvent médier à eux seuls l'action de l'hormone. En effet, les données de la littérature ont montré que ObRb n'était pas exprimé par la totalité des neurones POMC du noyau arqué (Munzberg et al., 2003); d'autre part l'activité des neurones NPY/AgRP et POMC/CART est aussi modulée par d'autres facteurs de régulation tels que la ghréline (Chen et al., 2004), l'insuline (Niswender et al., 2004) ou le glucose (Parton et al., 2007) pour ne citer qu'eux. Enfin, l'inactivation spécifique de ObR dans les neurones POMC et NPY conduit au développement d'une obésité modeste et ne cause pas les symptômes d'infertilité ou d'hypercortisolémie observés dans le modèle murin db/db (Balthasar et al., 2004). Renforçant le concept selon lequel la leptine agirait de manière simultanée sur l'ensemble des noyaux hypothalamiques, pour activer plusieurs voies au sein de l'hypothalamus, plusieurs études ont montré qu'ObRb est aussi exprimé dans les noyaux hypothalamiques de second ordre (Funahashi et al., 1999; Hakansson et al., 1998; Kalra et al., 1999; Leininger et al., 2009; Meister et al., 1989) et que des injections de leptine étaient actives sur les neurones des noyaux paraventriculaires, dorso et ventromédians.

Les travaux de Myers ont depuis généralisé le modèle d'Elmqvist, proposant un rôle plus global de la leptine au niveau des régions de l'encéphale (Myers and Simerly, 2010), et suggérant que le large spectre de fonctions régulées par la leptine ne saurait être dû à la seule

activation de l'hypothalamus ventromédian. Plus spécifiquement, le contrôle de l'homéostasie énergétique résulterait de l'action combinée de la leptine sur plusieurs régions cérébrales extra-hypothalamiques, telles que l'aire tegmentaire ventrale et le striatum pour la composante hédonique de la prise de nourriture (Hommel et al., 2006), ou le noyau du tractus solitaire pour la sensation de satiété (Huo et al., 2007). Ces régions peuvent être directement activées par la leptine ou indirectement, via les projections provenant de l'hypothalamus.

Si l'hypothalamus et tout particulièrement le noyau arqué remplissent un rôle primordial dans la régulation de la prise alimentaire par la leptine, le schéma d'action de l'hormone reste cependant particulièrement complexe de par la multiplicité des structures sensibles à l'action de la leptine.

La plasticité cellulaire et la cognition

A côté de son rôle de facteur de satiété, la leptine intervient aussi dans des processus de plasticité synaptique, notamment dans certaines régions cérébrales extra-hypothalamiques telles que le cortex cérébral, l'hippocampe ou encore le cervelet. Bien que n'étant pas directement impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire, ces régions sont sensibles aux variations du statut énergétique et expriment la forme longue du récepteur de l'hormone (Couce et al., 1997). L'implication de la leptine dans le contrôle de certains processus cognitifs a été mise en évidence dans des situations pathologiques telles que l'obésité (Harvey, 2007). Ainsi, l'invalidation du gène codant la leptine ou son récepteur notamment chez les souris db/db ainsi que chez les rats *Zucker* est liée à des déficits d'apprentissages (Ohta et al., 2003; Winocur et al., 2005). Des études ont montré que la leptine pourrait influencer les performances mnésiques et les capacités d'apprentissage en modifiant la structure et l'excitabilité des neurones ainsi que la survie la prolifération des cellules (Harvey, 2007). Plus précisément, la leptine module les fonctions neuronales et synaptiques au sein des structures précédemment citées en agissant localement au niveau de la synapse (Harvey, 2007) pour réguler le fonctionnement du récepteur au glutamate NMDA (Shanley et al., 2001) et des canaux potassiques de large conductance (Oomura et al., 2006), modulant ainsi les processus de potentialisation (LTP) et dépression (LTD) à long terme (Li et al., 2002). Ces effets impliquent la voie PI3K et les MAP Kinases (Irving et al., 2006). La leptine est aussi capable de moduler la structure des neurones hypothalamiques et extra-hypothalamiques. Elle favorise notamment la croissance et l'arborisation neuritique (Oldreive et al., 2008), module la morphogenèse du cône de croissance (Valerio et al., 2006) et régule l'activation des

neurones du noyau arqué (Pinto et al., 2004). Enfin, la leptine agit aussi comme un agent neuroprotecteur, favorisant la survie neuronale et la prolifération cellulaire (Signore et al., 2008). Cette dernière fonction est particulièrement primordiale lors des périodes de développement des structures cérébrales. En effet, durant la période périnatale la leptine agit comme un agent neurotrophique et module la mise en place des réseaux neuronaux qui régulent la prise alimentaire dans l'hypothalamus (Bouret et al., 2004). L'ontogénie de la leptine pendant la période périnatale sera détaillée par la suite.

Effets biologiques au niveau des organes périphériques

Le tableau ci-dessous offre un aperçu synthétique des effets relayés par la leptine dans les organes périphériques.

Tableau 1 : action de la leptine au niveau des organes périphériques

[Source : d'après (Margetic et al., 2002)]

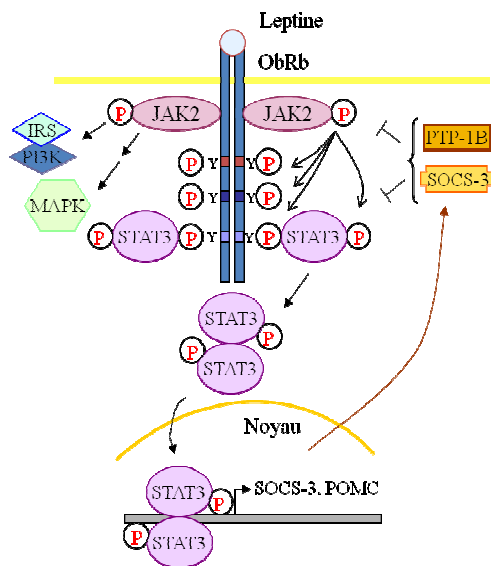
UCP : Uncoupled Chain Protein

Tissu ou organe	Effets biologiques	Références
Foie	Stimule la néoglucogenèse Inhibe la formation des triglycérides	Kamohara et al., 1997 ; Rosetti et al., 1997 Flier et al., 1997
Pancréas	Stimule la production d'insuline	Fehmann et al., 1997 ; Seufert et al., 1999 ; Poitout et al., 1998
Muscle squelettique	Stimule le transport du glucose Stimule l'expression d'UCP2, UCP3	Muoio et al., 1997 Gong et al., 1997 ; Liu et al., 1998
Tissu adipeux	Inhibe l'accumulation des triglycérides Stimule la lipolyse Stimule la thermogénèse	Frühbeck et al., 1998 Wang JL et al., 1999
		Cusin et al., 1998 ; Gong et al., 1997 ; Commins et al., 1999 ; Scarpace et al., 1998
Tractus gastro-intestinal	Favorise l'absorption des nutriments	Guilmeau et al., 2004
Utérus	Participe à la croissance fœtale et au métabolisme	Ciofi et al., 1997 ; De Placido et al., 2006
Glande mammaire	Participe au développement des structures	Bonnet et al., 2002 ; Lin et al., 2007
Sang	Hématopoïèse	Cao et al., 2001 ; Park et al., 2001

Synthèse : la leptine

La **leptine** est une hormone de 16 kDa majoritairement synthétisée par le **tissu adipeux**.

Elle agit comme **facteur de satiété** en modulant l'activité de noyaux hypothalamiques spécifiques. Le récepteur de la leptine appartient à la famille des récepteurs aux **cytokines de classe I** et existe essentiellement sous six isoformes : résultant de l'épissage alternatif du **gène db** (ou *Lepr*). Ces isoformes se répartissent en trois classes : **ObRb** (forme longue), **ObRa,c,d,f** (formes courtes au domaine intracellulaire tronqué, d'où activation partielle des voies de signalisation) et **ObRe** (forme soluble correspondant à une protéine de liaison de la leptine, sans domaine transmembranaire ni intracellulaire). La forme longue du récepteur de la leptine assure les actions physiologiques de la leptine telles que le maintien de la balance énergétique. Cette forme est fortement exprimée dans l'**hypothalamus**.



Synthèse 2 : Schéma récapitulatif des voies hypothalamiques orexigènes et anorexigènes de l'hypothalamus

IRS : Insulin Receptor Substrate, JAK2 : Janus Kinase 2, MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase, ObR : récepteur leptine, PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase, POMC : Pro-opiomelanocortin, PTP-1B : Protein Tyrosine Phosphatase-1B, SOCS-3 : Suppressor of Cytokine Signaling-3, STAT-3 : Signal Transduction and Activator of Transcription.

Outre son rôle prépondérant dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, la leptine intervient dans des processus physiologiques variés tels que la thermogenèse, la reproduction, le métabolisme osseux ou encore l'immunité. De plus, la leptine exercerait une action neuroprotectrice dans certaines régions cérébrales sujettes à la neurodégénérescence (Weng et al., 2007) et serait impliquée dans certains processus de plasticité synaptique (Shanley et al., 2001). La leptine possède enfin une action neurotrophique lors du développement des voies hypothalamiques du contrôle de la prise alimentaire (Bouret et al., 2008)

3.3. Bilan sur les signaux de régulation

Il semble difficile de présenter une liste exhaustive des facteurs impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, c'est pourquoi nous avons focalisé notre attention sur les principaux d'entre eux. La figure 11 présente une synthèse des signaux qui participent au contrôle de l'homéostasie énergétique.

D'autre part, il est important de garder à l'esprit que si la classification entre signaux dits « court terme » et signaux dits « long terme » est aisée, elle n'est pas figée. En effet, nombre de signaux à « court terme » tels que la ghréline, la cholécystokinine ou le *Glucagon-Like-Peptide-1* exercent aussi une action retardée sur la régulation de la prise alimentaire. De même, certains signaux dits « à long terme » tels que l'insuline ou la leptine agissent aussi au niveau du tractus gastro-intestinal, régulant de manière « immédiate » la prise de nourriture. Certains auteurs préfèrent désormais discriminer les signaux de régulations périphériques des signaux centraux ainsi que les signaux anorexigènes des signaux orexigènes.

Molécules stimulant la prise alimentaire et réduisant la dépense énergétique	Molécules réduisant la prise alimentaire et augmentant la dépense énergétique
Neuropeptide Y (NPY)	<i>Alpha-melanocyte stimulating hormone</i> (α -MSH)
<i>Agouti-related protein</i> (AgRP)	<i>Cocaine and amphetamine related peptides</i> (CART)
<i>Melanin-concentrating hormone</i> (MCH)	Urocortine
Galanine	<i>Corticotropin-releasing factor</i> (CRF)
Noradrénaline	<i>Thyrotropin-releasing hormone</i> (TRH)
Orexines A et B (ou hypocrétines)	Neurotensine
Opioides	Sérotonine
Endocannabinoïdes	Leptine
β -endorphine	Insuline
Ghréline	<i>Glucagon-like peptide1</i> (GLP-1)
	Peptide YY ₃₋₃₆ (PYY ₃₋₃₆)
	Oxyntomoduline
	Cholécystokinine (CCK)
	<i>Oleylethanolamide</i> (OEA)
	<i>N-acyl phosphoethanolamine</i> (NAPE)

Les signaux centraux (gras) et circulants impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique.

Figure 10 : récapitulatif des facteurs de régulation de la prise alimentaire [source : (Luquet and Magnan, 2009)]

Le contrôle de l'homéostasie énergétique fait intervenir de très nombreux signaux de régulation, produits par le système nerveux central ou par les organes périphériques selon une cinétique définie par la prise de nourriture et régulant positivement ou négativement la prise alimentaire.

3.4. Les voies d'entrée des signaux dans l'hypothalamus

La régulation centrale de l'homéostasie énergétique nécessite que les signaux de régulation périphériques atteignent leurs cibles au niveau de l'hypothalamus et franchissent par conséquent les interfaces séparant le sang du parenchyme nerveux.

3.4.1. Les interfaces sang, LCR (Liquide-Céphalo-Rachidien)/cerveau

Historique

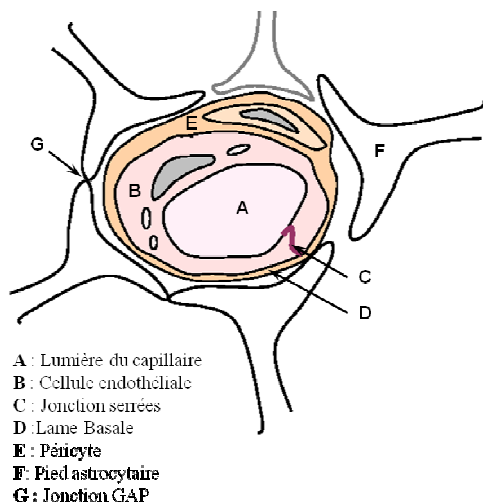
Le concept de l'existence d'une barrière anatomique séparant le cerveau de la circulation sanguine a vu le jour au cours du XIX^e siècle, à partir des travaux d'Ehrlich. Ce scientifique allemand a en effet démontré que l'injection intraveineuse d'un colorant vital, le bleu d'aniline fixant les protéines plasmatiques, induisait la coloration de tous les organes à l'exception du cerveau (Ehrlich, 1885). Par la suite, les travaux de Goldman confirment l'hypothèse d'Ehrlich et suggèrent une fonction protectrice de cette barrière contre les substances neurotoxiques (Goldman, 1909, 1913).

L'hypothalamus ventro-médian se trouve à la jonction de trois interfaces sang, LCR/cerveau:

- une interface sang/parenchyme nerveux : la barrière hémato-encéphalique (BHE)
- une interface sang/parenchyme nerveux/ LCR : les organes circumventriculaires
- une interface sang/LCR : les plexus choroïdes

Ces systèmes jouent un rôle de barrière physique et de filtre régulant les échanges entre le sang, le LCR (*Liquide-Céphalo-Rachidien*) et le parenchyme nerveux. Leur intégrité est primordiale au maintien de l'homéostasie cérébrale, dont dépendent le développement et le fonctionnement cérébral.

La barrière hémato-encéphalique : BHE



*Figure 11 : anatomie de la barrière-hémato-encéphalique
[Source : d'après Kim et al., 2006]*

Les principaux éléments constitutifs de la BHE sont les jonctions serrées des cellules endothéliales, les péricytes, la lame basale et les pieds astrocytaires.

La barrière hémato-encéphalique est localisée au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux. Elle est composée des cellules endothéliales (Fig. 12B), liées entre elles par des jonctions serrées (Fig. 12C) formant un endothélium peu perméable si ce n'est aux petites molécules liposolubles (Chaudhuri, 2000; Pardridge, 2005). Les cellules endothéliales composant la BHE présentent une faible épaisseur et de nombreuses mitochondries, caractéristiques d'un métabolisme énergétique intense. Elles reposent sur une lame basale (Fig. 12D) composée de fibres de collagène IV, de laminine et de fibronectine et entourant les péricytes (Fig. 12E). Si ces derniers sont nécessaires à la structure de la BHE, leur rôle demeure encore incertain (Dore-Duffy, 2008).

Les astrocytes sont le dernier composant de la BHE. Ces cellules émettent des prolongements (Fig. 12F) recouvrant les capillaires cérébraux et les péricytes (Kacem et al., 1998) et sont liés au moyen de jonctions communicantes (jonctions GAP, Fig. 12G), formant ainsi un syncytium plastique dont la signalisation est assurée par des vagues calciques (Giaume and McCarthy, 1996; Theis et al., 2005). Le rôle structural des astrocytes dans la formation de la BHE suscite toujours un vif intérêt scientifique sujet à débat (Ballabh et al., 2004). En effet, si des études menées sur des cultures de cellules endothéliales ont suggéré que les principales caractéristiques de la BHE (systèmes de transports, présence de jonctions serrées) seraient « astrocytes-dépendantes » (Hayashi et al., 1997), d'autres auteurs ont cependant critiqué les modèles de culture cellulaire développés et présentent un discours plus modéré quant à l'implication des astrocytes matures dans le fonctionnement de la BHE (Krum et al., 1997). Au-delà de ce débat « structural » s'est posée la question du rôle fonctionnel des astrocytes. La capacité de ces cellules à contacter via leurs prolongements les neurones d'une part et les cellules endothéliales d'autre part, leur permet en effet de former une unité glio-vasculaire capable d'adapter le flux sanguin et l'apport de nutriments aux besoins du parenchyme nerveux. D'autre part, les substrats hydrophiles du sang ne traversent pas la BHE spontanément et nécessitent des transporteurs spécifiques présents au niveau des pieds astrocytaires pour gagner le parenchyme nerveux. Plus que de simples « cellules de soutien », les astrocytes, situés à l'interface entre les neurones et les vaisseaux sanguins, joueraient donc un rôle essentiel dans la régulation du métabolisme cérébral et l'accessibilité des signaux au parenchyme nerveux.

Les organes circumventriculaires et les plexus choroïdes

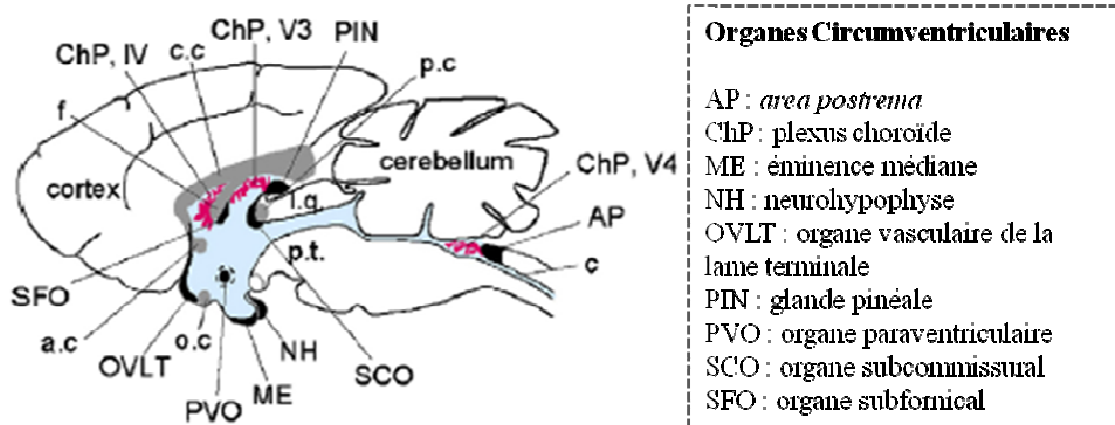


Figure 12 : distribution des principaux organes circumventriculaires et des plexus choroïdes dans l'encéphale

[Source : d'après (Joly et al., 2007)]

ac : commissure antérieure, c : canal central, cc : corps calleux, f : fornix, lq : lamina des quadrijumeaux, oc : chiasma optique, pc : commissure postérieure, pt : tubercule postérieur

Les organes circumventriculaires sont des zones de l'encéphale localisées le long des ventricules au niveau desquelles la BHE est « perméable ». Suivant leur fonction, les CVOs peuvent être classés en plusieurs catégories : CVOs sécréteurs (OVLT, SFO, AP), CVOs sensoriels (EM, glande pinéale).

Les organes circumventriculaires : CVOs

Les organes circumventriculaires (CVOs) sont des régions de petites tailles dans l'encéphale, regroupées autour des ventricules (Fig. 13), caractérisées par une barrière hémato-encéphalique perméable car présentant un endothélium dénué de jonctions serrées et autorisant donc la diffusion de molécules dans l'espace périvasculaire (Ciofi et al., 2009; Duvernoy and Risold, 2007). Outre ce réseau vasculaire fenêtré, les CVOs sont aussi composés de cellules épendymogliales spécialisées : les tanocytes dont les corps cellulaires forment les bordures des ventricules et qui émettent un prolongement unique vers le parenchyme nerveux. Ces cellules présentent les caractéristiques propres aux processus de sécrétion ou d'absorption (mitochondries abondantes, nombreuses vésicules, réticulum endoplasmique développé) (Rodriguez et al., 2010; Rodriguez et al., 1979). Outre les prolongements tanocytaires, la zone subépendymale des CVOs comporte aussi des astrocytes et des oligodendrocytes.

Bien que présentant une barrière hémato-encéphalique perméable, les CVOs ne peuvent être considérés comme une voie d'entrée ou de sortie directe des molécules car des jonctions serrées au niveau des corps cellulaires et des prolongements des tancytes ont été mise en évidence par microscopie électronique (Brightman and Reese, 1969; Wang et al., 2008).

Plusieurs fonctions ont été proposées pour les CVOs, parmi lesquelles la thermorégulation, la protection contre les substances toxiques, la modulation de la douleur, la régulation de la réponse immunitaire ou encore le contrôle de la balance énergétique (Johnson and Gross, 1993).

Un exemple d'organe circumventriculaire : l'éminence médiane

Située à la base du 3ème ventricule, à proximité du noyau arqué, l'éminence médiane est considérée comme l'organe circumventriculaire sécréteur par excellence, bien que des fonctions sensorielles lui aient également été attribuées (Joly et al., 2007). Cette structure a été identifiée comme une voie de sortie vers la circulation sanguine pour les peptides et les monoamines synthétisés par les différents noyaux hypothalamiques (Krisch and Leonhardt, 1978). L'éminence médiane est composée des corps cellulaires des tancytes de type β_2 , bordant le ventricule (zone épendymaire de l'éminence médiane), de prolongements tancytaires et astrocytaires et de prolongements neuronaux en provenance de l'hypothalamus et à destination de la neurohypophyse (zone interne de l'éminence médiane), et, de capillaires fenêtrés du plexus porte en contact avec les pieds tancytaires et les terminaison nerveuses des neurones hypothalamiques (zone externe de l'éminence médiane) (Duvernoy and Risold, 2007).

L'éminence médiane est directement interconnectée avec le noyau arqué auquel elle est accolée et partage avec ce dernier les mêmes profils de projections et exprime les neuropeptides NPY et AgRP. L'éminence médiane a longtemps été considérée comme une annexe de ce noyau hypothalamique, formant avec ce dernier un complexe arqué-éminence médiane (*AMC : Arcuate-Median eminence Complex*). La confusion entre les deux structures n'est cependant plus d'actualité, et il serait désormais fallacieux de considérer que les interfaces du noyau arqué et de l'éminence médiane présentent les mêmes propriétés.

Les plexus choroïdes (PC)

Parfois classés parmi les organes circumventriculaires, les plexus choroïdes sont des structures papillaires responsables de la formation du LCR (Liquide Céphalo-Rachidien). Ils constituent une interface entre le sang et le LCR. Ils sont au nombre de quatre, répartis entre

les différents ventricules (respectivement deux dans les ventricules latéraux et un dans les 3^{ème} et 4^{ème} ventricules). Les plexus choroïdes sont composés d'un épithélium épendymaire reposant sur une lame basale et enchâssant un noyau fibrovasculaire composé de tissu conjonctif lâche et de vaisseaux sanguins (Strazielle and Ghersi-Egea, 2000).

Contrairement à la BHE, le noyau fibrovasculaire présente de larges capillaires possédant un endothélium fenestré et permettant donc le passage de molécules depuis la circulation sanguine jusqu'au stroma et aux épendymocytes, mais pas au-delà. En effet, l'épithélium épendymaire des plexus choroïdes possède une ceinture de jonctions serrées au niveau du pôle apical. Ces cellules épithéliales présentent d'autre part toutes les caractéristiques histologiques des épithéliums sécrétoires telles que la présence d'interdigitations complexes au niveau du pôle basal des cellules, un grand nombre de mitochondries et de vésicules ou les nombreuses microvillosités présentes au niveau du pôle apical.

Les interfaces du noyau arqué

De par sa proximité avec l'éminence médiane, le noyau arqué est parfois présenté comme partie intégrante d'un complexe noyau arqué-éminence médiane (AMC : Arcuate nucleus-Median eminence-Complex) et assimilé, au moins en partie, à un organe circumventriculaire (Broadwell et al., 1983; Yi et al., 2006). Récemment des études immunohistochimiques se sont attachées à caractériser la BHE au niveau du noyau arqué. L'utilisation de marqueurs spécifiques des capillaires fenêtrés tels que la dysferline (Hochmeister et al., 2006) ou PV1 [*Plamalemmal Vesicle-associated protein 1* ; clone MECA32, (Ciofi, 2011; Ciofi et al., 2009)] ou au contraire de protéines spécifiques des cellules endothéliales de la BHE [EBA : *Endothelial Barrier Antigen*, (Argandona et al., 2005); transferrine, (Orte et al., 1999)] ou des jonctions serrées (Claudine-5 et ZO-1) a mis en évidence la présence d'une BHE hétérogène dans le noyau arqué.

Ainsi, la partie ventro-médiane du noyau arqué, contenant préférentiellement les neurones exprimant AgRP/NPY, présenterait des capillaires fenestrés, caractéristiques des CVOs (Ciofi et al., 2009; Norsted et al., 2008). Cette observation corrobore les résultats obtenus après une injection intraveineuse de protéine HRP (*Horseradish Peroxidase*) ayant montré une coloration de la zone ventro-médiane du noyau arqué uniquement (Broadwell et al., 1983). Les vaisseaux sanguins du noyau arqué ventro-médian expriment néanmoins les protéines constitutives des jonctions serrées, suggérant un transport des molécules par transcytose et non pas simple diffusion (Norsted et al., 2008). L'origine de ces vaisseaux reste

à définir, néanmoins, une hypothèse propose que les artères hypophysaires donnent naissance à ces vaisseaux.

Des injections intracérébroventriculaires de HRP ou du colorant bleu Evans ont par ailleurs démontré une perméabilité accrue de la partie ventriculaire du noyau arqué (Mullier et al., 2010; Rodriguez et al., 2005), suggérant de possibles passages des molécules du LCR vers le noyau arqué.

Si le noyau arqué présente une BHE « hybride » et des zones de perméabilité accrues, peut-il pour autant être considéré comme une extension de l'éminence médiane ? L'injection de traceurs directement dans le noyau arqué apporte des éléments de réponse à cette question. En effet, la peroxydase comme le bleu trypan injectés dans le noyau arqué restent confinés à cette structure et ne diffusent pas vers l'éminence médiane, suggérant l'existence d'une barrière entre l'éminence médiane et le noyau arqué (Rethelyi, 1984). Cette barrière n'a pas encore été totalement caractérisée, toutefois, les tanocytes de type $\beta 1$, liés par des jonctions adhérentes et occasionnellement par des jonctions serrées sembleraient être impliqués dans sa constitution (Rodriguez et al., 2010).

De ce paragraphe, nous retiendrons que le noyau arqué, accolé à l'éminence médiane et au 3^{ème} ventricule, occupe une position privilégiée dans l'hypothalamus et présente des caractéristiques uniques en terme d'organisation de ses interfaces dont les structures et fonctions ne sont que partiellement connues.

Accès des signaux de régulation de l'homéostasie énergétique

Les signaux périphériques impliqués dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique sont pour la plupart lipophobes et ne peuvent donc diffuser librement à travers les capillaires cérébraux. Plusieurs voies d'accès sont possibles pour que ces signaux gagnent leurs cibles respectives dans l'hypothalamus :

- un accès régulé par des transporteurs spécifiques situés au niveau des cellules endothéliales de la BHE
- un accès *via* des transporteurs spécifiques des plexus choroïdes par transcytose puis une diffusion à travers l'épithélium épendymaire vers le parenchyme nerveux (Skipor and Thiery, 2008)
- un accès *via* la zone plus « perméable » du noyau arqué ventro-médian précédemment décrite (Ciofi et al., 2009; Norsted et al., 2008). Les systèmes de transport des signaux ne sont pas encore totalement décodés, bien que plusieurs mécanismes aient été proposés. Le tableau

suivant synthétise les voies d'accès envisagées pour les principaux signaux périphériques. Nous focaliserons notre attention sur l'un d'entre eux, la leptine.

Tableau 2 : action de la leptine au niveau des organes périphériques
PC : Plexus Choroïde

Signal	Transporteur potentiel	Transport
Glucose	Glut-1	BHE
Ghréline	GH-SR	BHE (Banks et al., 2002)
Insuline	IR	BHE et/ou PC (Banks et al., 1997)
Leptine	ObRa, mégaline	BHE et/ou PC (Banks et al., 1996; Zlokovic et al., 2000)

Transport de la leptine au niveau central

Des injections intraveineuses de leptine radiomarquée ont permis de caractériser le transport de l'hormone du compartiment sanguin, dans lequel elle circule partiellement liée à la forme soluble de son récepteur ou aux protéines plasmatiques (Bouret, 2008; Lammert et al., 2001) vers le système nerveux central. Ces études ont montré qu'en conditions physiologiques, la leptine est transportée selon un mécanisme unidirectionnel et partiellement saturable (Banks et al., 1996; Burguera et al., 2000). L'analyse des radioautogrammes révèle un marquage du noyau arqué, de l'éminence médiane et des plexus choroïdes, structures désormais identifiées pour leur implication dans le transport de la leptine (Banks, 2004; Banks et al., 1996; Banks and Lebel, 2002; Maresh et al., 2001). Au niveau moléculaire, des études menées *in vitro* et *in vivo* ont suggéré que la leptine pénétrerait dans ces structures via un transporteur (Banks et al., 1996; Maresh et al., 2001). A ce jour, deux protéines candidates se profilent :

- la forme tronquée du récepteur de la leptine, ObRa, qui est exprimée dans les plexus choroïdes (Devos et al., 1996; Tartaglia et al., 1995) et les microvaisseaux de la BHE (Hileman et al., 2002; Kastin et al., 1999)
- la mégaline, protéine multi-ligands impliquée dans les processus d'endocytose et exprimée par les plexus choroïdes (Dietrich et al., 2008).

Dans l'état actuel des connaissances, les mécanismes de transport de la leptine depuis la périphérie jusqu'au système nerveux central ne sont que partiellement décrits mais représentent un sujet d'étude essentiel à la compréhension de désordres métaboliques tels que l'obésité ou la leptino-résistance présentés dans la seconde partie de cette introduction bibliographique.

Partie B. La programmation métabolique

1. Le concept de programmation

1.1. Définition

Le développement d'un individu est jalonné d'une succession de fenêtres temporelles critiques, souvent limitées et brèves, au cours desquelles l'organisme est capable de s'adapter à l'environnement dans lequel il évolue.

La période périnatale représente une phase du développement pendant laquelle la plasticité est maximale et la sensibilité de l'individu aux facteurs environnementaux d'autant plus accrue (Fig. 14). Chez l'homme, cette période se déroule du 154^{ème} jour gestationnel au 7^{ème} jour après la naissance. Chez le rat, la période périnatale est comprise entre les 19^{ème} jour prénatal et le 5^{ème} jour postnatal (Sodoyez-Goffaux et al., 1979).

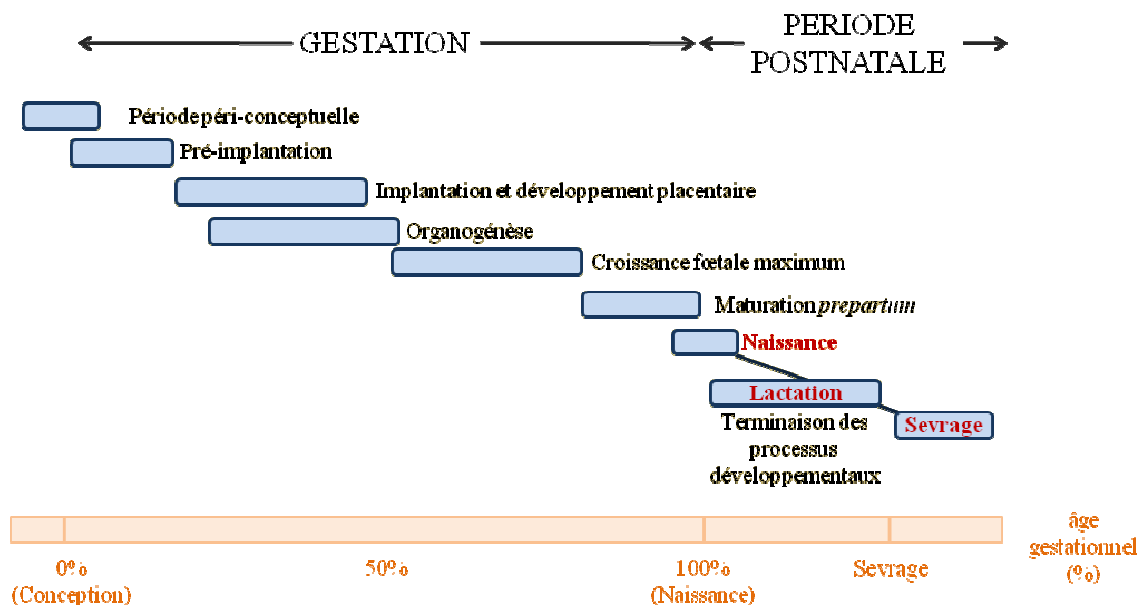


Figure 13 : périodes critiques du développement périodes critiques du développement
 [Source : d'après (Fowden et al., 2005)]

Le concept général de « programmation » supporte l'hypothèse qu'un stimulus ou un stress survenant lors de ces périodes critiques pourrait avoir des conséquences à long terme sur l'individu, et ce même après la disparition du stimulus déclencheur (Fowden et al., 2005; Patel and Srinivasan, 2002). Dörner a été le premier à proposer le concept d'une programmation périnatale du fonctionnement des systèmes de régulation, et donc du potentiel prophylactique offert par cette période (Plagemann, 2005).

Plus particulièrement, Lucas développe la notion de « programmation métabolique » qui considère la nutrition précoce comme un facteur capable de moduler prématurément le développement de l'individu en induisant des modifications physiologiques et métaboliques durables (Lucas, 1991).

1.2. Programmation métabolique et obésité

Le syndrome métabolique est défini comme un ensemble de troubles réunissant au moins 3 facteurs parmi les suivants : intolérance au glucose, hyperinsulinémie, baisse du HDL (*High-Density-Lipoprotein*)-cholestérol, hypertriglycéridémie, surpoids abdominal, hyperleptinémie ou encore hypertension artérielle. L'obésité, caractérisée par un indice de masse corporelle (IMC (Kg/m^2) = Poids corporel kg / Taille²) supérieur à 30, est une complication de ce syndrome et se trouve généralement associée à de nombreux désordres endocriniens, vasculaires, respiratoires, rhumatologiques ou oncologiques.

L'obésité représente un problème majeur de santé publique en constante expansion non seulement chez l'adulte mais aussi dans la population infantile (l'Organisation Mondiale de la Santé estime à 700 millions le nombre d'individus obèses pour 2015 contre 400 millions en 2005 au niveau mondial). Un ensemble de causes a été proposé pour expliquer le développement de la maladie : causes génétiques et épigénétiques, psychologiques, endocriniennes ou environnementales (Arner, 2003; Junien et al., 2005; Taylor and Poston, 2007).

Il est désormais reconnu que le statut nutritionnel et hormonal de la mère est un facteur déterminant dans la genèse de la maladie. Ainsi, le concept de programmation métabolique suppose l'existence d'une origine précoce au syndrome métabolique et à l'obésité (Eckel, 2005; McMillen and Robinson, 2005)

1.2.1. L'hypothèse du phénotype économe

Dans les années 60, Neel émet l'hypothèse d'un « génotype économe », sélectionné au cours de l'évolution pour permettre à l'organisme de préserver ses réserves énergétiques pour lutter contre les périodes de famine et de restriction alimentaire (Neel, 1962). Hales et Barker généralisent le concept trente ans plus tard et proposent qu'un « phénotype économe » s'est installé au cours des siècles ponctués de périodes de famines. Ces auteurs proposent qu'un environnement *in utero* limité en nutriments puisse induire une croissance fœtale réduite et orientée vers des adaptations des métabolismes de l'insuline et du glucose permettant à

l'organisme de survivre à de futures conditions nutritionnelles restreintes (Hales and Barker, 1992). Le « phénotype économe » a été observé sur une cohorte d'individus masculins conçus au cours de la famine hollandaise de l'hiver 1944-1945 dont les mères ont été sous-alimentées pendant leur grossesse (ration alimentaire de 400 à 800 kcal/jour). Les résultats des études menées sur cette cohorte mettent en évidence que ces individus présentent de plus fort taux d'obésité ou de maladies cardiovasculaires en comparaison avec les individus dont la mère a été normalement alimentée. Les troubles développés sont d'autant plus importants que la période de sous-alimentation maternelle est survenue lors de la première moitié de la grossesse (Painter et al., 2005; Ravelli et al., 1976). Dans leur hypothèse de « phénotype économe », Hales et Barker établissent une relation entre faible poids de naissance associé à un retard de croissance intra-utérin et risque de développer un diabète de type 2 (non insulino-dépendant).

1.2.2. Le poids de naissance : un indicateur du poids adulte ?

Il est aujourd'hui admis que le poids de naissance constitue un indicateur du devenir de l'individu en termes de prédisposition à développer des troubles métaboliques. Plusieurs études ont montré que les individus dont la mère était obèse et/ou diabétique présentaient de gros poids de naissance et étaient prédisposés à devenir obèses ou insulino-résistants à l'âge adulte (Eriksson et al., 2003; Gluckman and Hanson, 2004; Gluckman et al., 2005). (Eidelman and Samueloff, 2002) Ainsi, les individus nés avec un petit poids de naissance comme ceux nés avec un gros poids de naissance sont susceptibles de développer des troubles métaboliques similaires à l'âge adulte ; néanmoins aucun mécanisme commun aux deux situations n'a été mis en évidence. Eidelman propose que les individus nés avec un gros poids de naissance dont la mère présente des désordres métaboliques et endocriniens seraient surexposés à ces dérégulations (hyperleptinémie et/ hyperinsulinémie) (Eidelman and Samueloff, 2002).

La prédisposition à l'obésité des individus nés avec un gros poids de naissance échappe au concept du phénotype économe. En réponse, Gluckman développe le concept de réponse programmée (*predictive adaptive response*) stipulant une adaptation périnatale au futur environnement postnatal. A l'inverse du concept de « phénotype économe », la « réponse programmée » n'induit donc pas obligatoirement des modifications bénéfiques pour le fœtus *in utero*.

Les modifications du schéma développemental survenant *in utero* sont parfaitement adaptées lorsque l'environnement postnatal est en continuité avec l'environnement périnatal, et confèrent un avantage de survie à l'individu. L'étude épidémiologique des individus ayant subi la famine de Saint-Petersbourg entre 1941 et 1944 illustre bien ce concept. En effet, les données démographiques indiquent que la restriction calorique maternelle n'a pas eu d'effets délétères significatifs sur la descendance, cette dernière ayant évolué dans un environnement postnatal particulièrement appauvri (Stanner et al., 1997). En revanche, les adaptations *in utero* deviennent néfastes lorsque l'individu se trouve confronté à un environnement postnatal différent de l'environnement foetal ou si le recensement du milieu extérieur par le fœtus est faussé (Gluckman and Hanson, 2004; Hales and Barker, 1992).

Récemment, des études ont proposé l'existence d'une « phénotype gaspilleur », symétrie du « phénotype économe » chez le rat. Dans ce modèle, la descendance de rates nourries avec un régime riche en graisses présente un phénotype satiétogène ou dépensier et se trouve protégée contre le développement de l'obésité (Ferezou-Viala et al., 2007a; Gallou-Kabani et al., 2007). La caractérisation des mécanismes de protection mis en jeu reste encore à définir.

2. Périodes gestationnelles et postnatales

2.1. Période périnatale et développement de l'hypothalamus chez le rongeur

Le développement hypothalamique du rat présente la particularité de débiter au stade embryonnaire et de se poursuivre pendant la période postnatale (Bouret, 2010; Markakis, 2002). Au cours cette période, plusieurs mécanismes cellulaires se succèdent pour former les circuits hypothalamiques participant au contrôle central de l'homéostasie énergétique : neurogenèse - migration neuronale - mort cellulaire - croissance axonale - synaptogenèse.

La neurogenèse hypothalamique et la migration cellulaire ont lieu à la mi-gestation, tandis que la mise en place des connections entre les différents noyaux hypothalamiques se construit pendant la période postnatale (Bouret, 2010).

2.2.1. Cinétique de développement des circuits hypothalamiques

Le développement de l'hypothalamus est initié au niveau de la vésicule diencephalique. Chez le rat, il est possible de distinguer la structure cérébrale correspondant au futur hypothalamus à partir du 12^{ème} jour embryonnaire, noté E12 (Altman et al., 1986).

Le développement hypothalamique débute par la genèse de cellules neuronales progénitrices à partir du neuroépithélium du 3^{ème} ventricule. Ces progéniteurs neuronaux sont à l'origine des

neurones postmitotiques destinés à coloniser différentes régions de l'hypothalamus correspondant aux futurs noyaux hypothalamiques décrits précédemment

Neurogenèse

Chez le rat, l'utilisation de traceurs tels que le BrdU capables de s'incorporer à l'ADN au cours de la phase S du cycle cellulaire a permis de déterminer les périodes de neurogenèse dans les différentes zones de l'hypothalamus (Altman and Bayer, 1986; Ifft, 1972). Ainsi, le pic de neurogenèse dans l'hypothalamus latéral de rat a lieu au stade E12-E13, tandis que celui de l'hypothalamus médian a lieu au stade E14-E15. La neurogenèse est plus tardive dans la zone périventriculaire de l'hypothalamus, au stade E16-E17, à l'exception des neurones parvocellulaires du noyau paraventriculaire dont le pic de neurogenèse a lieu à E12-E13.

A l'échelle des noyaux hypothalamiques, la neurogenèse des noyaux dorso et ventromédian se déroule respectivement entre E12-E16 et E13-E16, celle du noyau paraventriculaire entre E13 et E15 et celle de l'aire hypothalamique latérale entre E12 et E13. Le noyau arqué présente une période de neurogenèse plus longue, s'étalent de E12 à E17 (Bouret, 2010; Markakis, 2002; Simerly, 2008).

Développement des projections neuronales

La mise en place des projections neuronales entre les différents noyaux hypothalamiques est essentielle au fonctionnement de l'hypothalamus. Ce processus a été étudié à l'aide de traceurs tels que le DiI (1,1'-Dioctadecyl 3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate) (Bouret et al., 2008). Cette étude montre que les projections neuritiques émanant du noyau arqué commencent à atteindre le noyau dorsomédian à partir du 6^e jour post-natal (P6), le noyau paraventriculaire entre P8 et P10 et l'aire hypothalamique latérale à la fin de la deuxième semaine post-natale (P12). La mise en place des projections n'est achevée qu'à l'issue de la 3^{ème} semaine de vie postnatale. En regard des autres noyaux hypothalamiques, le développement des projections du noyau arqué est plus tardif. En effet, un circuit indépendant s'établit entre le noyau dorsomédian et le noyau paraventriculaire et l'aire hypothalamique latérale à partir de P6 et des projections en provenance du noyau ventromédian contactent l'aire hypothalamique latérale à P10 (Bouret and Simerly, 2007)(Fig. p).

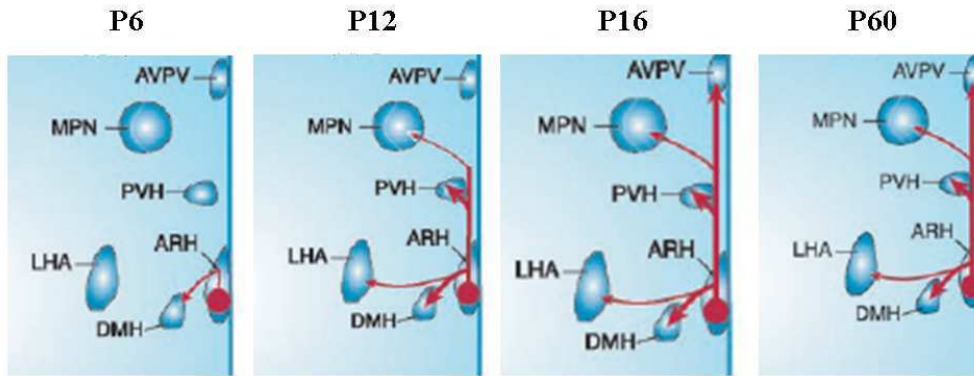


Figure 14 : développement des projections hypothalamiques
[Source Bouret et al., 2004]

Le phénotype peptidergique des projections du noyau arqué au cours du développement n'est pas encore complètement compris car si l'ontogénie des neuropeptides hypothalamiques a fait l'objet de plusieurs études par le passé (Morita et al., 1992 ; Wang et al., 1992), les résultats doivent cependant être interprétés avec prudence. En effet, les mesures d'immunoréactivité effectuées dans ces études ne permettent pas de discriminer les variations de densité des terminaisons axonales, qui reflètent l'organisation des circuits neuronaux, des modifications de la synthèse, du transport ou de la libération du neuropeptide. Nous retiendrons que le NPY présente la particularité d'être exprimé transitoirement et localement dans plusieurs noyaux hypothalamiques pendant le développement postnatal, avec un pic d'expression génique au stade P15-P16, à la différence d'AgRP dont l'expression est maximale à P11 et confinée au noyau arqué (Grove et al., 2003; Grove and Smith, 2003). Cette propriété, ainsi que la stricte colocalisation du NPY avec l'AgRP ont été utilisées pour caractériser l'ontogénèse des projections NPYergiques du noyau arqué au moyen de doubles marquages NPY-AgRP (Broberger et al., 1998; Grove et al., 2003). Ces expériences montrent que le développement des projections NPY du noyau arqué n'est achevé qu'à l'issue de la 3^{ème} semaine de vie postnatale, et soulève donc des questionnements sur les mécanismes de régulation de la prise alimentaire au début de la période postnatale (Luquet et al., 2005; Proulx et al., 2002).

2.2.2. Signaux développementaux

Le développement des circuits hypothalamiques est sous le contrôle de divers facteurs trophiques tels que l'insuline (Bouret et al., 2008), la ghréline (Steculorum and Bouret, 2011) et la leptine que nous détaillerons plus particulièrement.

L'utilisation de modèles murins déficients en leptine (souris ob/ob) ou en son récepteur (souris db/db) a permis de mettre en évidence l'implication de l'hormone dans le

développement de l'encéphale. Ces souris présentent toutes deux une masse cérébrale réduite et un profil d'expression des protéines gliales et neuronales immature (Udagawa et al., 2007). Les souris ob/ob ne présentant pas de caractéristiques phénotypiques marquées en terme de prise alimentaire ou de poids corporel avant la 2^{ème} semaine de vie postnatale, une première hypothèse a proposé que l'hypothalamus n'était pas sensible à l'action de l'hormone pendant la période néonatale afin d'optimiser croissance et survie en maximisant la prise alimentaire (Mistry et al., 1999; Proulx et al., 2002). Une seconde hypothèse a ensuite suggéré l'immaturité des structures hypothalamiques pendant cette période (Ahima et al., 1998; Bouret et al., 2004; Grove et al., 2003).

Les effets développementaux de la leptine

Ontogénie de la leptine pendant la période gestationnelle

La leptine comme sont récepteur sont exprimés par le rongeur pendant la gestation (Hoggard et al., 1997; Udagawa et al., 2006). Le rôle développemental de la leptine pendant la période fœtale a été mis en évidence chez les souris ob/ob, dont les fœtus présentent une diminution du nombre de cellules neuroépithéliales dans le cortex cérébral à E16 (Udagawa et al., 2006). Ce phénotype est susceptible d'être atténué par une administration de leptine exogène dans l'embryon de souris au stade E14.

Chez le rat, les niveaux circulants de leptine sont détectables à partir de E19 et augmentent pour atteindre les niveaux plasmatiques présents chez la mère en fin de gestation (Kawai et al., 1997). Des expériences d'injections de leptine radiomarquée chez la rate gestante ont montré que l'hormone était capable de traverser la barrière foeto-placentaire pour être transférée au fœtus (Smith and Waddell, 2003).

Ontogénie de la leptine pendant la période postnatale

A la naissance, les niveaux de leptine du raton chutent drastiquement pour augmenter de façon spectaculaire pendant les deux premières semaines de vie (Ahima et al., 1998; Smith and Waddell, 2003). On estime en effet que les niveaux de leptine circulante sont multipliés par 5 à 10 fois entre le 7^{ème} et le 12^{ème} jour de vie postnatale. L'augmentation spectaculaire des niveaux de leptine circulante n'étant corrélée à aucune variation de la masse adipeuse ou à des facteurs connus pour stimuler la sécrétion de leptine à l'âge adulte (ex : insuline et glucose), la signification physiologique du pic postnatal de leptine est longtemps restée sans réponse (Cottrell et al., 2009). L'une des hypothèses avancée propose une origine maternelle à

la leptine détectée chez la descendance. Cette dernière serait véhiculée par le lait maternel et absorbée par un système digestif encore immature chez la descendance (Casabiell et al., 1997). Si aujourd'hui le pic postnatal de leptine reste toujours partiellement incompris, l'implication du pic postnatal de leptine dans le développement des réseaux hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire est désormais acquise (Bouret et al., 2004; Bouret and Simerly, 2004). Ces études montrent que les défauts de neuritogenèse mis en évidence dans le noyau arqué des souris ob/ob peuvent être contrecarrés par des injections de leptine entre les stades P4 et P12. La leptine se comporterait alors comme un facteur neurotrophique stimulant la croissance axonale. Son action serait cependant restreinte à la période postnatale puisque le traitement de souris ob/ob adultes avec de la leptine ne permet pas de restaurer une densité de fibres neuronales comparable à celle des souris sauvages.

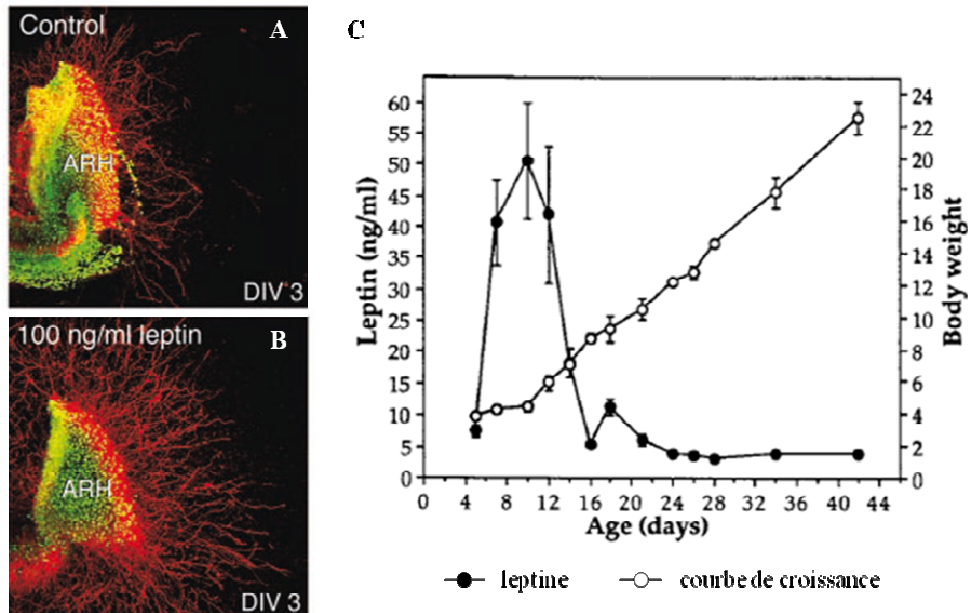
Le rôle neurotrophique de la leptine a aussi été mise en évidence dans des structures extra-hypothalamiques telles que le cortex cérébral (Valerio et al., 2006). A l'échelle de l'organisme entier, des études ont montré que la leptine exercerait aussi un rôle dans le développement des organes périphériques (Attig et al., 2011; Kirwin et al., 2006).

Synthèse : le développement de l'hypothalamus ventromédian

Chez le rongeur, les circuits hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire se mettent en place au cours de la vie fœtale et périnatale. L'hypothalamus se développe à partir de la vésicule diencéphalique. La neurogenèse hypothalamique présente un pic au niveau latéral aux 12^e et 13^e jours de la vie embryonnaire (E12-E13) et au niveau périventriculaire à E16-E17.

Les projections axonales émanant du noyau arqué commencent à atteindre le DMH au 6^e jour post-natal (P6), le PVN à P10 et l'AHN à la fin de la deuxième semaine post-natale. Le développement de ces voies hypothalamiques n'est achevé qu'à l'issue des trois premières semaines de vie postnatale. Ce développement est influencé par nombreux facteurs dont l'insuline ou la leptine (Simerly, 2008).

La période postnatale est caractérisée par une augmentation brutale et transitoire des taux circulants de leptine chez la descendance. Si ce résultat n'est pas encore totalement compris, son implication dans le développement des projections neuronales du noyau arqué vers les noyaux de 2nd ordre a été démontrée par des expériences de traçage axonal.



Synthèse 3 : implication de la leptine dans le développement hypothalamique

[Sources : (Ahima et al., 1998; Bouret et al., 2004)]

A – B : la leptine induit la neuritogenèse sur des explants de noyau arqué de souris ob/ob
 C : les taux de leptine circulant chez la souris présentent un pic lors de la 2^{ème} semaine de vie postnatale.

2.2. Période périnatale et leptino-résistance maternelle

2.1.1. La leptino-résistance : présentation

Définition, mécanismes et modèles animaux

La découverte de la leptine a d'abord laissé entrevoir de nombreuses perspectives thérapeutiques pour traiter l'obésité, avant que l'on constate que la plupart des individus obèses présentaient des taux de leptine plasmatique anormalement élevés, conséquence de leur adiposité, mais s'avéraient incapables de répondre à l'action de l'hormone. Ainsi l'obésité est classiquement associée à l'hyperleptinémie et la leptino-résistance.

Les mécanismes sous-tendant l'installation de la leptino-résistance ne sont pas encore totalement compris, cependant des hypothèses se dégagent (Myers et al., 2008). Plusieurs études ont en effet montré que le transport de la leptine de la périphérie vers ses cibles dans le système nerveux central était altéré dans des modèles d'obésité (Banks et al., 1996; Burguera et al., 2000; Caro et al., 1996; Kastin et al., 1999); d'autres ont proposé des défauts de signalisation de l'hormone, liés à une diminution d'expression du récepteur (Martin et al., 2000) ou à une augmentation de l'expression de répresseurs de la voie leptine comme SOCS-3 et PTP-1B (Munzberg et al., 2004; Picardi et al., 2008; Shimizu et al., 2007).

Plusieurs modèles animaux d'obésité associée à une perte de sensibilité à la leptine ont été développés pour tenter de comprendre les mécanismes d'installation de la leptino-résistance (Beck, 2000) :

- le modèle « DIO » (*Diet Induced Obesity*) pour lequel l'obésité est induite par l'administration d'un régime hypercalorique (type hyperlipidique ou hypersucré). En effet, il est désormais connu que les régimes déséquilibrés hypercaloriques sont responsables de l'installation de l'obésité associée à un état de leptino-résistance.
- des modèles génétiques présentant des défauts d'expression ou de sécrétion de l'hormone (souris ob/ob), ou de son récepteur (souris db/db, rats Zucker fa/fa, rats Koletsky)
- la résistance à la leptine peut par ailleurs être transmise au cours de la vie fœtale et/ou post-natale par la mère. L'alimentation maternelle influencerait l'environnement métabolique et endocrinien de sa descendance, la protégeant ou la prédisposant à développer des troubles métaboliques. Cette « empreinte métabolique maternelle » peut affecter à long terme la sensibilité à la leptine de la descendance et conduire à l'installation d'une leptino-résistance au niveau hypothalamique persistant jusqu'à l'âge adulte (Ferezou-Viala et al., 2007a)

Contrecarrer la leptino-résistance avec le CNTF

Parce qu'il partage des voies de signalisation communes avec la leptine et qu'il exerce une action anorexigène, même dans des situations de leptino-résistance (Lambert et al., 2001), le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) représente non seulement un outil moléculaire pour l'étude de ce phénomène (Benomar et al., 2009), mais aussi un outil pharmacologique potentiel dans le traitement de l'obésité dont il nous a paru nécessaire d'élucider les mécanismes d'action.

Découverte

Le développement des cellules nerveuses est placé sous le contrôle de facteurs trophiques responsables de la survie, de la différenciation des cellules et de l'émission de leurs prolongements. Plusieurs molécules, baptisées neurotrophines, telles que le NGF (*Nerve Growth Factor*), le GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*), le BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*) ou encore le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) ont été mis en évidence (Adler et al., 1979). D'abord étudié pour son implication dans la survie des neurones parasympathiques du ganglion ciliaire de poulet (Barbin et al., 1984; Helfand et al., 1976), le rôle du CNTF dans divers processus biologiques, et notamment dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, n'a cessé de s'étoffer depuis.

Séquence et structure

Le CNTF est le produit d'un gène composé de deux exons séparés par un intron localisé sur le chromosome 11 chez l'homme (Negro et al., 1991). La comparaison des séquences nucléotidiques et protéiques entre les formes humaine, rate (Stockli et al., 1989) et lapines (Lin et al., 1990; Lin et al., 1989) du CNTF ont révélé un fort degré de conservation (pourcentage d'homologie de séquence de 86% entre les formes rate et humaine) suggérant le rôle essentiel joué par cette neurotrophine au cours de l'évolution.

Le CNTF est une protéine de 200 acides aminés (~ 23 kDa) dont la structure primaire indique l'absence de peptide signal ainsi que de potentiels sites de glycosylation ou de régions hydrophobes ; c'est pourquoi le CNTF a été classé parmi les protéines cytosoliques plutôt que parmi les protéines sécrétées (Stockli et al., 1989). Cette particularité soulève des questionnements quant au mode d'action de la cytokine qui seront présentés et étudiés par la suite.

Tout comme la leptine, la structure tertiaire du CNTF présente quatre hélices α antiparallèles (Fig. c), caractéristiques de la famille des cytokine de classe I (Bazan, 1991; Kruttgen et al., 1995). Ces hélices recèlent les motifs aminés conservés constituant les trois sites de fixation du ligand sur son récepteur. Des mutations sur ces sites (Kallen et al., 1999) ont permis de créer des protéines mutées utilisées comme outil pharmacologique à des visées de recherche fondamentale ou clinique (Pretti et al., 2003) qui seront détaillées dans le paragraphe traitant des effets du CNTF.

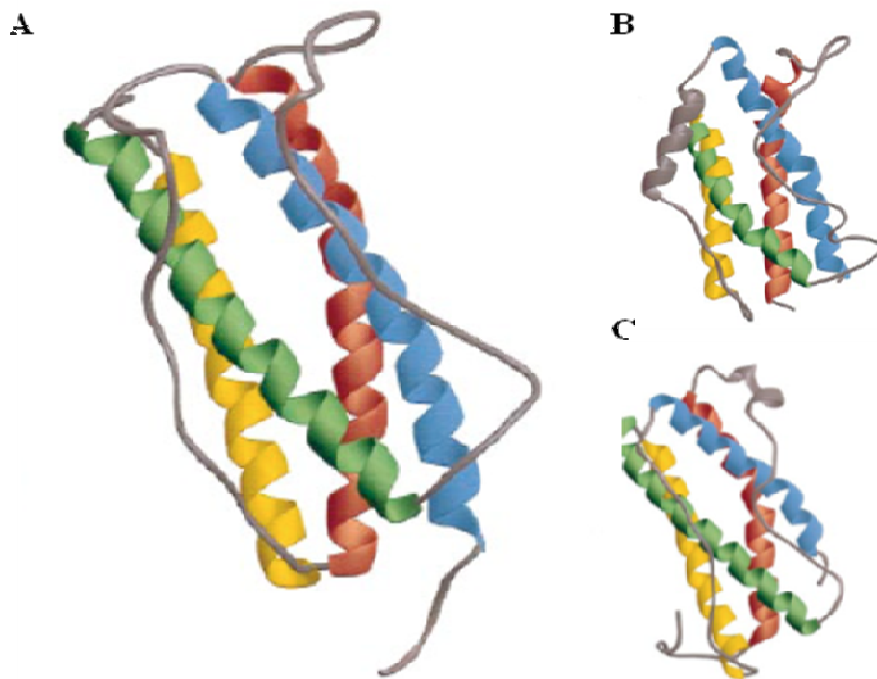


Figure 15 : structures tridimensionnelles du CNTF (A), de l'IL-6 (B) et du LIF (C) [Source : (Heinrich et al., 1998)]

Le CNTF est composé de quatre hélices α antiparallèles, structure commune à la famille de l'interleukine 6.

Synthèse et sécrétion

Le CNTF est exprimé par les différents types de cellules des systèmes nerveux périphériques et centraux (Friedman et al., 1992; Stockli et al., 1989); en revanche, dans des organes périphériques tels que la peau ou surtout le muscle, les niveaux d'expression du CNTF sont par comparaison quasi-nuls (Stockli et al., 1989).

Dans le système nerveux périphérique, le CNTF est exprimé par les cellules de Schwann (Gupta et al., 1992; Rende et al., 1992; Sendtner et al., 1994). Hormis dans certaines zones du système nerveux central que sont le bulbe olfactif, les nerfs optiques et la moelle épinière, en conditions basales (i.e non lésionnelles), les concentrations de CNTF dans le système nerveux central sont faibles (Dallner et al., 2002; Stockli et al., 1991). Dans l'hypothalamus, le CNTF

est exprimé par 90% des astrocytes et 75% des neurones du noyau arqué (Vacher et al., 2008). Si d'autres noyaux hypothalamiques tels que le noyau paraventriculaire ou l'aire hypothalamique latérale expriment aussi la cytokine, la production hypothalamique de CNTF serait néanmoins plus importante dans le noyau arqué (observation du laboratoire).

Le CNTF n'est pratiquement pas exprimé au cours du développement embryonnaire (Ip et al., 1996), ce n'est qu'en période postnatale que les niveaux d'ARNm-CNTF deviennent détectables pour atteindre leur niveau d'expression définitif quatre semaines après la naissance (Sendtner et al., 1994; Stockli et al., 1989). Les souris invalidées pour le gène codant le CNTF sont viables et ne présentent pas de phénotype majeur, hormis une diminution du nombre de motoneurones ainsi qu'une légère atrophie musculaire à l'âge adulte (Masu et al., 1993). D'autre part, une étude épidémiologique réalisée sur la population japonaise a montré que 2,5% de la population présentait une mutation nulle homozygote pour le gène codant la cytokine sans phénotype neurologique associé (Takahashi et al., 1994).

L'expression du CNTF est positivement régulée en réponse à des atteintes cérébrales. En effet, les niveaux d'expression génique et protéique du CNTF augmentent en réponse à des épisodes de lésions cérébrales mécaniques (Ip et al., 1993b; Lee et al., 1997) ou excitotoxiques (Haas et al., 2004). Le rôle de facteur lésionnel a d'ailleurs été proposé pour la cytokine (Adler, 1993; Sendtner et al., 1994). Parce qu'il ne possède pas de séquence d'adressage à la membrane plasmique, le CNTF ne serait pas sécrété par les voies d'exocytose classiques. Néanmoins, la cytokine a été détectée dans le compartiment plasmatique, y compris chez le sujet sain (Vergara and Ramirez, 2004). Plusieurs hypothèses ont été développées pour expliquer la libération de la cytokine. La première hypothèse mentionnée proposait que le CNTF soit libéré après lyse de la cellule pour jouer le rôle de facteur lésionnel mentionné précédemment (Sendtner et al., 1997; Thoenen, 1991). Les détracteurs de cette hypothèse présentent cependant qu'il serait peu rentable pour les cellules d'un point de énergétique de synthétiser un peptide dont le rôle physiologique serait uniquement lié à leur lyse, phénomène en outre relativement rare. Une seconde hypothèse propose que le CNTF serait sécrété selon un mode non conventionnel, comme le sont d'autres protéines dénuées de peptides signal telles que l'IL-1 β (Rubartelli et al., 1990) ou le FGF (*Fibroblast Growth factor*) par exemple (Florkiewicz et al., 1995). La P-gp (*glycoprotein P*), localisée à la membrane astrocytaire (Pardridge et al., 1997) et dont l'expression est augmentée en cas de lésion neuronale, c'est-à-dire lorsque les niveaux intracellulaires de CNTF augmentent, a été proposée comme transporteur potentiel.

Par ailleurs, la CLF, capable de se lier aux sous-unités réceptrices du CNTF, crée un complexe avec les formes solubles du récepteur pour être sécrétée dans le milieu extracellulaire (Elson et al., 2000). Un mécanisme similaire a été décrit pour les interleukines 12 et 20 et pourrait donc être envisagé pour le CNTF.

Enfin, une dernière hypothèse propose un mécanisme d'action intracellulaire pour le CNTF. Cette dernière hypothèse a été validée *in vitro* sur des cultures d'astrocytes (Monville et al., 2002) mais restait jusqu'à ce jour inexplorée *in vivo*.

Signalisation

La signalisation du CNTF

Présentation succincte

Le récepteur du CNTF appartient à la superfamille des cytokine de classe I qui englobe la sous-famille de l'interleukine-6 ou famille des ligands de gp130 (*glycoprotein 130*) comprenant IL-6, IL-11, LIF (*Leukaemia Inhibitory Factor*), OSM (oncostatine M), CT-1 (cardiotrophine 1), CNTF, CLC (*Cardiotrophin-Like-Cytokine*) et NP (neuropoïétine) (Allen et al., 2011). La gp130 est un élément commun de la transduction du signal associée aux complexes récepteurs de ces cytokines.

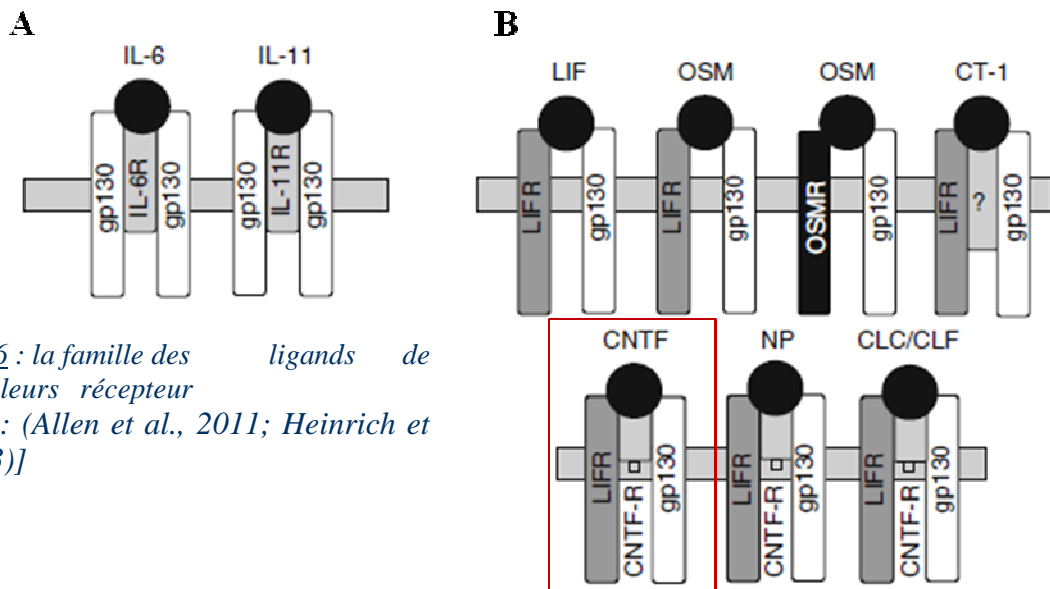


Figure 16 : la famille des ligands de gp130 et leurs récepteur
[Source : (Allen et al., 2011; Heinrich et al., 2003)]

Les récepteurs de la famille de l'IL-6 sont des protéines de type I (extrémité N-terminale extracellulaire et présence d'un domaine transmembranaire). La région extracellulaire comporte les domaines CBD (*Cytokine Binding Domain*), fibronectine III et Ig-like. Le domaine CBD est composé d'environ 200 acides aminés et constitué de deux sous-domaines :

une région N-terminale comportant de 4 résidus cystéines conservés et une région C-Terminale contenant le motif WSXWS.

A l'exception du CNTFR α , les récepteurs aux cytokines de classe I présentent un domaine transmembranaire composé de 22 à 28 acides aminés. Les récepteurs aux cytokine de la sous-famille de l'IL-6 ne possèdent pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque, leur segment cytoplasmique est donc constitutivement associée à des protéines *Janus Kinase* permettant d'induire l'activation du récepteur et la transduction du signal (Stahl and Yancopoulos, 1994).

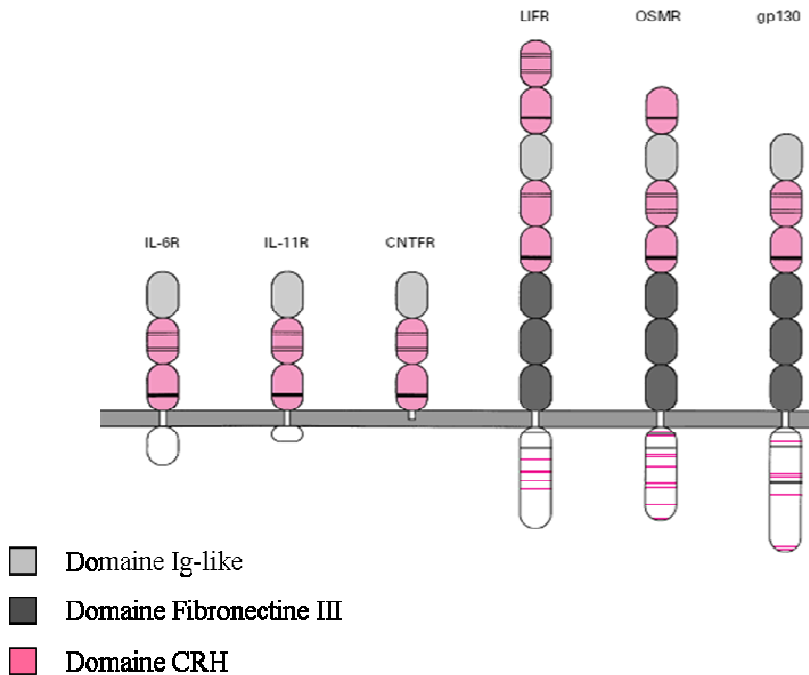


Figure 17 : les récepteurs aux cytokines de classe I
[Source : (Heinrich et al., 1998)]

La dimérisation des sous-unités réceptrices permet la transduction du signal.

Les récepteurs aux cytokines de la famille de l'IL-6 forment des complexes composés d'homodimères de sous-unités gp130 (Fig. 16A) ou d'hétérodimères gp130/LIF-R (*Leukaemia Inhibitory Factor Receptor*) (Fig. 16B). La dimérisation des sous-unités permet la transduction du signal.

Le récepteur du CNTF

La transduction du signal du CNTF est assurée par un récepteur tripartite composé des sous-unités suivantes :

- une sous-unité réceptrice α : le CNTFR α (*Ciliary Neurotrophic Factor Receptor α*)
- deux sous-unités réceptrices β : la gp130 (*glycoprotein 130*) et le LIF-R (*Leukaemia Inhibitory Factor Receptor*)

La sous-unité réceptrice α : le CNTFR α

La sous-unité réceptrice α est codée par un gène localisé sur le chromosome 9 chez l'homme, comportant aussi le gène codant pour le récepteur de l'IL-11 avec lequel le CNTFR α présente des homologies structurales. La protéine mature de CNTFR α comporte 352 acides aminés (~72kDa). Cette protéine possède 4 sites potentiels de N-glycosylation ainsi qu'un pont disulfure (Heinrich et al., 1998). Le CNTFR α contient des domaines CBD et un domaine Ig-like en partie amino-terminale, caractéristiques des récepteurs aux cytokines de classe I (Fig. 17). D'autre part, le CNTFR α ne présente pas de segment transmembranaire ni de domaine intracellulaire ; il est ancré à la membrane plasmique par un groupement GPI (*Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol*) susceptible d'être clivé par la phospholipase C, donnant ainsi naissance à une forme soluble de la sous-unité réceptrice α : le sCNTFR α . Cette forme tronquée a été détectée dans le liquide céphalo-rachidien ainsi que dans le milieu de culture d'explants musculaires, suggérant un rôle physiologique pour cette molécule (Davis et al., 1993a). D'autre part, l'incubation de sCNTFR α dans le milieu de culture de cellules TF-1 n'exprimant que les sous-unités réceptrices β LIF-R et gp130 et provenant d'une lignée cellulaire de patient atteint d'érythroleucémie, induirait une réponse biologique (Gearing et al., 1994). Comme suggéré pour la forme soluble de l'Il-6R, la forme soluble de la sous-unité α du récepteur au CNTF serait capable de potentialiser la réponse au CNTF.

L'expression du CNTFR α est majoritairement attribuée au système nerveux (MacLennan et al., 1996) ainsi qu'au muscle squelettique (Helgren et al., 1994), cependant le CNTFR α a aussi été détecté dans plusieurs organes périphériques, notamment dans les reins (Ip et al., 1993b; Yang et al., 2001), le foie (Hu et al., 2008), le tissu adipeux (Zvonic et al., 2003), les poumons, la moelle osseuse (Bellido et al., 1996; McGregor et al., 2010), ou encore le cœur, les testicules, l'estomac, la rate et les glandes surrénales (Ip and Yancopoulos, 1992).

Le CNTFR α a été mis en évidence dans les neurones des systèmes nerveux central et périphérique (Ip and Yancopoulos, 1992; Lee et al., 1997; MacLennan et al., 1996) et, dans une moindre mesure, dans les cellules gliales, notamment dans les astrocytes (Carroll et al., 1993; Dallner et al., 2002; Yokota et al., 2005). L'expression de cette sous-unité réceptrice est stimulée dans des structures spécifiques du système nerveux central telles que le cortex cérébral, l'hippocampe, le striatum ou la moelle épinière en réponse à des épisodes de lésions (Choi et al., 2004; Lee et al., 1997), d'ischémie (Park et al., 2000) ou d'hémorragie (Yokota et al., 2005) et inhibée au niveau des nerfs optiques et de la rétine lorsque ces structures sont

lésées (Miotke et al., 2007). Plus spécifiquement, dans l'hypothalamus, le CNTFR α est exprimé par les neurones et les astrocytes du système sécréteur magnocellulaire regroupant les noyaux supraoptiques et paraventriculaires (Watt et al., 2009). Dans le noyau arqué, le CNTFR α a été mis en évidence aussi bien dans les neurones que dans les astrocytes (Vacher et al., 2008).

La séquence du CNTFR α est extrêmement conservée entre différentes espèces : homme, souris, rat, chien, suggérant le rôle essentiel de la sous-unité réceptrice (Beltran et al., 2003). Contrairement à son ligand, le CNTFR α est exprimé dès l'âge embryonnaire. Les modèles de souris dont le gène codant le CNTFR α a été invalidé présentent de profondes altérations des motoneurones de la moelle épinière et du tronc cérébral ainsi qu'une incapacité à téter conduisant à une mort néonatale (DeChiara et al., 1995). Le décalage d'expression entre le CNTF, protéine ligand, et le CNTFR α , protéine réceptrice, au cours du développement embryonnaire, pourrait être expliqué par la capacité du CNTFR α à se lier à d'autres ligands. En effet, si le CNTFR α a initialement été présenté comme la sous-unité réceptrice spécifique du CNTF, cette dénomination est désormais remise en cause. Il a notamment été démontré que le CLC (*Cardiotrophin-Like-Cytokine*) (Elson et al., 2000) ou la neuropoïétine (Derouet et al., 2004) étaient aussi capables de se lier au CNTFR α , car présentant un site de liaison similaire à celui du CNTF (Rousseau et al., 2008).

La liaison du CNTF à la sous-unité réceptrice α est suivie par le recrutement des sous-unités réceptrices β .

Les sous-unités réceptrices β : le LIF-R et la gp130

Chez l'homme, les gènes codant le LIF-R et la gp130 sont localisés sur le chromosome 5. Les caractéristiques de ces deux sous-unités réceptrices β sont présentées dans le tableau ci-dessous (d'après (Heinrich et al., 1998)).

Tableau 3 : caractéristiques des sous-unités réceptrices gp130 et LIF-R

	gp130	LIF-R
Nombre d'acides aminés de la protéine mature :		
domaine extracellulaire	896	1053
segment transmembranaire	22	26
domaine intracellulaire	277	238
Poids moléculaire (kDa)	130	190
Nombres de ponts disulfures	5	5
Sites de N-glycosylation	10	19

De façon similaire à l'IL-6R, des formes solubles de gp130 (Garbers et al., 2011; Jostock et al., 2001) et de LIF-R, générées par épissage alternatif, ont été mises en évidence dans la circulation sanguine et le compartiment extracellulaire (Chambers et al., 1997; Owczarek et al., 1996; Pitard et al., 1998). Les sous-unités réceptrices β présentent un patron de distribution très large. Ainsi, le LIF-R a été identifié dans des organes périphériques : ostéoblastes (Allan et al., 1990), cellules hématopoïétiques (Hilton et al., 1991) ainsi que dans le système nerveux périphérique (Hendry et al., 1992). Au niveau central, cette sous-unité réceptrice est particulièrement exprimée par les neurones des régions sensorielles et motrices (Ip and Yancopoulos, 1992) de l'encéphale ainsi que dans les astrocytes de l'hippocampe et du cortex cérébral (Murphy et al., 1995; Yamakuni et al., 1996). Dans l'hypothalamus, le LIF-R est exprimé dans les noyaux dorsomédians, paraventriculaires et arqués (Wang and Brattain, 2006; Yamakuni et al., 1996). Dans ce dernier noyau, la distribution du LIF-R est astrocytaire comme neuronale (Vacher et al., 2008). Contrairement au CNTF, le LIF-R est exprimé au cours du développement embryonnaire (Qiu et al., 1994) et participerait notamment au développement de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Ware et al., 2005). Les

souris déficientes en LIF-R présentent une diminution significative du nombre de motoneurons (Li et al., 1995), phénotype similaire à celui des souris déficientes en CNTFR α , ainsi qu'une perte en astrocytes (Koblar et al., 1998; Ware et al., 2005).

La sous-unité gp130 est elle aussi largement exprimée au niveau central et périphérique. Plus précisément, dans le noyau arqué, gp130 est exprimée par des neurones et par des astrocytes (Vacher et al., 2008). Un modèle de souris déficientes en gp130 a montré le rôle essentiel joué par la protéine pendant la période embryonnaire (Nakashima et al., 1999). En effet, tout comme pour le LIF-R ou le CNTFR α , les souris déficientes en gp130 ne sont pas viables et présentent des altérations développementales sévères (Shin et al., 2004; Sims, 2009; Yoshida et al., 1996).

Activation du récepteur du CNTF

En absence de CNTF, les trois sous-unités précédemment décrites ne sont pas présentes sous forme de complexe récepteur à la membrane plasmique. La première étape de la signalisation nécessite la fixation du CNTF à la sous-unité CNTFR α . Les dimères ainsi formés s'associent avec la sous-unité gp130 ou avec la sous-unité LIF-R pour former un complexe récepteur actif hexamérique composé de 2 CNTF, 2 CNTFR α , 1 gp130 et 1 LIF-R.

L'affinité du CNTF pour les sous-unités composant son récepteur varie. Ainsi si l'affinité du CNTF pour le CNTFR α est faible au départ ($K_d = 1,8 \cdot 10^{-8} M$), elle devient plus élevée lors du recrutement des sous-unités réceptrices β induisant la formation d'un complexe hexamérique de haute affinité ($K_d = 6,8 \cdot 10^{-10} M$) (Gearing et al., 1994).

L'hétérodimérisation des sous-unités réceptrices β initie la transduction du signal via l'activation des protéines JAK. Ces kinases sont constitutivement associées aux domaines cytoplasmiques des sous-unités LIF-R et gp130 et activent les sous-unités gp130 et LIF-R par transphosphorylation.

Notons cependant qu'en présence de concentrations élevées de CNTF dans le milieu extracellulaire, ce dernier peut activer les voies de signalisation en l'absence de CNTFR α , en se liant au récepteur du LIF ou de l'IL-6 (Gearing et al., 1994; Monville et al., 2002; Schuster et al., 2003), soulignant la variabilité des cibles potentielles du CNTF.

Les voies de signalisation du CNTF

Les voies de signalisation empruntées par le CNTF sont en grande partie communes à celles de la leptine, c'est-à-dire : JAK/STAT (Lambert et al., 2001; Stahl and Yancopoulos, 1994) ; IRS/PI3K/Akt (Alonzi et al., 2001), MAPK (Dolcet et al., 2001; Park et al., 2004) et AMPK dont le CNTF inhibe l'activité dans l'hypothalamus (Steinberg et al., 2006). Les régulateurs négatifs de ces voies de signalisation sont les mêmes que ceux classiquement associés aux cytokines de la famille de l'IL-6, nous ne les détaillerons donc pas.

La famille des protéines SOCS joue un rôle prépondérant dans la régulation négative de la signalisation du CNTF. Des études ont montré que le CNTF était capable d'induire l'activation de SOCS-3 dans l'hypothalamus (Kelly et al., 2004; Ziotopoulou et al., 2000)

En revanche, contrairement à la leptine, le CNTF n'induit pas la surexpression de PTP-1B, autre répresseur connu des voies de signalisation associées à la leptine. Cette divergence de régulation des voies de signalisation de la leptine et du CNTF est l'un des mécanisme proposé pour expliquer l'efficacité du CNTF dans des cas de leptino-résistance (Benomar et al., 2009).

Les effets biologiques du CNTF

Le CNTF intervient dans des processus variés au niveau du système nerveux central comme en périphérie, principalement sur les tissus insulino-sensibles. Nous ne présenterons pas une liste exhaustive des effets biologiques du CNTF et focaliserons notre discours sur son implication dans le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique.

Dans le système nerveux central, le CNTF est susceptible d'exercer un rôle d'activateur endogène des astrocytes en favorisant l'astrogliose (Davis et al., 1993a; Ip et al., 1993b; Monville et al., 2001), ainsi qu'un rôle neuroprotecteur de plusieurs populations cellulaires telles que les neurones de la rétine (Chaum, 2003), du thalamus (Clatterbuck et al., 1993), de la substance noire (Hagg and Varon, 1993), du striatum (Beurrier et al., 2010), ou encore les motoneurones (Sendtner et al., 1990; Sleeman et al., 2000). C'est l'utilisation de cette dernière propriété qui a permis de mettre en évidence les effets du CNTF sur la régulation de la balance énergétique. En effet, un analogue du peptide, nommé Axokine, a été produit à des fins thérapeutiques dans la lutte contre la dégénérescence des motoneurones de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Aebischer et al., 1996; Penn et al., 1997). Plusieurs essais cliniques se sont succédés pour traiter cette dernière pathologie, cependant, face aux nombreux effets indésirables constatés (fièvre, réponse inflammatoire hépatique, toux, amaigrissement) ceux-ci ont été interrompus en phase III après 9 mois de traitement avec

l'axokine. A l'issue de ces essais cliniques, aucune amélioration de la survie des motoneurons n'avait été observée, en revanche, les patients traités avec l'axokine présentaient une perte de poids significative associée à une réduction de leur prise alimentaire, suggérant, pour la première fois, un rôle anorexigène pour le CNTF (Miller et al., 1996a; Miller et al., 1996b).

Suite à cette première découverte, plusieurs modèles animaux ont été utilisés afin de caractériser l'action anorexigène du CNTF. Ainsi, l'utilisation de modèles murins ob/ob et DIO a montré que le CNTF mimait l'action de la leptine en induisant une diminution de la prise alimentaire et du poids corporel, même après l'arrêt du traitement. L'action anorexigène du CNTF est par ailleurs conservée chez des animaux leptino-résistants, n'induit pas l'apparition de cachexie ou de signaux de faim et de stress, ou d'effet rebond, classiquement liés à la privation de nourriture, et persiste plusieurs semaines après l'arrêt du traitement (Bluher et al., 2004; Gloaguen et al., 1997; Lambert et al., 2001; Sleeman et al., 2003). Une étude menée par la suite chez des patients obèses a confirmé l'effet anorexigène du CNTF dans des cas de leptino-résistance (Ettinger et al., 2003). Ces premières données ont permis d'entrevoir un rôle prometteur du CNTF dans le traitement de l'obésité, et plusieurs études se sont par la suite attachées à essayer d'identifier les mécanismes d'action du CNTF qui sous-tendent son effet satiétogène.

L'action du CNTF est assurée via sa fixation sur ses sous-unités réceptrices, co-exprimées avec le récepteur de la leptine dans les noyaux arqué et paraventriculaire de l'hypothalamus. Au sein de ces noyaux, le CNTF induit la phosphorylation de STAT3 (Gloaguen et al., 1997; Lambert et al., 2001). Par ailleurs, un traitement au CNTF inhibe la synthèse de NPY en réponse au jeûne (Pu et al., 2000; Xu et al., 1998) et stimule l'expression de POMC (Ambati et al., 2007; Janoschek et al., 2006). L'effet prolongé du CNTF sur le poids corporel et la prise alimentaire, plusieurs semaines après l'arrêt du traitement a été attribué à une resensibilisation de noyau arqué à la leptine. En effet, Kokoeva et ses collaborateurs ont démontré qu'une injection intracérébroventriculaire de CNTF était capable de promouvoir la neurogenèse dans le noyau arqué des souris (Kokoeva et al., 2005). Ces cellules néoformées, qui présentent un phénotype NPY et POMC sont sensibles à la leptine car capables de phosphoryler STAT3, même lorsque les souris sont soumises à un régime hyperlipidique.

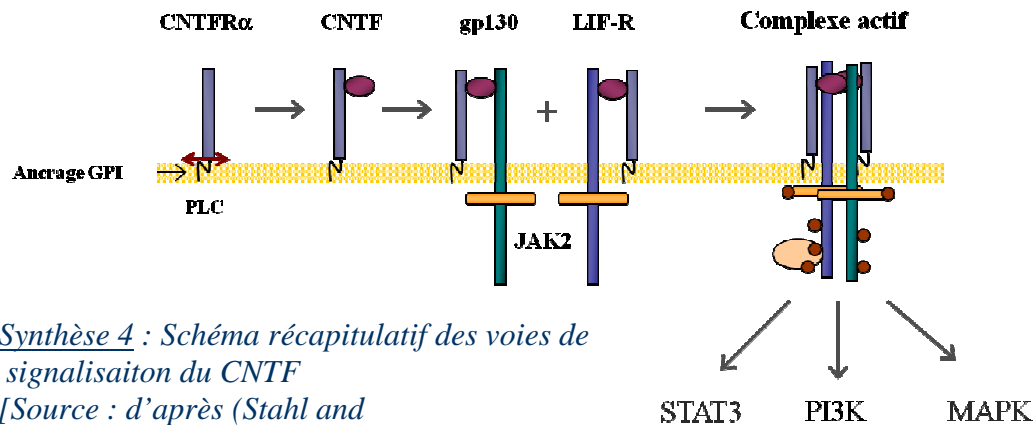
Si les effets du CNTF exogène ont été décrits dans la littérature, son rôle endogène dans le contrôle de la balance énergétique n'avaient que peu été étudiés jusqu'à récemment.

L'implication du CNTF endogène dans le maintien de l'homéostasie énergétique a fait l'objet de quelques études fondées sur l'analyse des corrélations entre l'expression ou le polymorphisme du gène codant le CNTF et le poids corporel. Ainsi, les souris et les hommes CNTF^{-/-} ne présentent pas de surpoids, mais des mécanismes compensatoires pourraient atténuer ou éteindre l'expression du phénotype, un mécanisme similaire ayant déjà été observé chez des souris présentant une déficience constitutive des neurones NPY dans le noyau arqué (Luquet et al., 2005).

Apportant de premiers éléments de réponse, notre équipe a récemment montré que le CNTF et ses sous-unités réceptrices étaient exprimés dans le noyau arqué. Nous avons montré par ailleurs, que les niveaux d'expression du CNTF variaient en fonction du statut énergétique. En effet, 30% des animaux résistants à la prise de poids induite par un régime hypercalorique présentaient des niveaux d'expression accrus du CNTF dans le noyau arqué, suggérant donc un rôle protecteur du CNTF endogène contre la prise de poids induite par le régime chez cette fraction d'individus (Vacher et al., 2008).

Synthèse : le CNTF

Le CNTF est une cytokine de 22 kDa appartenant à la même famille que la leptine, exprimée par les cellules gliales et les neurones, et qui intervient dans des processus variés (neuroprotection, neurogenèse, différenciation astrocytaire...), mais aussi dans le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique. En effet, le CNTF est capable de diminuer la prise alimentaire et le poids corporel, même en cas de leptino-résistance, et sans effet rebond (Lambert et al., 2001). L'action du CNTF nécessite sa fixation sur son récepteur tripartite composé des sous-unités LIF-R (*Leukaemia Inhibitory Factor Receptor*), gp 130 (*glycoprotein 130*) et CNTFR α (*CNTF Receptor α*) pour induire l'activation des voies de signalisations JAK/STAT, IRS/PI3K/Akt et MAPK.



Synthèse 4 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation du CNTF

[Source : d'après (Stahl and Yancopoulos, 1994)]

JAK2 : Janus Kinase 2, MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase, PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase ; STAT-3 : Signal Transduction and Activator of Transcription.

Notre équipe a récemment montré que le CNTF et ses sous-unités réceptrices étaient exprimés dans les neurones et les astrocytes du noyau arqué de rat, et pouvait exercer une action protectrice contre la prise de poids, suggérant un rôle de régulateur de l'homéostasie énergétique pour le CNTF endogène (Vacher et al., 2008). Jusqu'à ce jour les mécanismes d'action du CNTF endogène n'avaient pas été décryptés car le CNTF ne présente pas de peptide signal et ne peut donc être sécrété par les voies classiques d'exocytose. Si plusieurs hypothèses ont été formulées par le passé (libération par lyse de la cellule, sécrétion avec les formes solubles du récepteur), des expériences *in vitro* ont suggéré que le CNTF pouvait exercer une action intracellulaire (Monville et al., 2002). Cette hypothèse a été testée *in vivo* dans notre étude.

2.1.2. Gestation, lactation et leptino-résistance maternelle

Pour anticiper la forte demande d'énergie requise pour le développement du fœtus et l'allaitement, le statut hormonal et nutritionnel de la mère est profondément modifié, en induisant précocement une leptino-résistance centrale physiologique (Grattan et al., 2007; Ladyman, 2008) dont les mécanismes constituent toujours un sujet d'étude (Trujillo et al., 2011).

Ainsi les femmes enceintes présentent souvent des niveaux circulants de leptine élevés, associés à une hyperphagie patente caractéristiques de l'état de gestation chez tous les mammifères (Henson and Castracane, 2000). Une participation placentaire à l'augmentation de la leptinémie pendant la gestation a été mise en évidence chez l'homme comme chez les rongeurs (Garcia et al., 2001; Lepercq et al., 2001). Les niveaux de leptine placentaires et maternels augmentent jusqu'en fin de gestation et s'effondrent au moment de la parturition (Garcia et al., 2000; Herrera et al., 2000), renforçant l'hypothèse d'une participation placentaire à l'hyperleptinémie gestationnelle.

Si la gestation et la lactation constituent des périodes d'adaptations physiologiques « extrêmes », un dérèglement du statut hormonal maternel pendant la gestation et la période périnatale (sous-nutrition, stress, inflammation, diabète gestationnel) peut avoir à long terme des conséquences néfastes sur la descendance, la prédisposant développer des troubles métaboliques (Levin, 2006; McMillen et al., 2005).

Dans le paragraphe suivant nous focaliserons notre discours sur les modèles de prédisposition à l'obésité chez la descendance.

3. Perturbations de la nutrition maternelle : modèles rongeurs

L'étude des mécanismes sous-jacents à la programmation métabolique a nécessité le développement et l'utilisation de modèles animaux chez lesquels l'environnement métabolique pré et/ou postnatal a été perturbé (Armitage et al., 2005). Les manipulations peuvent être effectuées à différents niveaux pour modifier l'environnement périnatal. Ces modèles permettent de modifier :

- l'apport nutritionnel fourni à la descendance en terme de quantité et/ou de qualité pendant la période pré- et/ou néonatale : soit en intervenant sur la taille des portées, soit en modulant la nutrition de la mère

- l'exposition de l'individu à des facteurs endocriniens susceptibles d'altérer son contrôle de l'homéostasie énergétique à l'âge adulte

Un très grand nombre de modèles animaux ayant vu le jour, pour des raisons de clarté nous focaliserons notre discours sur les modifications nutritionnelles de l'environnement maternel, qui nous intéressent tout particulièrement. Il est possible de classer ces modifications en deux catégories : les modèles liés à une sous-nutrition maternelle d'une part, les modèles liés à une suralimentation maternelle d'autre part.

3.1. La sous-nutrition maternelle

Le modèle de sous-nutrition maternelle développé chez le rat mime les périodes de famine endurées par certaines populations au cours du 20^{ème} siècle telles que le blocus ayant touché la population hollandaise en 1944-1945 que nous avons évoqué précédemment.

La sous-nutrition maternelle peut-être induite par une modification de l'apport calorique, (modèle de restriction alimentaire), ou par une altération de la qualité des apports nutritionnels (alimentation à faible teneur en protéines, vitamines, oligo-éléments).

Les différents modèles de sous-nutrition maternelle de la rate gestante sont liés à un faible poids de naissance associé à une prédisposition à l'obésité (Levin, 2006). Jones et ses collaborateurs ont été les premiers à développer un modèle de sous-nutrition maternelle de la rate gestante (Jones et al., 1984). Leurs études démontrent qu'une restriction calorique de 50% prédispose la descendance mâle à la prise de poids, associée à une augmentation significative de leur prise alimentaire et au développement de l'obésité. Les études menées chez le rat montrent que les effets de la sous-nutrition maternelle sont d'autant plus délétères qu'ils ont lieu précocement pendant la gestation, résultat similaire à celui observé lors du blocus de Pays-Bas. D'autres études ont cependant démontré que la sous-nutrition maternelle en fin de gestation induisait une résistance à l'insuline et une obésité chez la descendance, suggérant l'importance de cette période développementale. La période critique de la gestation conduisant au développement de désordres métaboliques chez la descendance reste donc à définir.

La modification de l'apport calorique par une restriction alimentaire de 50% pendant la phase gestationnelle induit une altération du pic de leptine postnatal pendant les deux premières semaines de vie, susceptible de modifier le développement des connexions hypothalamiques

régulant la prise alimentaire, ainsi qu'une diminution des niveaux hypothalamiques de POMC chez la descendance mâle (Breton et al., 2009; Delahaye et al., 2008).

Une sous-nutrition maternelle sévère pendant la gestation (restriction calorique de 70%) induit un retard de croissance important chez la descendance ainsi qu'une augmentation marquée de la prise alimentaire aboutissant au développement de l'obésité, l'hyperinsulinémie, l'hypertension artérielle et l'hypoactivité, phénotype d'autant plus marqué que l'environnement nutritionnel postnatal est hypercalorique (Vickers et al., 2000; Vickers et al., 2003).

Le modèle le plus étudié d'altération des apports nutritionnels maternels pendant la gestation est celui du régime appauvri en protéines (5 à 8 % contre 20% pour un régime standard). La descendance de rates soumises avec un régime hypoprotéique présente une hypertension à l'âge adulte (Langley-Evans et al., 1999) ainsi qu'une résistance à l'insuline (Hales, 2000; Hales and Barker, 1992; Hales et al., 1996; Stocker et al., 2005) et une longévité amoindrie, conséquence de leur prédisposition à développer une obésité lorsque soumis à une alimentation obésogène (Ozanne and Hales, 2004; Ozanne and Nicholas Hales, 2005). D'un point de vue comportemental, ces animaux ont une préférence alimentaire marquée pour une alimentation riche en graisses et en sucres (Bellinger et al., 2004).

Le modèle des larges portées (14 à 24 ratons) constitue une alternative intéressante à la restriction calorique maternelle pendant la lactation ou à la séparation quotidienne de la rate allaitante et de sa portée, toutes deux sources de stress supplémentaire. Ce modèle est associé à un retard de croissance et un faible poids corporel des animaux au début de la phase postnatale (Levin et al., 1984), pouvant être compensés par la suite (*catch-up*). Les animaux développent une intolérance au glucose et une insulino-résistance à l'âge adulte ainsi que des retards moteurs et mnésiques (Codo and Carlini, 1979; Nagy et al., 1977). D'autre part, la quantité de leptine véhiculée par le lait maternel ingérée par les ratons pendant la phase postnatale étant réduite, des défauts développementaux de l'hypothalamus ont été supposés. Une étude récente a démontré l'utilisation du modèle des larges portées pour conserver la sensibilité à la leptine chez des rats prédisposés à développer une obésité (Patterson et al., 2010).

L'utilisation de régimes alimentaires maternels appauvris en protéines pendant la période postnatale a montré que la descendance présentait un plus faible poids corporel bien que la prise alimentaire ne soit pas modifiée (de Moura et al., 2007; Fagundes et al., 2007). Ozanne et ses collaborateurs ont par ailleurs démontré qu'un régime maternel appauvri en protéines

protégeait la descendance contre l'obésité induite par un régime à haute palatabilité, suggérant que dans ce cas précis, la fenêtre critique de programmation se situerait durant la période prénatale (Ozanne et al., 2004).

3.2. La suralimentation maternelle

Face à l'augmentation de la proportion de jeunes femmes en surpoids ou obèses, la compréhension des effets d'une suralimentation maternelle sur le développement de la descendance est de première importance. Les études épidémiologique menées chez les indiens Pima ont montré que la suralimentation de la mère pendant la grossesse prédisposait la descendance à développer un diabète de type 2 à l'âge adulte (McCance et al., 1994).

Chez les rongeurs, la suralimentation maternelle pendant la gestation et la lactation induit chez la descendance un phénotype proche de celui du syndrome métabolique (Armitage et al., 2005).

Ces différents modèles sont basés sur un déséquilibre de l'alimentation maternelle *via* un apport en lipides (en quantité comme en qualité) et/ou en sucres excédentaires. La composition de ces régimes alimentaires essaie de mimer au mieux certaines habitudes alimentaires de nos sociétés (Bayol et al., 2005; Ong and Muhlhausler, 2011), cependant le choix d'une approche nutritionnelle qui soit la plus proche de l'alimentation humaine reste encore sujet à débat (Li et al., 2011).

Une grande partie des protocoles de suralimentation développés n'établit pas de discrimination entre période pré- et postnatale. Globalement, un régime maternel hypercalorique induit notamment chez la descendance des modifications de l'homéostasie glucidique (Guo and Jen, 1995; Taylor et al., 2005), une augmentation de la pression artérielle (Khan et al., 2003; Langley-Evans, 1996), une augmentation de l'adiposité (Khan et al., 2004) et une hyperleptinémie (Taylor et al., 2005).

Les études menées chez le rat montrent que la suralimentation de la femelle gestante induit une augmentation de la prise alimentaire et de l'adiposité, ainsi qu'une intolérance au glucose et des dysfonctionnements cardiovasculaires chez la descendance (Khan et al., 2005; Taylor and Poston, 2007). Ces animaux présentent d'autre part une altération du développement des connexions hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire. Renforçant cette observation, Kozak et ses collaborateurs ont montré que les rats dont la mère a été nourrie avec un régime HF pendant la période prénatale présentent une réponse exacerbée à une injection de NPY par

rapport aux animaux dont la mère a reçu une alimentation contrôlée (Kozak et al., 2000; Kozak et al., 2005).

Plusieurs stratégies ont été développées pour étudier l'impact de la suralimentation pendant la période postnatale. Le groupe de Plagemann utilise un modèle de portées réduites, exact opposé du modèle des larges portées précédemment décrit. Ces portées de 3 à 6 ratons présentent une suralimentation associée à une prise de poids pendant la lactation et le développement d'une adiposité, de l'hyperphagie, d'une hyperinsulinémie, d'une hyperleptinémie précoces et d'une résistance à la leptine dans les noyaux arqués et ventromédians dès le 12^{ème} jour postnatal (Grayson et al., 2010; Plagemann et al., 1992).

Le modèle « pup in a cup » est un autre modèle de suralimentation postnatale qui a pour but d'étudier l'impact de modifications dans la composition lipidique ou glucidique du lait administré aux ratons par rapport à celle du lait maternel (Patel et al., 2009; Patel et al., 1994). Khan et ses collaborateurs ont montré les effets d'une suralimentation maternelle pendant la période postnatale en utilisant un modèle de portées croisées, dans lequel des nouveaux-nés issus de mères ayant reçu une alimentation contrôlée ont été allaités par une femelle nourrie avec un régime riche en lipides. Les données obtenues montrent que ces animaux développent une hypertension artérielle (Khan et al., 2005).

Assez peu d'études se sont consacrées à l'importance de l'alimentation maternelle durant la période pré-gestationnelle. Une équipe a récemment montré que cette période pourrait s'avérer critique dans la programmation métabolique (Gallou-Kabani et al., 2007). D'autre part, l'augmentation du surpoids chez les jeunes femmes primipares a incité notre équipe à développer un modèle de suralimentation maternelle administré avant la conception et jusqu'au sevrage de la descendance (Ferezou-Viala et al., 2007a). Les caractéristiques de ce modèle de programmation seront décrites par la suite.

De ce chapitre nous retiendrons qu'il existe plusieurs de modèles de programmation. Nous avons focalisé notre attention sur les modèles dans lesquels l'alimentation maternelle était modifiée quantitativement ou qualitativement et présentant l'avantage de mimer des déséquilibres alimentaires présents dans nos sociétés. Néanmoins, il existe de nombreux autres exemples, parmi lesquels les traitements aux glucocorticoïdes ou à la leptine ainsi que les réductions placentaires.

Partie C. Objectifs du travail de thèse

Les cytokines jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie énergétique. La leptine, une cytokine produite par le tissu adipeux, régule l'activité des neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Ainsi la leptine diminue l'appétit et stimule la perte de poids. Toutefois, de nombreuses formes d'obésité sont associées à une résistance centrale à la leptine. Le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*) est une neurocytokine de la même famille que la leptine dont l'un des principaux avantages est qu'il stimule la perte de poids dans les cas de leptino-résistance en activant les mêmes voies de signalisation que la leptine (Benomar et al., 2009).

Notre travail de thèse s'est articulé autour de deux axes :

- **Impact du régime maternel hyperlipidique sur le contrôle de l'homéostasie énergétique de la descendance à l'âge adulte**

L'obésité est une maladie progressant de façon spectaculaire, aussi bien dans la population adulte qu'enfantine. Si les causes de cet état pathologique sont multiples, des études épidémiologiques ont toutefois mis en évidence une origine développementale à sa survenue. Ainsi, le concept de programmation métabolique propose que des perturbations générées au cours des périodes fœtales et néonatales puissent prédisposer l'individu à développer des troubles métaboliques (Cripps et al., 2007). Il est désormais connu que les régimes déséquilibrés hypercaloriques sont responsables de l'installation de l'obésité associée à un état de leptino-résistance et d'hyperleptinémie chez l'homme. Face au nombre grandissant de jeunes femmes obèses ou en surpoids pendant la grossesse et l'allaitement, il semble désormais primordial d'étudier l'influence d'un régime maternel sur la prédisposition de la descendance à devenir obèse une fois adulte (Nohr et al., 2009). Notre équipe a récemment observé qu'un régime maternel hyperlipidique (HF) administré avant la conception et jusqu'au sevrage affectait durablement la sensibilité hypothalamique de la descendance à la leptine (Ferezou-Viala et al., 2007a). Notre premier objectif a été d'étudier l'impact du régime maternel HF sur la prédisposition de la descendance à devenir obèse une fois adulte. Dans ce but, cette dernière a été soumise à un régime obésogène de haute palatabilité : le régime P. Dans un second temps, nous nous sommes attachés à caractériser les modifications induites

par le régime maternel HF sur l'organisation morphofonctionnelle du noyau arqué de la descendance, structure hypothalamique clef de la régulation de l'homéostasie énergétique.

▪ **Implication du CNTF dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique**

Afin de mieux comprendre les mécanismes sous-tendant l'installation de la leptino-résistance, nous avons étudié le mode d'action du CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*). Une étude menée au laboratoire avait démontré l'existence d'une synthèse endogène de CNTF dans le noyau arqué de rat ainsi qu'un effet protecteur de la cytokine contre la prise de poids induite par une alimentation P chez certains individus, suggérant que le CNTF pourrait jouer le rôle de modulateur endogène de l'homéostasie énergétique (Vacher et al., 2008). A ce jour, les mécanismes d'action du CNTF demeurent cependant incompris car la cytokine ne présente pas de peptide signal et ne peut donc être sécrétée selon les voies classiques d'exocytose.

L'objectif de cette seconde étude a été de caractériser le mode d'action du CNTF. Une étude *in vitro* ayant montré une action intracellulaire de la cytokine (Monville et al., 2002), nous avons voulu valider ce résultat *in vivo* chez le rat.

Procédures expérimentales

Ce chapitre a pour but de décrire brièvement les principales manipulations effectuées au cours de la thèse.

1. Animaux

2. Immunohistochimie

3. Microscopie

4. Statistiques

1. Animaux

1.1 Provenance et reproduction

La majeure partie des études a été réalisée sur des rats Wistar (CER Janvier, Le Genest-St-Isle, France). Les rats étudiés au sevrage ou à l'âge adulte sont issus de l'accouplement dans l'animalerie du laboratoire de femelles et de mâles Wistar provenant du même élevage.

Pour comparaison, une étude de l'organisation cytoarchitectonique du noyau arqué médian de l'hypothalamus a été réalisée chez un modèle dont l'obésité est associée à une mutation génétique: le rat *Zucker*.

1.2 Hébergement

Les rats ont été élevés dans l'animalerie du laboratoire où ils ont reçu eau et nourriture « ad libitum ». La température de leur pièce de vie était fixée à $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et l'éclairage artificiel suivait un cycle jour/nuit de 12 heures (8 h : allumage, 20 h : extinction).

L'ensemble des études a été réalisé dans le respect des réglementations françaises et européennes (Décret 86/609/CEE) relatives à l'expérimentation animale. Les dispositions nécessaires ont donc été prises pour éviter toute souffrance et tout stress inutiles à l'animal. Toutes les euthanasies ont été réalisées pendant la phase diurne, durant la même phase du cycle circadien, de 14h à 18h.

1.3 Modèles et régimes alimentaires

1.3.1 Modèle d'obésité induite par l'alimentation : le rat DIO (*Diet Induced Obesity*)

Dans ce modèle, le développement de l'obésité est provoqué par un régime déséquilibré hypercalorique de type hyperlipidique proposé « ad libitum » pendant 22 semaines à des rates Wistar âgées de 8 semaines.

Les rates du groupe contrôle ont reçu un régime commercial *Normal-Fat* (contrôle **C**) sous forme solide (formule 113, Safe, Augy, France), tandis que les rates du groupe expérimental ont été nourries avec un régime hyperlipidique *High-Fat* (**HF**) semi-purifié produit au laboratoire et dont la composition a été adaptée à partir du protocole de Guo et Jen (Guo and Jen, 1995). Ce régime diffère d'un régime *Normal-Fat* par sa très forte teneur en huile de palme, riche en acides gras saturés et monoinsaturés, au détriment de l'amidon (Tableau 4).

Tableau 4 : composition du régime HF

Régime	C	HF
Teneur (g/100g)		
Amidon	47.5	12.5
Saccharose	15	15
Caséines	20	20
Huile de palme	3	38
Huile de colza	2	2
Cellulose	5	5
Vitamines	2.5	2.5
Sels minéraux	5	5

L'apport énergétique du régime HF est de 571,9 kcal/100 g tandis que celui du régime standard C est de 377,1 kcal/100 g (Figure 18).

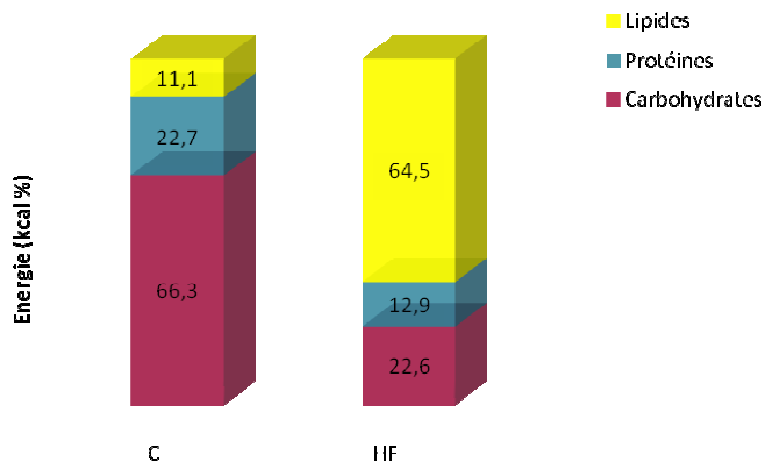


Figure 18 : contenu énergétique des régimes Normal-Fat (C) et High-Fat (HF)

Les mesures de la prise alimentaire et un suivi du poids corporel des rates ont été réalisés deux fois par jour, aux mêmes heures d'intervalle sur une période 15 jours.

1.3.2. Modèle de programmation métabolique

Modifier l'environnement périnatal

Afin de déterminer les conséquences d'une alimentation maternelle hyperlipidique, nous avons étudié la descendance de rates soumises aux deux alimentations précédemment citées :

- un régime standard C
- un régime hyperlipidique HF

Chez le rat, le développement des réseaux hypothalamiques contrôlant l'homéostasie énergétique s'effectue non seulement pendant la période gestationnelle mais aussi en période postnatale (Bouret, 2010; Markakis, 2002) ; nous avons donc étudié la descendance de rates auxquelles ont été administrées une alimentation HF ou C selon deux protocoles nutritionnels.

Modifier l'environnement gestationnel et postnatal : le protocole « long »

Dans ce protocole, le régime HF ou le régime standard a été administré aux rates six semaines avant l'accouplement puis tout au long des périodes de gestation et de lactation selon le protocole décrit par Férézou-Viala et al. (2007) (Figure 19).

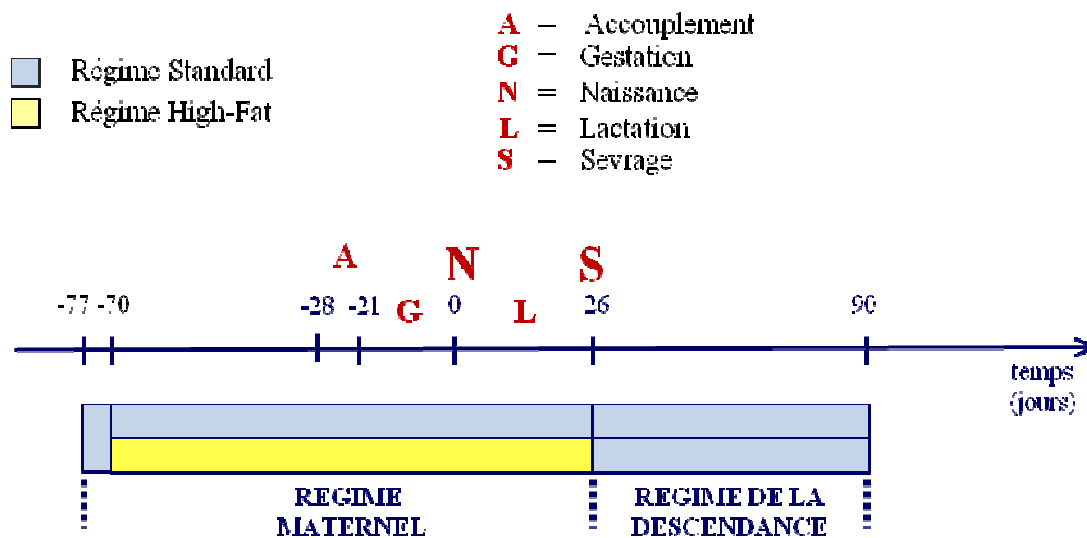


Figure 19 : protocole « long »

Modifier l'environnement postnatal : le protocole « court »

Pour ce second protocole, les rates ont reçu la même alimentation contrôle depuis leur sevrage jusqu'à l'âge adulte. Elles ont été maintenues sous cette alimentation C pendant les périodes d'accouplement et de gestation. Dès la naissance, les mères ont reçu un régime C pendant les quatre semaines de lactation (Figure 20).

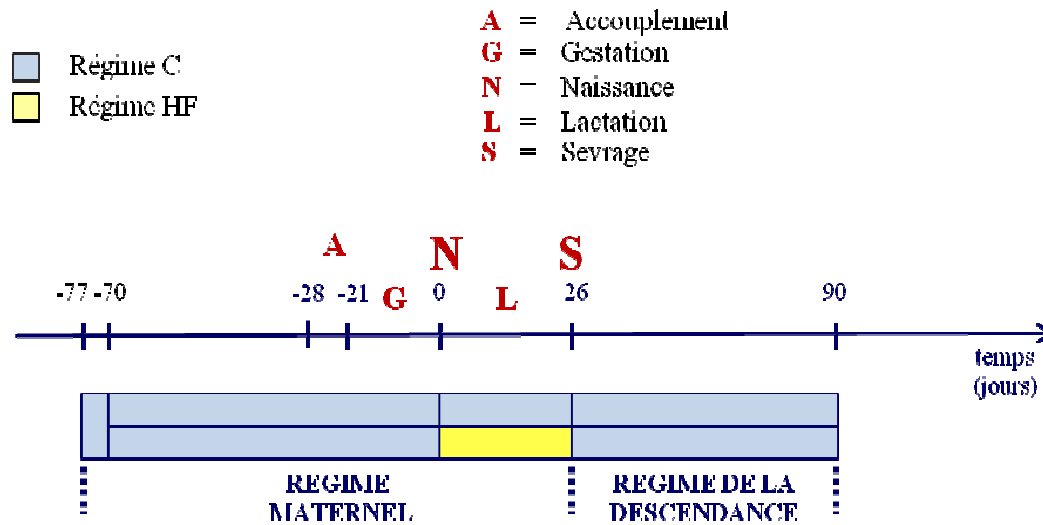


Figure 20 : protocole « court »

Pour les deux protocoles, un suivi de prise alimentaire des mères ainsi qu'une mesure bis-hebdomadaire de leur poids corporel ont été réalisés tout au long de l'expérimentation.

Le jour de naissance des rats est compté comme P0. Les portées ont été équilibrées sans réduction à 10 ratons par mère afin de maintenir des conditions nutritionnelles homogènes. Les rats ont été sevrés à 26 ± 1 jour, séparés en fonction de leur sexe et du régime alimentaire de leur mère et nourris avec une alimentation standard C.

La descendance a été étudiée à l'âge adulte, à 90 jours (**P90**) ou deux jours après le sevrage (**P28**).

Tester la prédisposition de la descendance à devenir obèse

Nous avons souhaité étudier l'impact du régime maternel HF (administré aux rates pendant la gestation et la lactation selon le protocole « long ») sur la descendance adulte une fois celle-ci soumise à un régime « haute palatabilité » P.

Les rats issus de mères nourries avec une alimentation HF ou C ont ainsi été sevrés avec un régime C pendant 7 semaines avant de recevoir un régime hypercalorique «High-Palatable » (P) (Fig. 21) pour une durée de 3,5 mois. Le régime P semi-synthétique a été produit au laboratoire à partir du régime standard C selon la composition décrite dans les travaux de Holemans (Holemans et al., 2004).

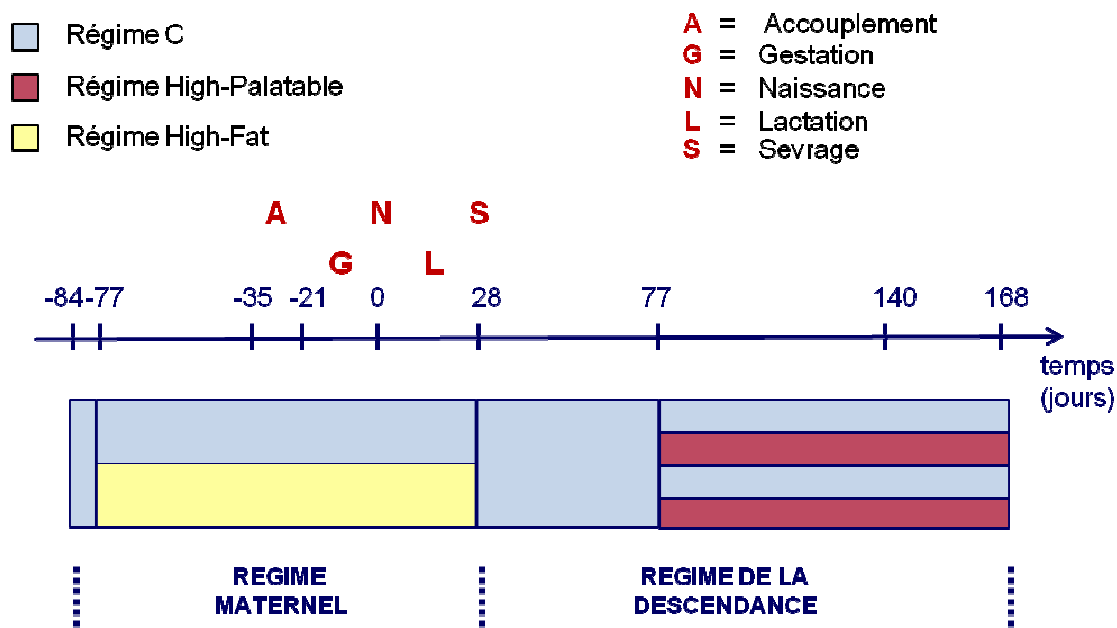


Figure 21 : protocole d'administration du régime « High-Palatable » P

L'apport énergétique du régime P est de 392,6 kcal/100 g contre 377,1 kcal/100 g pour le régime C. Ce régime de type « cafeteria » est fabriqué à partir de lait concentré et de saccharose ce qui en fait un régime particulièrement appétant et obésogène pour les rats (tableau 5 ; Figure 22).

Tableau 5 : composition du régime P

Régime	P
Composition (%)	
Régime commercial solide (formule 113, Safe)	33
Laït concentré Nestlé	33
Saccharose	7
Eau	27

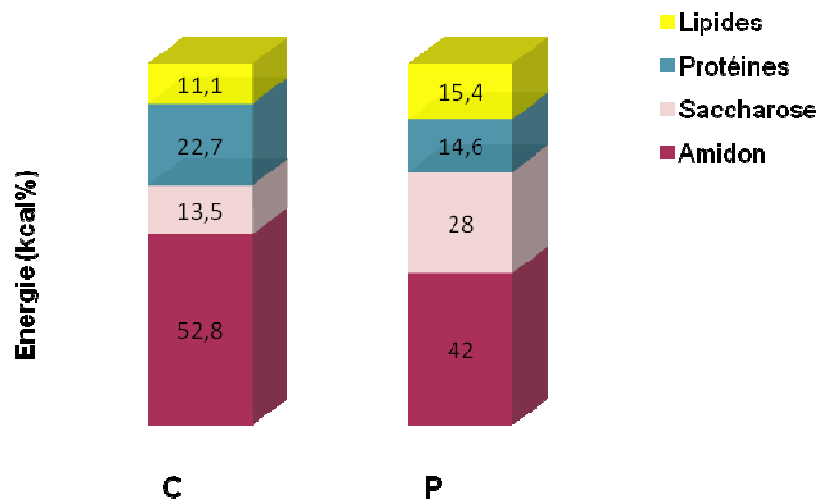


Figure 22 : contenu énergétique des régimes Normal-Fat (C) et High-Palatable (P)

1.3.3. Modèle Zucker

Nous avons étudié l'organisation morphofonctionnelle du noyau arqué médian chez des rats *Zucker* fa/fa mâles âgés de 3 mois et des rats de type sauvage Fa/Fa (n=4 par groupe).

La souche porteuse de la mutation *fatty* (fa), découverte par Zucker *et al.*, (1961), est une mutation faux-sens du gène codant le récepteur de la leptine Lepr. Cette mutation étant autosomale récessive, les rats hétérozygotes fa/Fa ne présentent pas de phénotype obèse, à l'inverse du rat fa/fa, classiquement considéré comme un modèle d'obésité dont les

principales caractéristiques phénotypiques sont les suivantes (Bray, 1977; Kurtz et al., 1989; Takaya et al., 1996) :

- absence de récepteur à la leptine fonctionnel
- hyperphagie chronique
- hyperleptinémie, hyperinsulinémie
- leptino-résistance
- insulino-résistance
- hypertrophie des adipocytes
- obésité à l'âge adulte
- hypertension artérielle
- hypertriglycéridémie

2. Immunohistochimie

2.1. Protocole succinct

2.1.1. Préparation des tissus

Les rats ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine (45 mg/kg) et de médétomidine (0,5 mg/kg). Les rats ont ensuite été perfusés par le ventricule gauche du cœur avec 100 mL d'une solution saline de tampon phosphate (PBS : tampon phosphate 0,05M, pH 7,4, NaCl 9 g/L) puis avec 500 mL de paraformaldéhyde à 4% dilué dans du PBS. Le débit de perfusion était de 10 mL/min. Puis les rats ont été décapités et leur cerveau rapidement prélevé avant d'être post-fixé dans la même solution fixatrice jusqu'au jour de la coupe. Des coupes frontales flottantes de 50 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un microtome à froid (HM 650V, Thermo Scientific Microm, Walldorf, Germany) et récupérées dans une solution de stockage (10% PBS, 30% glycérol, 30% éthylène glycol). Ces coupes ont ensuite été conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

La spécificité des marquages a été vérifiée par omission de l'anticorps primaire et/ou par utilisation de peptides bloquants.

Nos études ont porté sur l'organisation cytoarchitectonique du noyau arqué médian.

2.2. Marqueurs de la plasticité hypothalamique

L'étude de l'organisation morphofonctionnelle du noyau arqué médian nous a conduits à analyser plusieurs paramètres astrocytaires ou vasculaires présentés dans le tableau 6.

2.2.1. La glie et le compartiment vasculaire

Les astrocytes étant des cellules gliales particulièrement plastiques dont l'implication dans le contrôle du métabolisme énergétique a été suggérée par plusieurs études (Hsuchou et al., 2009a; Pan et al., 2011), nous avons étudié les éventuels changements morphologiques de ces cellules chez des rats dont l'environnement périnatal avait été modifié.

Pour cela, nous avons étudié l'expression de protéines astrocytaires telles que la GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), la S100 β ou le transporteur de glucose Glut-1 dans le noyau arqué médian.

La laminine, protéine de la lame basale, nous a permis de visualiser les vaisseaux sanguins, lesquels ont aussi été mis en évidence par immunomarquage de la lectine de pomme de terre (glycoprotéine capable de se lier aux carbohydrates présents en surface des cellules). Des doubles-marquages GFAP-laminine ont permis de visualiser les rapprochements entre les astrocytes et les vaisseaux sanguins.

Enfin, la vimentine a été utilisée comme marqueur de réactivité gliale.

Tableau 6 : critères d'analyse des marqueurs gliaux

Marqueur	Paramètre évalué		Immunoréactivité
GFAP	Surface du marquage	Epaisseur des prolongements	
S100β	Densité	Diamètre des corps cellulaires	
Glut-1	Surface globale du marquage		
Vimentine			
Lectine	Diamètre des vaisseaux		
GFAP-Laminine	Diamètre des vaisseaux	Surface périvasculaire	

2.2.2 Le CNTF et ses sous-unités réceptrices

Les immunomarquages du CNTF (*Ciliary neurotrophic factor*) et de sa sous-unité réceptrice spécifique, le CNTFR α dans le noyau arqué médian des rats ont été réalisés suivant le protocole établi par le laboratoire (Vacher et al., 2008).

Tableau 7 : références des anticorps utilisés

Protéine d'intérêt	Référence de l'anticorps
GFAP	Monoconal souris (1:1000 ; Sigma)
S100 β	Monoconal souris (1:800 ; Sigma)
Glut-1	Polyclonal Chèvre (C-terminal 1 : 400 ; Santa Cruz Biotechnology)
Vimentine	Monoclonal souris (1 : 1000 ; Sigma)
Laminine	Polyclonal lapin (3:1000 ; Sigma)
Lectine	Couplée TRITC (1 : 600 ; Sigma)
CNTF	Polyclonal chèvre (1:200, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)
CNTFR α	Polyclonal chèvre (1:50; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)
LIF-R	Polyclonal lapin (C-terminal 1:1000 ; Santa Cruz Biotechnology, USA)
gp130	Polyclonal lapin (N-terminal 1:200; Santa Cruz Biotechnology, USA)

2.3. Evaluation de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique

2.3.1. Mesure de la diffusion du bleu trypan dans l'ARC

Principe

Afin d'évaluer l'impact du régime maternel sur l'intégrité de la barrière-hémato-encéphalique dans notre modèle de programmation métabolique, nous avons injecté un traceur, le bleu trypan, par perfusion intracardiaque. Parce que son utilisation ne nécessite pas de traitement spécifique préalable et qu'il n'induit pas de modifications histologiques ou immunocytochimiques, le bleu trypan a été décrit comme un excellent indicateur des variations de perméabilité au niveau de la barrière hémato-encéphalique chez le rat (Reynolds and Morton, 1998).

En effet, ce colorant est capable de lier les protéines plasmatiques telles que l'albumine (Stopa et al., 2006) et permet donc d'évaluer le taux d'endocytose adsorbative des cellules endothéliales (Abbott et al., 2006).

Protocole

Le protocole que nous avons utilisé a été adapté de celui présenté dans les travaux d'Eizayaga et al. (2006) et d'Ikeda et al. (1994).

Les rats ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine (45 mg/kg) et médétomidine (0,5 mg/kg) puis ont été perfusés par voie intracardiaque comme décrit précédemment.

Nous leur avons perfusé 200 mL d'une solution de bleu trypan à 0,5% (Sigma, St Louis, USA) puis 300 mL d'une solution de paraformaldéhyde à 2%. Les encéphales ont ensuite été prélevés puis cryoprotégés dans une solution de sucrose à 30% pendant 12h à 4°C puis congelés entre -35 et -40°C dans l'isopentane. Des coupes coronales sériées de 40 µm d'épaisseur à l'aide d'un cryostat (Microm) ont été récoltées sur lames de verre puis conservées à -80°C.

3. Microscopie

3.1. Microscopie confocale

Les marquages immunofluorescents ont été examinés à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM 510 ou d'un microscope confocal Zeiss LSM 700 (Zeiss microscopy, Jena, Allemagne). Des coupes optiques sériées séparées sur l'axe des z de 0,3 à 1 µm en fonction de l'objectif et du marqueur testé ont été obtenues par balayage séquentiel avec un moyennage adapté à chacun des marquages. Les images ont été acquises avec des objectifs 20x à sec ou 40x et 63x à immersion à huile. Les images utilisées pour les doubles marquages GFAP-Laminine ou Glut-1-Laminine ont été scannées avec un zoom de 2,5.

3.2. Microscopie électronique en transmission

Les rats ont été perfusés avec une solution contenant du paraformaldéhyde à 2% et du glutaraldéhyde à 0,5% (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA, USA).

Les noyaux arqués microdisséqués ont été déshydratés et inclus en résine LR White (Sigma). Des coupes ultrafines de 70 nm ont été réalisées à l'aide d'un microtome (Leica...) et

récupérées sur grilles de nickel recouvertes d'un film formvar/carbone avant de procéder aux immunomarquages du CNTF et de ses sous-unités réceptrices comme décrit précédemment. Les anticorps primaires ont été marqués par des anticorps secondaires anti-espèce couplés à des particules d'or d'un diamètre de 6 ou 10 nm (1:30; Aurion Costerwegs, Wageningen, Pays-Bas). Les coupes ultra-fines ont ensuite été contrastées à l'aide d'une solution d'acétate d'uranyl à 5% et observées au microscope électronique à transmission à 80 kV (EM 208, Philips, Eindhoven, Pays-Bas ; caméra d'acquisition CCD grand champ AMT).

3.3. Traitement des images

3.3.1. Images acquises par microscopie confocale

Après acquisition, les plans optiques ont été analysés avec les logiciels ImageJ version 1-36b (National Institute of Health, USA). Des superpositions de plusieurs plans focaux consécutifs et des reconstructions tridimensionnelles à partir d'un nombre défini de plans focaux ont été réalisées.

Analyses des particules : immunomarquages S100 β

Les corps cellulaires des astrocytes ont été comptées de manière automatique avec correction manuelle après seuillage, binarisation et détermination du diamètre maximum admis. Des mesures de diamètre des particules ont aussi été effectuées.

Analyses des surfaces : immunomarquages GFAP, Glut-1, Vimentine, Lectine, Laminine, diffusion du bleu trypan dans l'ARC

Nous avons réalisé des mesures d'intensité de fluorescence et de surface de marquage en sélectionnant un même nombre de coupes optiques pour toutes les images, sur au moins cinq champs différents par noyau arqué, et chez au moins cinq animaux par groupe. Une moyenne a été réalisée à chacune de ces étapes, jusqu'à obtenir une valeur unique par animal, avant de procéder à l'analyse statistique.

Analyses des doubles marquages GFAP-Laminine

La GFAP et la laminine n'étant pas exprimées par les mêmes types cellulaires, nous n'avons pas pu réaliser une étude de colocalisation stricte des doubles marquages GFAP-Laminine. Ainsi, afin d'évaluer la couverture astrocytaire périvasculaire, nous avons procédé aux mesures des surfaces endothéliales occupées par les prolongements astrocytaires.

3.3.2. Images acquises par microscopie électronique à transmission

Analyses des particules d'or

Afin d'évaluer la discrimination des billes d'or de 6 nm et 10 nm, nous avons effectué des dépôts des anticorps secondaires seuls sur les grilles de nickel et analysé la fréquence de distribution des billes d'or en fonction de leur diamètre.

Distribution cellulaire

La répartition des particules dans chaque compartiment cellulaire : noyau, cytoplasme, compartiment extra-cellulaire a été comptée manuellement.

4. Statistiques

En fonction de l'étude considérée ainsi que la taille de l'échantillon, nous avons procédé aux analyses statistiques suivantes :

- test t de Student apparié ou non apparié. Pour cela nous avons eu recours à l'utilisation du logiciel Statview (ASAP Software, St. Ouen, France). Nous avons considéré que les différences entre les deux groupes étaient significatives pour un degré de significativité p inférieur à 0,05.
- test de Mann & Whitney. Pour cela nous avons eu recours à l'utilisation du logiciel AnaStats.fr (Rilly-sur-Vienne, France)

La figure 11 synthétise l'ensemble des manipulations effectuées en fonction de l'étude considérée.

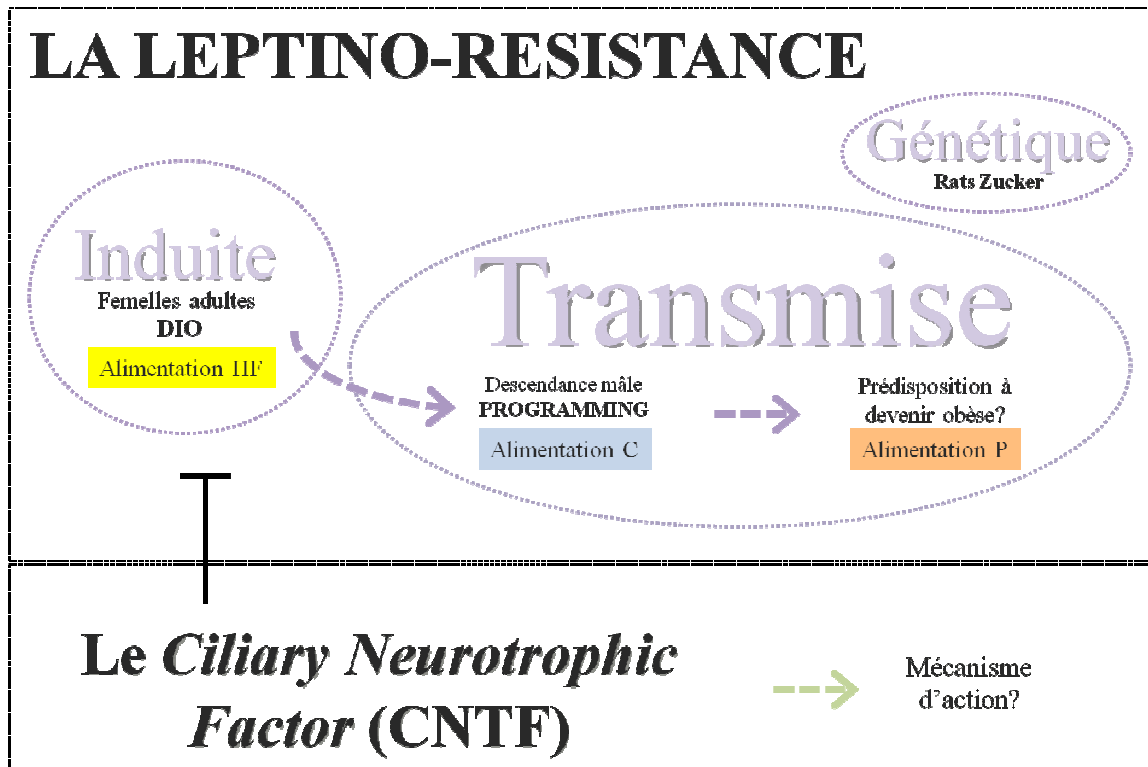


Figure 23 : schéma de synthèse des modèles animaux utilisés suivant la thématique

DIO : Diet Induced Obesity

Résultats

Etude 1 : Impact d'un régime maternel hyperlipidique sur le le contrôle de l'homéostasie énergétique chez la descendance

Résultats complémentaires : Impact d'un régime maternel hyperlipidique postnatal sur l'organisation gliale dans le noyau arqué de la descendance adulte

Etude 2 : Mécanismes d'action du CNTF dans le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique

Etude 1

Impact d'un régime maternel hyperlipidique sur le
contrôle de l'homéostasie énergétique chez la
descendance

Unexpected Long-Term Protection of Adult Offspring Born to High-Fat Fed Dams against Obesity Induced by a Sucrose-Rich Diet
Couvreur O, Férézou J, Gripois D, Serougne C, Crépin D, Aubourg A, Gertler A, Vacher CM, Taouis M. PLoS One. 2011 Mar 25;6(3)

Présentation de l'étude

L'obésité est une maladie multifactorielle en constante progression à l'échelle mondiale et concernant notamment un nombre grandissant d'enfants.

L'un des principaux enjeux pour lutter contre l'installation précoce de la pathologie est d'identifier les mécanismes qui sous-tendent son apparition. Il est désormais reconnu que le statut nutritionnel et hormonal de la mère est un facteur déterminant dans la genèse de la maladie. Ainsi, des modifications de l'environnement maternel lors de phases critiques du développement des structures contrôlant l'homéostasie énergétique sont susceptibles d'influencer le devenir de la descendance. L'utilisation de modèles animaux reproduisant les déséquilibres alimentaires (sur- et sous-alimentation) de nos sociétés permet de caractériser les mécanismes impliqués dans cette programmation métabolique.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact d'un régime maternel hyperlipidique administré avant la gestation et jusqu'au sevrage sur la prédisposition de la descendance à prendre du poids dans un environnement nutritionnellement riche et sur l'expression des marqueurs hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la balance énergétique.

NB : Cette étude correspond à l'expérience n°2 présentée dans la publication « *Unexpected Long-Term Protection of Adult Offspring Born to High-Fat Fed Dams against Obesity Induced by a Sucrose-Rich Diet* »

Nous ne commenterons pas les données obtenues dans l'expérience n°1 à laquelle nous n'avons pas participé. En revanche les résultats pourront être utilisés lors de la discussion.

Unexpected Long-Term Protection of Adult Offspring Born to High-Fat Fed Dams against Obesity Induced by a Sucrose-Rich Diet

Odile Couvreur^{1,2}, Jacqueline Ferezou^{1,2}, Daniel Gripois^{1,2}, Colette Serougne^{1,2}, Delphine Crépin^{1,2}, Alain Aubourg^{1,2}, Arieh Gertler³, Claire-Marie Vacher^{1,2}, Mohammed Taouis^{1,2*}

1 Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire, University of Paris-Sud, UMR 8195, Orsay, France, **2** Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire, CNRS, Centre de Neurosciences Paris-Sud UMR8195, Orsay, France, **3** The Institute of Biochemistry, Food Science, and Nutrition, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

Abstract

Background: Metabolic and endocrine environment during early life is crucial for metabolic imprinting. When dams were fed a high fat diet (HF diet), rat offspring developed hypothalamic leptin resistance with lean phenotype when weaned on a normal diet. Interestingly, when grown on the HF diet, they appeared to be protected against the effects of HF diet as compared to offspring of normally fed dams. The mechanisms involved in the protective effect of maternal HF diet are unclear.

Methodology/Principal Findings: We thus investigated the impact of maternal high fat diet on offspring subjected to normal or high palatable diet (P diet) on metabolic and endocrine parameters. We compared offspring born to dams fed P or HF diet. Offspring born to dams fed control or P diet, when fed P diet exhibited a higher body weight, altered hypothalamic leptin sensitivity and metabolic parameters suggesting that maternal P diet has no protective effect on offspring. Whereas, maternal HF diet reduces body weight gain and circulating triglycerides, and ameliorates corpulence index of offspring, even when subjected to P diet. Interestingly, this protective effect is differently expressed in male and female offspring. Male offspring exhibited higher energy expenditure as mirrored by increased hypothalamic UCP-2 and liver AdipoR1/R2 expression, and a profound change in the arcuate nucleus astrocytic organization. In female offspring, the most striking impact of maternal HF diet is the reduced hypothalamic expression of NPY and POMC.

Conclusions/Significance: HF diet given during gestation and lactation protects, at least partially, offspring from excessive weight gain through several mechanisms depending upon gender including changes in arcuate nucleus astrocytic organization and increased hypothalamic UCP-2 and liver AdipoR1/2 expression in males and reduced hypothalamic expression of NPY and POMC in females. Taken together our results reveal new mechanisms involved in the protective effect of maternal HF diet.

Citation: Couvreur O, Ferezou J, Gripois D, Serougne C, Crépin D, et al. (2011) Unexpected Long-Term Protection of Adult Offspring Born to High-Fat Fed Dams against Obesity Induced by a Sucrose-Rich Diet. PLoS ONE 6(3): e18043. doi:10.1371/journal.pone.0018043

Editor: Ben Ko, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong

Received: October 26, 2010; **Accepted:** February 21, 2011; **Published:** March 25, 2011

Copyright: © 2011 Couvreur et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The funding for this work came from University of Paris-Sud 11 and Groupe Lipide et Nutrition (GLN 2009–2010). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mohammed.taouis@u-psud.fr

Introduction

Obesity has been considered to result from both a genetic prevalence and inadequate nutrition due to lifestyle, and more recently epidemiological evidence raised the notion of a developmental origin of this pathology and associated diseases [1]. According to the «thrifty phenotype» hypothesis [2], a poor fetal nutrition leads to programming of an adult phenotype that is adapted to poor nutrition, but a mismatch between predicted and postnatal environment then promotes a persistent dysregulation of the body weight control [3]. Thus, low-birth-weight babies due to adverse foetal conditions often display an increased susceptibility to develop a metabolic syndrome when submitted to plentiful conditions later in life [4,5]. Such a developmental programming, reproduced in animal models by maternal undernutrition [6], is in

part attributed to a relative lack of leptin during crucial time windows in the developmental neuronal plasticity, since a normal adult phenotype may be restored after treatment of either pregnant dams [7] or suckling pups [8,9] by exogenous leptin. This pleiotropic adipocyte-derived cytokine acts as an essential neurotrophic factor along the development of the hypothalamic circuits regulating metabolic homeostasis [10]. Later in life, leptin through its binding to specific ObRb receptors (long isoform of leptin receptor) especially abundant in the arcuate nucleus triggers the concerted signalling pathways leading to reduce appetite and increase energy expenditure [11]. Moreover, the growing proportion of women that are overweight before and during pregnancy and lactation [12] raised the question of the impact of leptin excess during critical perinatal periods on the risk of becoming obese in adulthood. Indeed this risk has been shown to

be increased in pups issued from dams treated with leptin before weaning [13] or overfed by suckling in small litters [14]. While maternal high-fat diets have been often reported to program obesity in offspring [15–19], discrepant results obtained in rodents may be related to the choice of the strain, the litter size and the composition of the inappropriate diet promoting maternal obesity, mimicking the features of hypercaloric foods available in modern societies [20,21].

In a previous study carried in Wistar rats [22], pups reared in large litters and born to dams fed a high-fat (HF) diet, from before conception and throughout gestation and lactation, displayed a lower weaning body weight as compared to their counterparts born to control dams. Their growth retardation was related to the abnormal fall in body weight observed in lactating dams. After 6 weeks feeding a control diet from weaning, these pups were characterized by a defect of leptin signaling in hypothalamus despite a lean phenotype and normal leptin, insulin, glucose and lipid plasma levels [22]. Interestingly, when the same HF diet was provided for 6 weeks after weaning, only males issued from normally fed dams become overtly obese while those born to HF dams were protected against the obesogenic effect of the HF diet, despite the same defective hypothalamic leptin signaling. Their «spendthrift» phenotype suggested a persistent modification of the energy control, in agreement with a predictive adaptive response [23] to the inappropriate HF diet [24–26].

In the present paper, a highly palatable (P) diet was used (experiment 1, Figure 1) to induce maternal obesity [27], then the adult phenotype of male offspring was compared to that of control rats born to chow-fed dams. When pups issued from obese dams were assigned to the chow diet at weaning, they displayed inherited defective leptin signaling in hypothalamus, which persisted until age of 6 months despite normal body weight evolution. However, pups born to obese P dams and weaned on the same P diet were not protected against diet induced obesity. Clearly the two inappropriate HF and P diets have distinct impacts on both dams and pups, likely in relation with their different palatability or composition. Both diets (HF and P) were then used (experiment 2, Figure 1) in order to study whether adult pups born to HF dams and weaned on a chow diet, will be more or less susceptible than control rats to develop obesity when switched to the obesogenic P diet, a question that remained unresolved in our previous study [22]. Thus, male and female offspring born to HF or control dams were assigned to the control diet for 7 post-weaning weeks, and then switched to the P diet for 3 additional months. Our results clearly showed that offspring from both genders born to HF dams were protected from the obesogenic effect of P diet as their body weight gain was lower as compared to offspring born to chow dams. In addition, the potential protective effect of maternal HF diet involves most likely different gender-dependent mechanisms.

Results

Experiment 1

Females and pups until weaning. According to the cumulative food intake measured during 4 weeks before mating and the energy density of each dry diet (Table 1), the mean daily amount of food ingested per rat (measured every two days on 4 cages of 4 rats in each group) was higher for the P diet (25.1 ± 0.4 g as wet P diet or 16.6 ± 0.3 g as dry P diet) than for the C diet (15.18 ± 0.18 g, $p < 0.0001$), then providing more energy (65.2 ± 1 and 56.2 ± 0.7 kcal, $p < 0.0001$, respectively). The number of females which became pregnant (12 out of 16 animals in each group) and the initial size of the litters (11.7 ± 0.8 and 11.7 ± 0.9

pups from P and C dams, respectively) were not influenced by the maternal diet, but the male/female ratio (0.79 for 140 pups born to P dams versus 1.16 for 141 pups born to C dams) was inverted. No difference appeared in the mean birthweight and after the litter size was equilibrated to 11–12 pups at birth, the evolution of the mean litter weight was identical regardless the maternal diet until weaning (results not shown). As shown in Figure 2, P dams became overtly obese compared to C dams ($n = 12$ per group) and their overweight (about 15% before mating) was maintained after 120 days of experimental diet, i.e. 20 days after weaning. At this time, fasting plasma level of leptin was clearly higher in P dams (6.5 ± 1.3 ng/mL, $n = 6$) than in control dams (1.9 ± 0.5 ng/mL, $n = 7$, $p < 0.005$).

Offspring after weaning. Daily energy intakes and final physiological parameters measured in adult fasted rats are shown in Table 2. Mean daily energy intakes were calculated from daily food intakes measured twice a week from the 2nd to the 6th post-weaning week on 10 cages of 2 rats per group. The highest value was found in the PC group of rats fed the highly palatable P diet and born to normally fed dams. Their counterparts born to obese dams (PP group) ingested less energy for a similar weight gain, suggesting a better food efficacy of the P diet in this group. The maternal diet did not affect CC and CP rats, which both displayed a lean phenotype while their energy intake was close to that of obese PP rats. As observed in Figure 3, independently of maternal diet a striking effect of the post-weaning diet appeared on the body weight evolution and gain. The same conclusion was drawn by comparing plasma concentrations of triglycerides, leptin and insulin, all reported in Table 2. These parameters were higher in rats fed the P diet (PP and PC groups) than in rats fed the chow diet (CC and CP groups). The only differences concerned the plasma levels of leptin which were lower in CP rats than in control CC rats, and the plasma levels of insulin and HOMA index of PP rats which overpassed those of PC rats. In addition, the lowest plasma cholesterol value was found in PP rats, indicating a long-term impact of the maternal metabolic status on these parameters.

Hypothalamic leptin sensitivity of offspring. The hypothalamic leptin sensitivity was assessed in each group by comparing the phosphorylation levels of STAT3 and ERK1/2 in response to a bolus of leptin. Briefly, 11 week-old rats from the four groups were starved overnight and divided in two groups that receive by IP saline or leptin, respectively. The phosphorylation levels of STAT-3 and ERK1/2 were measured by Western blot. Leptin IP bolus induced STAT-3 (fig. 4A and 4B) and ERK1/2 (fig. 4C and fig. 4D) phosphorylation only in CC groups, whereas the other groups displayed a clear hypothalamic leptin-resistance (Fig. 4).

Experiment 2

Females and pups until weaning. The experiment 2 was performed in order to study the impact of high fat diet (HF) during pregnancy and lactation on offspring when switched to a high palatable diet (P) at the adulthood. The measurement of food intake twice a week before mating (14 cages of 2 rats per group) indicated that dams fed the high fat diet daily ingested less food than control dams fed the chow diet (12.6 ± 0.2 vs 18.2 ± 0.2 g/rat, $p < 0.0001$), which however provided more energy (71.9 ± 1.1 kcal/day vs 67.4 ± 0.7 kcal/day, $p < 0.002$) due to the high caloric density of the HF diet. After 7 weeks, the body weight of HF females (301 ± 5 g, $n = 28$) did not significantly exceed that of C dams (291 ± 3 , $n = 28$) before mating, as observed before delivery (467 ± 9 , $n = 21$ and 455 ± 6 g, $n = 25$, respectively) and just after, since the body weight fall was similar in the two groups (98 ± 4 and 102 ± 5 g, respectively). All lactating HF dams then

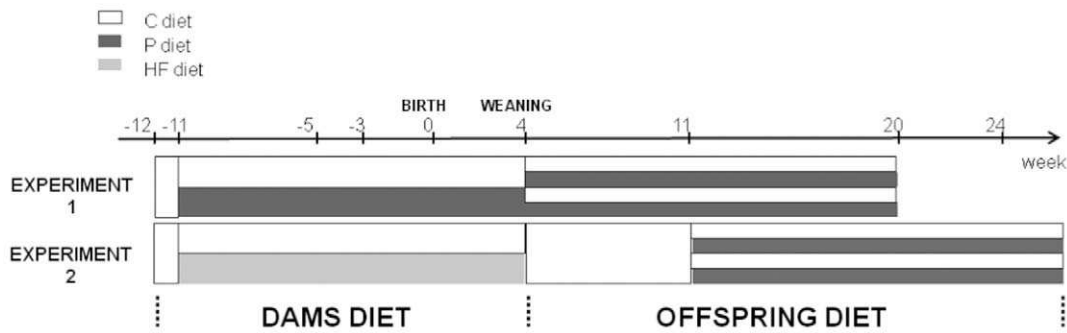


Figure 1. Model depicting the experimental protocol for experiment 1 and experiment 2. C, P and HF diets correspond to Chow, High palatable diet and High Fat diet, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0018043.g001

became gradually thinner and their body weight at weaning was markedly lower than that of control dams (319 ± 7 g, $n = 21$ versus 351 ± 5 g, $n = 25$, $p < 0.0001$). This pattern is illustrated in Figure 5 for HF and C dams. The proportion of HF females which become pregnant was smaller than in the control group (23 vs 28 out of 28 females per group) as was the litter size at birth ($n = 11.2 \pm 0.6$ vs $n = 13.1 \pm 0.7$, $p < 0.05$). Regardless of gender, the mean birthweight of pups issued from HF dams was lower than that of pups issued from C dams (6.15 ± 0.04 g, $n = 227$ vs 6.77 ± 0.07 g, $n = 286$, $p < 0.0001$) and the male/female ratio was similar in the 2 groups (1.14 and 1.03, respectively).

The maternal diet markedly influenced the weaning body weight of pups, which was dramatically lower in males (53.4 ± 1.8 g, $n = 48$) and females (50.2 ± 2.0 g, $n = 48$) born to HF dams compared to those born to control dams (77.4 ± 1.6 , $n = 41$ and 73.0 ± 1.0 , $n = 42$, $p < 0.0001$, respectively). The observations were continued on pups issued from 19 litters from HF dams and 23 from C dams.

Adult offspring born to HF or C dams. • **After 7 weeks feeding the chow diet since weaning.** The body weight measured after 7 post-weaning weeks on the chow diet is presented in Table 3 for the 4 groups of adult offspring. The effect of the maternal HF or C diet persisted in the two genders: the growth retardation of pups issued from HF dams, which averaged 32% of body weight at weaning, was partially caught up and represented about 17% in male and 12% in female pups. The absolute body weight gain was identical in the two groups of females regardless the maternal diet, while males born to HF dams grew relatively more slowly than those born to C dams. Taking into account the classical sexual dimorphism in the body growth in the rat species, results were then analyzed separately for each gender (table 3).

• **Challenged for the highly palatable P diet or maintained on the control C diet.** As shown in Figure 6, switching from C diet to the P diet for additional 3 months markedly increased the

body weight for both genders but regardless the diet, rats born to HF dams still displayed a lower final body weight than their counterparts born to control dams (Fig. 6). The effect of the maternal diet was also observed for the corpulence index (Table 4) which was similar in offspring born to C dams and fed the C diet and those born to HF dams and fed the P diet. The maternal diet did not influence the absolute weight gain (measured between week 7 and the end of the experiment and corresponding to the switch to P diet) of males under the C or P diet (Fig. 6), while females issued from HF dams gained significantly less body weight, under the P diet as compared to those issued from C dams (Fig. 6).

Compared to the C diet, the P diet increased plasma TG, insulin and leptin levels in both genders, and glucose only in males. In both genders and for each diet, plasma TG levels were lower in rats born to HF dams than in those born to C dams. Similar variations were observed for leptin levels, which appeared to be more influenced by the maternal diet than insulin levels. Plasma leptin levels were lower in female born to HF dams and fed P diet compared to those born to C dams and fed P diet. In females but not in males, cholesterol varied in parallel with TG, with higher values under the P diet (Table 4).

Body weight (g)

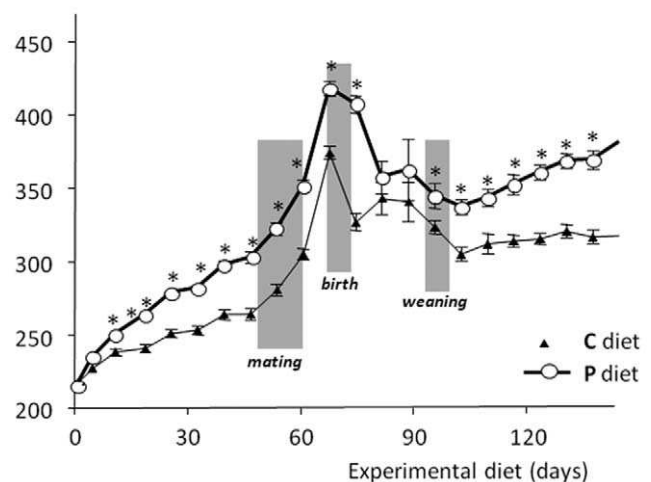


Figure 2. Evolution of the body weight of dams fed the control (C) diet (n=16) or highly palatable diet (P) (n=16) for 6 wk before mating, throughout gestation and lactation (28 days) and until the postweaning period (*p<0.05).
doi:10.1371/journal.pone.0018043.g002

Table 1. Energy content of the commercial chow diet (C) and the semi-purified highly palatable (P) and high-fat (H) diets.

Energy (kcal %) derived from	C	P	H
Carbohydrates	66.2	70	22.6
Proteins	22.7	14.6	12.9
Lipids	11.1	15.4	64.5
Energy content (kcal/100 g of dry diet)	370.1	392.6	571.9

doi:10.1371/journal.pone.0018043.t001

Table 2. Physiological parameters measured in fasted and fed male rats (age: 11 weeks) from 4 experimental groups named according to the post-weaning and maternal chow or palatable diet (C or P as 1st and 2nd letter, respectively).

Group	CC	CP	PC	PP
Daily energy intake (Kcal/day)	87.2±1.3 ^a	83.2±4.5 ^a	99.1±1.9 ^b	88.4±2.5 ^a
(n)	(16)	(16)	(16)	(16)
Overnight Fasted				
(n)	(20)	(20)	(20)	(20)
Liver weight (g)	12.0±0.3 ^a	12.0±0.4 ^a	14.3±0.3 ^b	13.9±0.3 ^b
%Body weight	2.32±0.05 ^{bc}	2.39±0.05 ^c	2.20±0.04 ^{ab}	2.10±0.04 ^a
Liver lipids (mg/g)	3.04±0.22	2.53±0.18	3.08±0.18	2.80±0.20
Plasma				
(n)	(20)	(20)	(20)	(20)
Glucose (g/L)	0.928±0.017	0.996±0.031	1.019±0.026	1.006±0.025
Insulin (ng/mL)	0.631±0.09 ^a	0.761±0.071 ^a	1.703±0.128 ^b	2.328±0.224 ^c
HOMA*	3.54±0.38 ^a	4.71±0.55 ^a	10.39±0.80 ^b	14.07±1.33 ^c
Leptin (ng/mL)	3.57±0.64 ^b	2.64±0.57 ^a	11.49±1.51 ^c	14.69±4.64 ^c
Triglycerides (g/L)	0.84±0.047 ^a	0.742±0.049 ^a	1.268±0.094 ^b	1.481±0.112 ^b
Cholesterol (g/L)	0.862±0.058 ^b	0.813±0.036 ^b	0.707±0.036 ^b	0.654±0.025

*calculated according to Tumer et al. (1993),

**subgroup of rats injected with physiological saline (n = 10). Different superscript letters ^{a,b,c} denote significant differences at p<0.05 by ANOVA and the Fisher posthoc test.

doi:10.1371/journal.pone.0018043.t002

Daily food intake was measured during 8 days, one month after the dietary challenge, and the daily energy intake was calculated, as shown in Table 5. Independently of their diet (C or P), the relative daily energy intake is significantly increased in males born to HF dams. In females born to HF dams relative daily energy intake was reduced when fed control diet, but when fed P diet

offspring born to HF or C dams exhibited similar relative energy intake (Table 5).

Impact on key genes involved on energy homeostasis. To evaluate the impact of maternal C or HF diet on the hypothalamic and hepatic gene expression levels of male and female offspring challenged with high palatable diet, we have

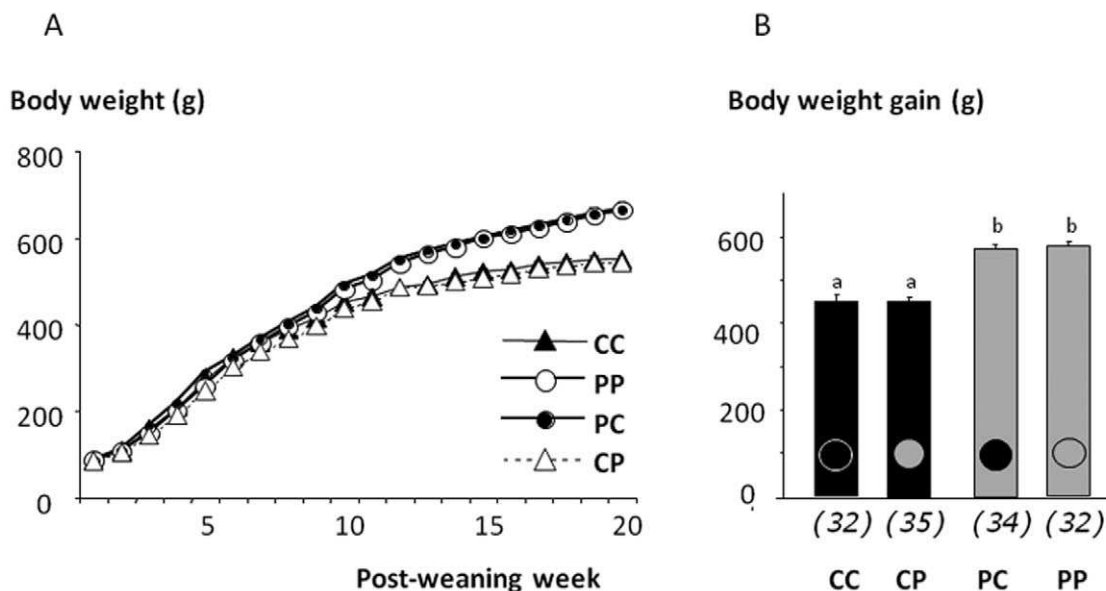


Figure 3. Impact of post weaning diet on the body weight of male pups born to dams fed the control diet (C) or highly palatable diet (P). At weaning four groups of male pups (CC, n = 32; CP, n = 35; PC, n = 34; PP, n = 32) were formed and named according to the post weaning diet (C or P, first letter) and to maternal diet (C or P, second letter) and their body weight and body weight gain were registered during 20 weeks after weaning. Body weight and final body weight gain are reported in panel 3A and 3B, respectively (*p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0018043.g003

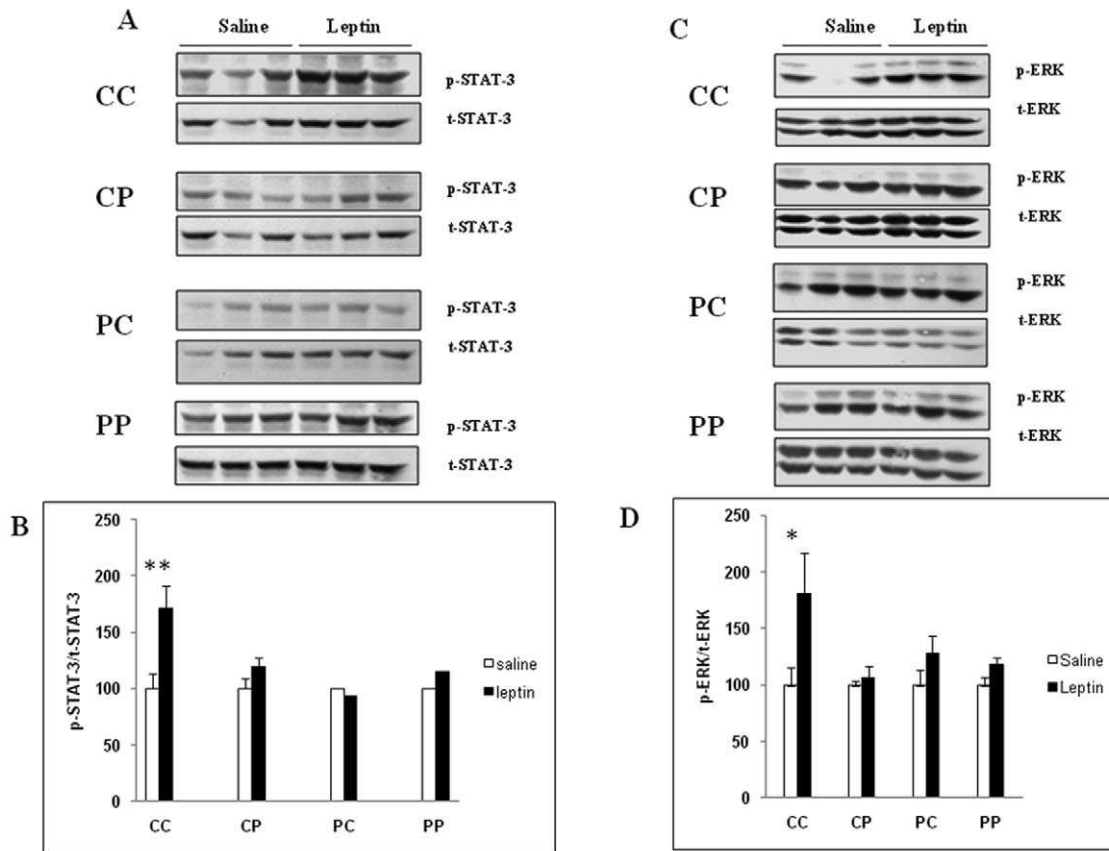


Figure 4. Phosphorylation of STAT-3 and ERK in the hypothalamus of male offspring born to dams fed the control diet (C) or highly palatable diet (P). At weaning four groups of male pups (CC, CP, PC, PP) were formed and named according to the post weaning diet (C or P, first letter) and to maternal diet (C or P, second letter). Each group contained 20 rats was divided into two sub-groups that received by IP either saline (n=10) or leptin (n=10). In each group, the sensitivity toward leptin was assessed by a significant elevation of the mean p-STAT-3/t-STAT-3 and p-ERK/t-ERK ratio in leptin-injected compared to saline-injected rats. Panel A and C show representative western-blot for total and phosphorylated STAT-3 and ERK, respectively. Panels B and D show the mean ratio band density of phosphorylated and total STAT-3 and ERK, respectively; (**p<0.005; * p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0018043.g004

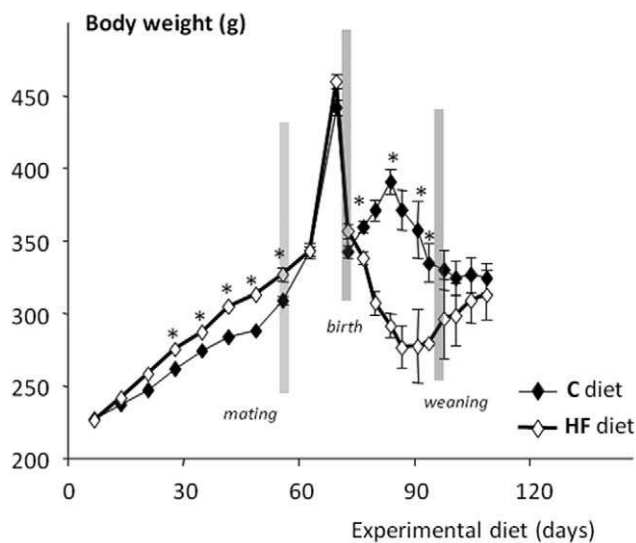


Figure 5. Evolution of the body weight of dams fed the control (C) diet (n=28) or high-fat diet (HF) (n=28) for 6 wk before mating, throughout gestation and lactation (28 days) and until the postweaning period (*p<0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0018043.g005

focused our interest on some key genes involved in the control of food intake, energy homeostasis or insulin-sensitivity.

In male offspring, the hypothalamic expression of UCP2, NPY and POMC was lower in PC group than in the other groups (Fig. 7). Moreover ObRb was clearly less expressed in PC and PH groups as compared to CC group, with a similar tendency for CH

Table 3. Body weights and post-weaning body weight gains of offspring born to dams fed the chow (C) or the high-fat (H) diet and fed the chow diet for 7 weeks since weaning.

Gender	Male		Female	
	Chow	High-fat	Chow	High-fat
Maternal Diet	MC	MH	FC	FH
Group	MC	MH	FC	FH
(n)	(42)	(48)	(40)	(48)
Body weight (g)	410±7 ^a	339±6 ^b	244±4 ^a	214±3 ^b
Post-weaning body weight gain (g)	332±7 ^a	288±5 ^b	171±4 ^a	167±3 ^a

Different superscript letters ^{a,b} denote significant differences at p<0.05 by ANOVA and the Fisher posthoc test.

doi:10.1371/journal.pone.0018043.t003

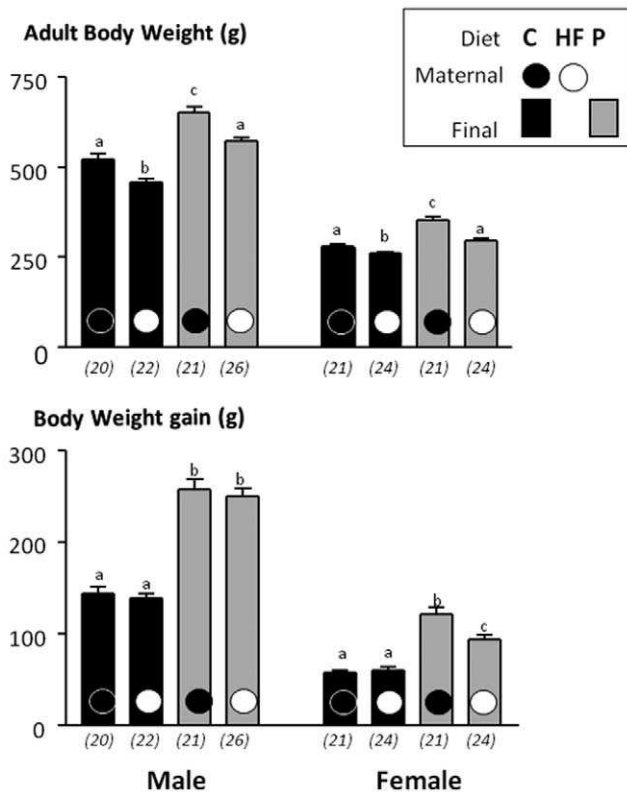


Figure 6. Impact of post weaning diet on the body weight of male and female pups born to dams fed the control diet (C) or high-fat diet (HF). At weaning offspring were divided into four groups of each gender (CC, CH, PC, PH; n from 20 to 26) and named according to the post weaning diet (C or P, first letter) and to maternal diet (C or H, second letter). From weaning to 7 weeks of age all groups were assigned to chow diet then switched to C or P diet for 13 additional weeks. Body weight and body weight gain are reported in panel A and B, respectively. Different superscript letters ^{a,b,c} denote significant differences at $p < 0.05$ by ANOVA and the Fisher posthoc test. doi:10.1371/journal.pone.0018043.g006

group (Fig. 7). In contrast, IR expression was not affected by dietary conditions (data not shown). We have also shown that POMC and AgRP expression were not affected by dams' diet by immunohistochemistry (Supporting Data, Fig S1). In the liver, the expression level of phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) was significantly increased in PH group as compared to the other groups (Fig. 8), and a similar effect was found for the expression of adiponectin receptors 1 and 2. Insulin receptor expression was significantly reduced in CH group as compared to the others.

In female offspring, hypothalamic expression of POMC and NPY was affected by maternal diet independently of offspring diet (fig. 9) and expression of *Obrb* was only increased in PC group whereas *UCP2* expression was not affected (fig. 9). In liver, no significant change was observed for PTP-1B, IR, AdipoR1 or AdipoR2 (data not shown).

Impact of a HF diet on the cytoarchitectonic organization of the hypothalamus

Since high fat diet given to dams seemed to deeply affect the offspring energy homeostasis, we hypothesized that this could be associated to changes in hypothalamic and more precisely in arcuate nucleus organization. The immunohistochemical detection in the ARC revealed that the maternal HF diet induced a

significant increase in the density of astrocytic processes around the blood vessels in males ($p < 0.05$) at weaning whereas this alteration was not observed in females (fig. 10). This gender-specific modification was maintained until adulthood (data not shown). It is to notice that the maternal HF diet had no effect on the vascularisation or the global astrocyte coverage in the ARC, whatever the gender.

Discussion

The highly palatable P diet used in the present study has been initially presented as an alternative to the classical cafeteria diet to promote a massive obesity [27,28]. Thus the P diet induced a massive obesity in dams, which was persistent from before mating and throughout gestation and lactation as pups were reared in large litters. At weaning, pups born to P dams exhibited slight growth retardation as compared with those born to control dams. This observation might be surprising since stress is likely minimized in pups weaned on day 28 (instead of day 21), which progressively complete milk by the maternal solid food, as under natural conditions. For comparison with our previous study, dams fed the HF diet (60% energy as palm oil) only presented a slight overweight before mating, followed by a spectacular body weight loss during the lactation period [22] and weaning pups weighed 10% less than those of normally fed dams. Using a HF diet based also on vegetal oil, others reported that gestation/lactation alleviate some of the effect of HF feeding on body weight gain of dams compared to nonpregnant rats but at day 20, pups reared in small litters appeared heavier and fatter, and considered to be more predisposed to obesity [19].

Among the four groups of adult male rats born to C or P dams and weaned on the C or P diet, only the control CC group exhibited an increased phosphorylation level of both STAT3 and ERK1/2 in the hypothalamus in response to leptin challenge. It may be concluded that in the three other groups, a central leptin-resistance was either induced by the post-weaning P diet (PP and PC groups) and/or programmed by the maternal P diet (CP group). Interestingly, only rats fed the post-weaning P diet were overtly obese with classical associated traits of the metabolic syndrome, such as hyperglycemia, hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia and hyperleptinemia on fasting state. Those born to P dams and weaned on the balanced C diet (CP group) displayed a normal corpulence and their plasma parameters were quite similar to those of control rats, as reflected by normal body composition. Thus, the defective central leptin signaling, inherited by the offspring of obese dams, is quiescent in these animals which display no tendency to become overweight even after 5 post-weaning months on the control diet. The physiological significance of this observation is not yet understood. Unexpectedly, the degree of obesity induced by the post-weaning P diet was not exacerbated in offspring born to obese dams and plasma parameters were similar in both groups of leptin-resistant rats, except higher insulin and HOMA values and lower cholesterol level, in the PP than in the PC group. It is to note that the food efficiency of the highly palatable P diet was higher in the PP than in the PC group, suggesting that the maternal P diet programmed a "thrifty" phenotype which tended to minimize the degree of diet-induced obesity in the offspring, as a predictive adaptive response to the obesogenic diet [23]. In the same way, the inherited "spendrift" phenotype observed in offspring born to HF dams, when maintained on the same HF diet, probably accounts for their unexpected resistance to the HF diet [22]. In order to verify whether a maternal HF diet protects offspring from developing obesity and metabolic/endocrine alterations, adult offsprings born

Table 4. Corpulence and plasma parameters measured in male and females offspring of dams fed the control or high-fat diet (C or H as 3rd letter) after feeding the control or highly palatable diet (C or P as 2nd letter) for three months.

<i>Males</i>	<i>MCC</i>	<i>MCH</i>	<i>MPC</i>	<i>MPH</i>
<i>(n)</i>	<i>(20)</i>	<i>(22)</i>	<i>(21)</i>	<i>(26)</i>
Body weight (g)	524±13 ^b	458±11 ^a	653±17 ^d	573±11 ^c
Naso-anal length (cm)	25.67±0.18 ^b	24.82±0.16 ^a	26.79±0.25 ^c	26.27±0.17 ^c
Corpulence index*	0.83±0.02 ^b	0.77±0.02 ^a	0.94±0.02 ^c	0.86±0.01 ^b
Body weight gain (g)	144±7 ^a	139±5 ^a	259±11 ^b	251±10 ^b
Plasma glucose (g/L)	0.93±0.01 ^a	0.95±0.01 ^a	1.01±0.02 ^b	1.00±0.02 ^b
Plasma insulin (ng/mL)	0.44±0.04 ^a	0.36±0.05 ^a	1.24±0.12 ^b	1.16±0.10 ^b
Plasma leptin (ng/mL)	3.55±0.48 ^b	2.98±0.45 ^a	12.61±0.84 ^c	12.80±1.46 ^c
Plasma Triglycerides (g/L)	0.89±0.07 ^b	0.73±0.05 ^a	1.83±0.13 ^c	1.28±0.12 ^b
Plasma Cholesterol (g/L)	0.63±0.03	0.55±0.02	0.60±0.04	0.56±0.02
<i>Females</i>	<i>FCC</i>	<i>FCH</i>	<i>FPC</i>	<i>FPH</i>
<i>(n)</i>	<i>(21)</i>	<i>(24)</i>	<i>(21)</i>	<i>(24)</i>
Body weight (g)	280±6 ^{ab}	260±6 ^a	353±10 ^c	295±7 ^b
Naso-anal length (cm)	21.2±0.2 ^a	21.1±0.2 ^a	22.1±0.2 ^b	21.3±0.2 ^a
Corpulence index*	0.66±0.02 ^{ab}	0.62±0.01 ^a	0.75±0.02 ^c	0.68±0.01 ^b
Body weight gain (g)	58±2 ^a	61±3 ^a	121±8 ^c	94±2 ^b
Plasma glucose (g/L)	0.90±0.01	0.95±0.02	0.94±0.01	0.94±0.01
Plasma insulin (ng/mL)	0.23±0.02 ^a	0.26±0.02 ^a	0.53±0.06 ^b	0.53±0.05 ^b
Plasma leptin (ng/mL)	1.93±0.22 ^b	1.68±0.21 ^a	6.47±0.78 ^d	5.22±0.52 ^c
Plasma Triglycerides (g/L)	0.46±0.02 ^b	0.41±0.02 ^a	0.78±0.07 ^d	0.55±0.03 ^c
Plasma Cholesterol (g/L)	0.67±0.03 ^a	0.66±0.02 ^a	0.76±0.05 ^b	0.74±0.03 ^b

Different superscript letters ^{a,b,c,d} denote significant differences at $p < 0.05$ by ANOVA and the Fisher posthoc test.
doi:10.1371/journal.pone.0018043.t004

to HF or control dams and weaned on a chow diet were submitted thereafter to the obesogenic P diet. In both genders, offspring born to HF dams and fed the C or P diet exhibited lower body weight as compared to their counterparts born to control dam. Thus, the maternal HF diet clearly affects body weight gain of pups, which confirms our previous data [22]. In addition, but only in males, the daily energy intake was higher for PH and CH groups than for PC

and CC groups, respectively. This suggests that male offspring of HF dams exhibited higher energy expenditure which may account for their lower body weight and corpulence index. In both gender, the P diet given in adulthood clearly increased the plasma leptin levels which reached the same final value in PC and PH groups, regardless the maternal diet. In females, plasma leptin was lower in PH group than in PC group, likely in relation with the difference

Table 5. Daily energy intake (calculated by animal and by 100 g body weight) in male and female 16 week-old rats (2 or 3 by cage), after 4 weeks feeding the palatable P diet or maintained on the chow C diet since weaning (P or C, respectively as 2nd letter), according to the maternal chow or high-fat diet (C or H, respectively as 3rd letter).

<i>Male rats</i>	<i>MCC</i>	<i>MCH</i>	<i>MPC</i>	<i>MPH</i>
<i>(n)</i>	<i>(21)</i>	<i>(21)</i>	<i>(22)</i>	<i>(29)</i>
Body weights (g)	483±12 ^b	417±11 ^a	546±15 ^c	459±9 ^{ab}
Daily energy intake (kcal/rat)	88.5±2.7 ^a	86.7±3.1 ^a	101.7±2.6 ^b	95±2.2 ^b
Relative daily energy intake (kcal/100 g body weight)	18.7±0.4 ^a	20.9±0.4 ^b	17.9±0.7 ^a	20.4±0.5 ^b
<i>Female rats</i>	<i>FCC</i>	<i>FCH</i>	<i>FPC</i>	<i>FPH</i>
<i>(n)</i>	<i>(18)</i>	<i>(24)</i>	<i>(18)</i>	<i>(29)</i>
Body weights (g)	266±6 ^a	248±4 ^a	317±10 ^b	265±5 ^a
Daily energy intake (kcal/rat)	66.1±1.6 ^{ab}	60.4±2.0 ^a	67.7±2.3 ^b	61.4±1.2 ^b
Relative daily energy intake (kcal/100 g body weight)	24.7±0.7 ^b	24.0±0.5 ^b	21.6±1.1 ^a	22.9±0.6 ^{ab}

Different superscript letters ^{a,b} denote significant differences at $p < 0.05$ by ANOVA and the Fisher posthoc test.
doi:10.1371/journal.pone.0018043.t005

Hypothalamus male

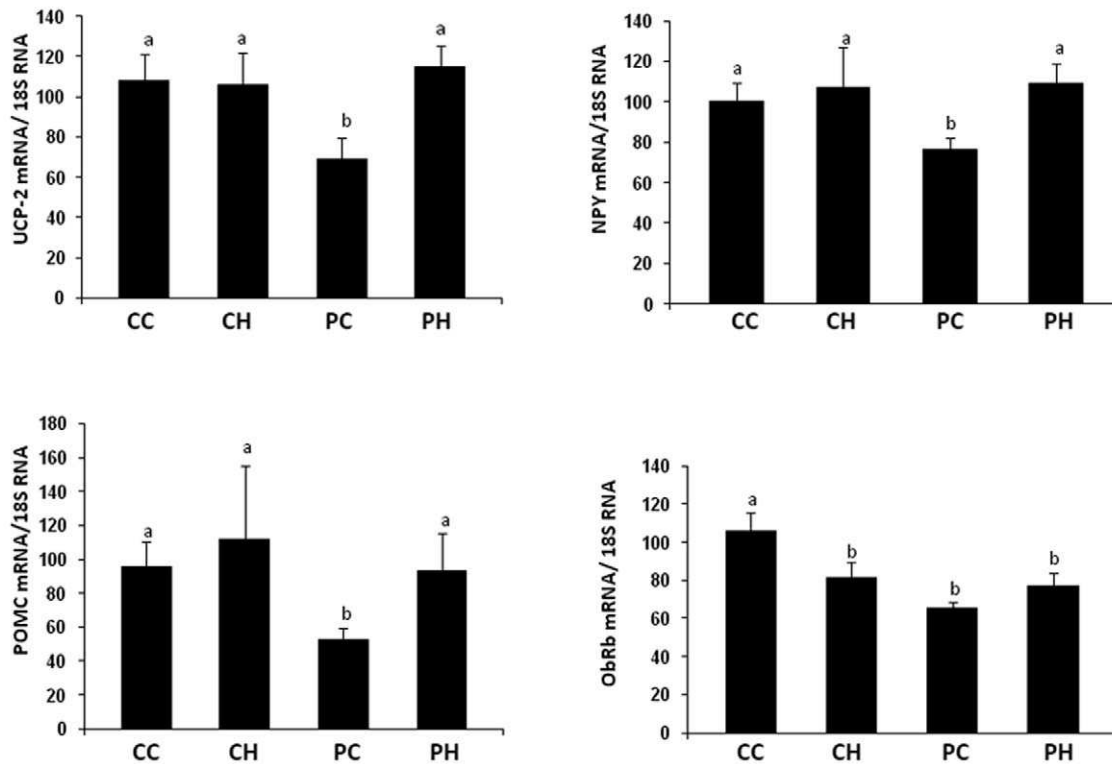


Figure 7. Impact of post weaning diet on hypothalamic gene expression of male pups born to dams fed the control diet (C) or high-fat diet (HF). At weaning offspring were divided into four groups of each gender (CC, CH, PC, PH; n = 10) and named according to the post weaning diet (C or P, first letter) and to maternal diet (C or H, second letter). From weaning to 7 weeks of age all groups were assigned to chow diet then switched to C or P diet for 13 additional weeks. UCP-2, NPY, POMC and ObRb expression were measured by quantitative RT-PCR and results were normalized to 18S RNA. Different superscript letters ^{a,b} denote significant differences at $p < 0.05$ by ANOVA and the Fisher posthoc test. doi:10.1371/journal.pone.0018043.g007

in body weight gain between the two groups. Interestingly, in both genders, TG plasma levels were lower in PH than in PC group, reflecting a potential protective effect of the maternal HF diet against adverse effects of the P diet on offspring.

In an attempt to understand mechanisms underlying the potential protective action of maternal high fat diet, we have examined the hypothalamic and hepatic expression of key genes involved in energy homeostasis, and also the astrocyte organization in the hypothalamic ARC nuclei.

In male offspring, the hypothalamic expression level of UCP-2 was significantly reduced in PC group as compared to the other groups and specifically to PH group. Thus, the maternal HF diet contributed to maintain UCP-2 expression level in PH group similar to that of CC and CH groups and this may explain, at least partially, the lower body weight of this group as compared to PC group. It has been reported that mitochondrial respiration in the hypothalamus is dependent upon UCP-2 which is involved in POMC neurons plasticity and also in NPY/AgRP activation in the fasted state [29,30]. Thus the alteration of UCP-2 expression may affect energy homeostasis in PC group. Furthermore, UCP-2 has been described to protect hypothalamic cells from inflammation damage induced by TNF alpha [31]. This hypothesis is reinforced by the fact that both POMC and NPY expressions were affected in PC group as compared to PH group. The level of ObRb expression was affected in PC and PH as compared to CC group which may be associated to the higher circulating leptin levels.

Interestingly, in male offspring liver, PH group exhibited a higher expression level of Adiponectin receptors R1/R2 as compared to the other groups. AdipoR2 in liver is associated to increased fatty acid β oxidation and reduction of circulating TG [32], this is in good agreement with our data where body weight was lower and relative daily energy intake was higher in PH group as compared to PC group. Furthermore, the TG plasma level is lower in PH group as compared to PC and this could result, at least partially, from the overexpression of liver AdipoR1/R2 in PH group.

These results contrast with those obtained in females, where hypothalamic UCP-2 expression levels were similar in all studied groups whereas maternal HF diet seemed to affect NPY and POMC expression levels in CH and PH groups. In liver, all studied genes were not affected in females (data not shown). This suggests that HF diet given to dams protects male and female offspring, from adverse effects of high palatable diet at least at the level of corpulence index and metabolic markers such as reduced TG, through probably gender-dependent mechanisms. This hypothesis is reinforced by the fact that the maternal HF diet induced a significant increase in the arcuate nucleus density of astrocytic processes around the blood vessels in males but not in females at weaning. This gender-specific modification was maintained until adulthood. It is to notice that the maternal HF diet had no effect on the vascularisation or the global astrocyte coverage in the ARC, whatever the gender. This gender-dependent change in the astrocytic coverage is probably due to

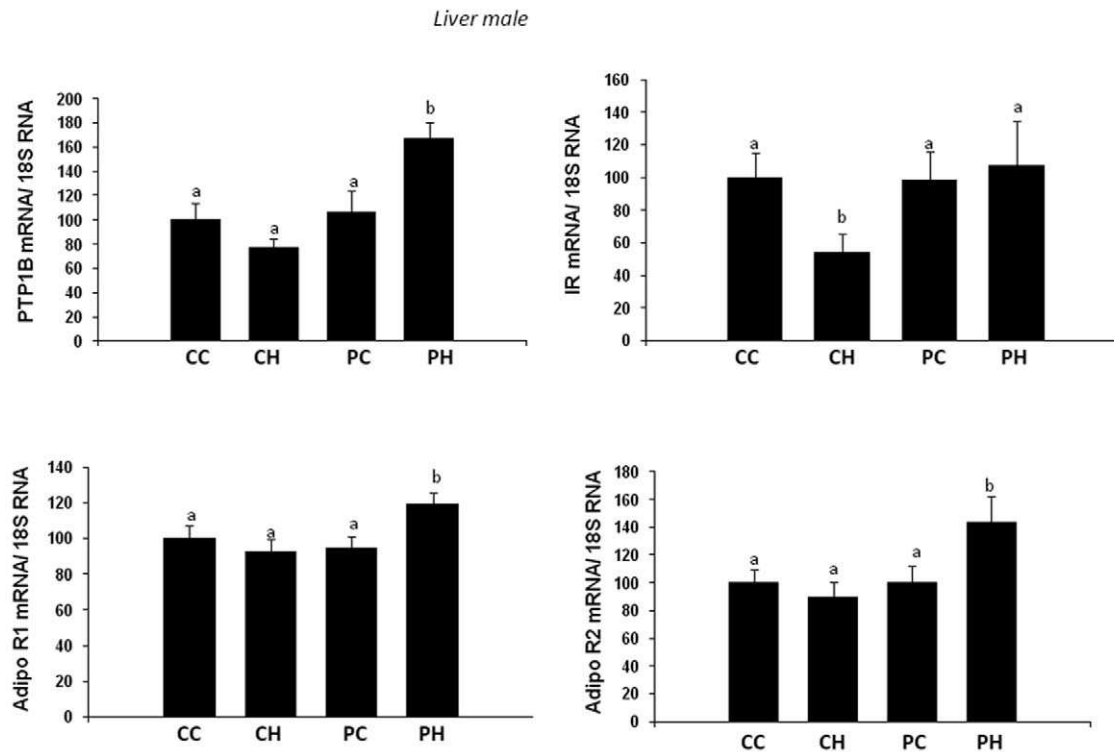


Figure 8. Impact of post weaning diet on hepatic gene expression of male pups born to dams fed the control diet (C) or high-fat diet (HF). At weaning offspring were divided into four groups of each gender (CC, CH, PC, PH; n = 10) and named according to the post weaning diet (C or P, first letter) and to maternal diet (C or H, second letter). From weaning to 7 weeks of age all groups were assigned to chow diet then switched to C or P diet for 13 additional weeks. UCP-2, NPY, POMC and ObRb expression were measured by quantitative RT-PCR and results were normalized to 18S RNA. Different superscript letters ^{a,b} denote significant differences at $p < 0.05$ by ANOVA and the Fisher posthoc test. doi:10.1371/journal.pone.0018043.g008

sexual dimorphism. Testosterone exposure has been shown to induce significant increase in stellation response in ARC astrocytes [33]. The sexual differentiation of astrocyte morphology has been also reported in other brain areas such as preoptic area where testosterone induced significant modifications in process length and number of astrocytes [34]. Thus, the increased density of astrocytes in male offspring of HF dams may contribute to the formation of synapses and their efficacy leading to establishment of synaptic patterning.

In female offspring of HF dams, the protective effect of maternal HF diet is most likely due to mechanisms that are not yet identified but it is noteworthy to take into account the reduced expression levels of NPY and POMC at the hypothalamic level in PH and CH female groups as compared to PC and CC groups. Since NPY is an orexigenic neuropeptide this may at least partially explain the protective effect of maternal HF diet by limiting then food intake despite the challenge with the P diet leading to reduced body weight gain.

Taken together, our data show that offspring born to overtly obese dams fed a highly palatable P diet bore a defective leptin signaling in hypothalamus, which remained silencing in pups weaned on the chow diet, thus without impact on their predisposition to develop obesity, a situation observed in fructose-fed rats [35] and in our previous study using a HF diet based on palm oil [22].

Interestingly, when offspring born to dams fed P or H diet were compared (experiment 1 and 2), this clearly points out the protective effect of HF diet given to dams. Because the offspring of HF diet dams are less exposed to body weight gain even when fed

palatable diet. The protective effect of maternal HF diet involves gender-dependent mechanisms.

Materials and Methods

Ethics statement

Rat studies were carried out in agreement with the French legislation on animal experimentation and with the authorization of the French Ministry of Agriculture (Animal Health and Protection Directorate).

Diets

The commercial chow diet (C, formula 113 from Safe, F-89290 Augy) contained 55.9% starch, 20% protein, 4.5% lipid and was used as ground (experiment 1) or pellets (experiment 2). The semi-solid highly palatable P diet (experiments 1 and 2) was custom-made in our laboratory according to the described formula (Holemans Ket al, 2004) using 33% ground commercial chow (Safe 113), 33% full fat sweetened condensed milk, 7% sucrose and 27% water. The semi-purified HF diet (experiment 2), adapted from Guo and Jen [19], contained palm oil as the main source of fat, as detailed [22]. The energy content and distribution (as carbohydrates, protein and lipids) are given in Table 1 for the 3 experimental diets. Concerning the highly palatable P diet, the accurate measurement of food and energy intake required a conversion factor between the weight of fresh semi-solid preparation and its equivalent weight after desiccation: the value of 0.66, for the dry/wet diet weight ratio, was obtained experimentally by dehydration of the P diet under vacuum. For

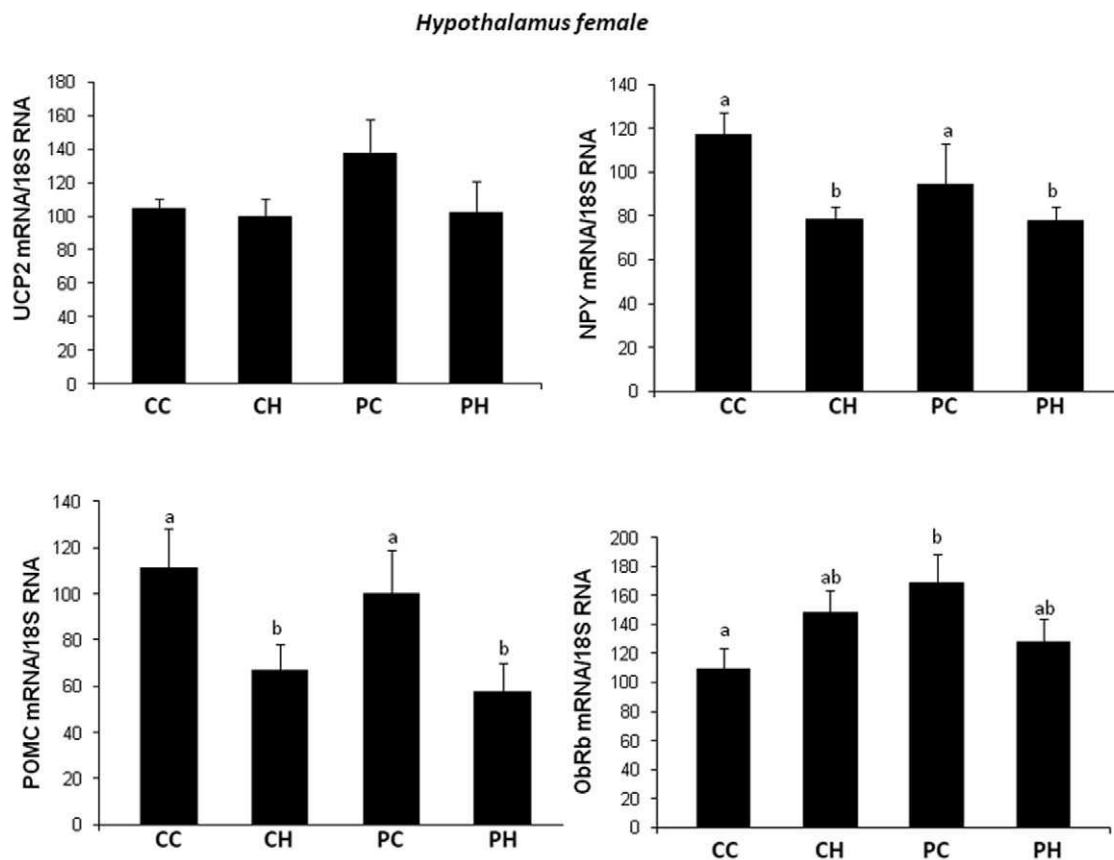


Figure 9. Impact of post weaning diet on hypothalamic gene expression of female pups born to dams fed the control diet (C) or high-fat diet (HF). At weaning offspring were divided into four groups of each gender (CC, CH, PC, PH; $n = 10$) and named according to the post weaning diet (C or P, first letter) and to maternal diet (C or H, second letter). From weaning to 7 weeks of age all groups were assigned to chow diet then switched to C or P diet for 13 additional weeks. UCP-2, NPY, POMC and ObRb expression were measured by quantitative RT-PCR and results were normalized to 18S RNA. Different superscript letters ^{a,b} denote significant differences at $p < 0.05$ by ANOVA and the Fisher posthoc test. doi:10.1371/journal.pone.0018043.g009

all the diets, and especially the ground chow diet, food intakes were calculated after subtracting the amount of spilled food, estimated by sifting the litters.

Care and maintenance of animals

Wistar rats were purchased from CER Janvier (Le Genest-St-Isle, France) and maintained under controlled temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), with a 12–12 h light-dark cycle (light on: 8:00 am) with food and water provided *ad libitum*. The studies were carried out in agreement with the French legislation on animal experimentation and with the authorization of the French Ministry of Agriculture (Animal Health and Protection Directorate).

Experiment 1. Thirty-two females and 8 males (aged 8-weeks) were housed by 4 in collective cages and given commercial pellets for one week for adaptation. Two groups of 16 females were then formed according to the C (powdered Safe 113) or P (highly palatable semi-solid preparation) diet given until the end of the lactation period, and males received commercial pellets (Safe 113) (Fig. 1). After 6 weeks, one male was introduced in each cage of females for mating in harem and males were permuted every two days for 14 consecutive days. Timing of delivery, litter size and weight were recorded at birth. Litters were adjusted to 10–11 pups for each dam while maintaining sex ratio as close to 1:1 as possible. The whole litter weight was checked weekly and the individual body weight of pups was registered at weaning, when aged 28 days. Four groups of 25–26 male pups each were formed and

named according to the post-weaning diet (C or P as first letter for control or palatable diet, respectively) and maternal diet (C or P as 2nd letter). Rats were caged by 2 and allowed to free access to food and water. Body weights of dams and pups were measured twice a week. Food intake was monitored during the last 4 weeks before mating for dams, and during 4 weeks in the post-weaning period for pups. After 20 weeks on the C or P diet, adult offspring (age: 6 months) were sacrificed (between 9 and 11 a.m.), either in a postprandial state (4 groups), or after overnight food deprivation and 30 min after intraperitoneal injection of recombinant rat leptin (1 mg/kg) or physiological saline. Blood was collected on heparin (10 IU/mL) and tissues (hypothalamus and liver) were quickly removed. The hypothalamus was immediately frozen into liquid nitrogen and the liver was weighed.

Experiment 2. Fifty-six old females and 16 males (aged 8-weeks) were caged by 2 and given commercial pellets (Safe 113) for one week of adaptation. Females were randomized into 2 groups ($n = 28$) according to the control pellet C diet (Safe 113) or the hypercaloric HF diet provided *ad libitum* for 6 weeks before mating and throughout gestation and lactation. Litters were adjusted to 10–12 pups at birth. Pups were randomized into four groups, according to gender and maternal C or high-fat (H) At weaning when aged 26 ± 1 days, all were assigned to the chow diet for 7 weeks, then in each group, half of the animals were switched to the obesogenic P diet for 13 additional weeks, while the others were maintained on the chow diet. The 8 groups were named according

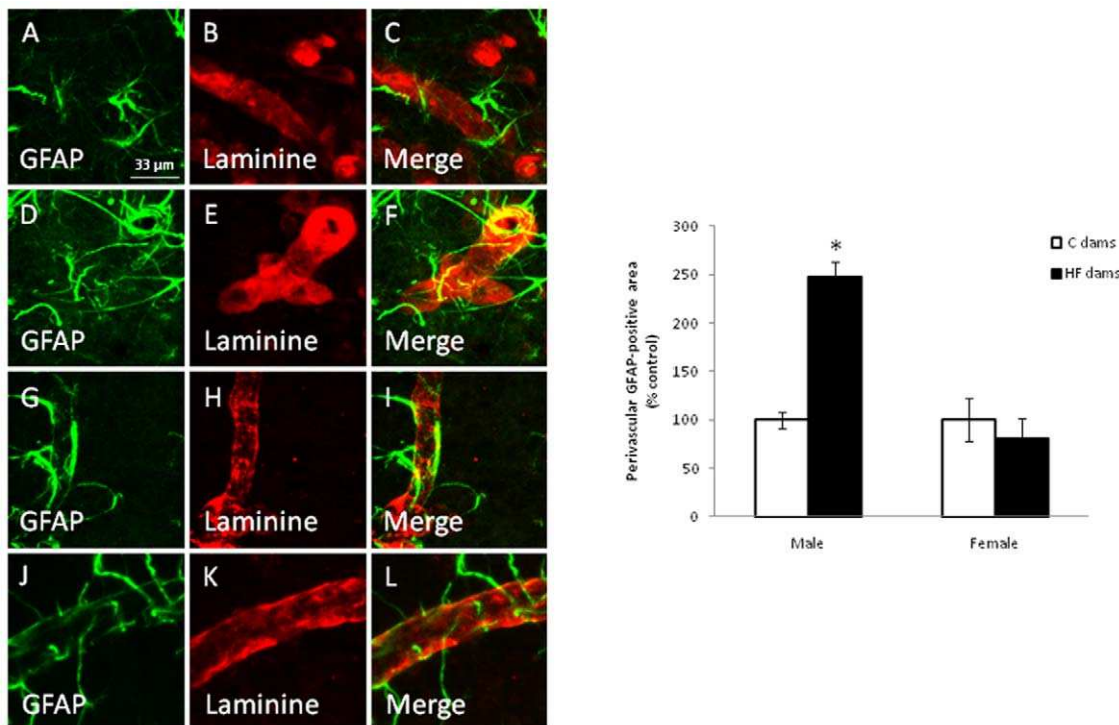


Figure 10. Co-detection of a glial marker (GFAP) and an endothelial marker (laminin) in male (A–F) and female (G–L) offspring born to dams fed a control (A–C ; G–I) or a high-fat (D–F ; J–L) diet in the arcuate nucleus (ARC) at weaning. Maternal HF diet significantly increases the density of astrocytic processes around the blood vessels in males ($p < 0.05$) but not in females (D–F, M). Scale bars = 33 μm . doi:10.1371/journal.pone.0018043.g010

to gender (M or F as 1st letter), final diet (C or P as 2nd letter) and maternal diet (C or H as 3rd letter) (Fig. 1). The body weight evolution of rats was registered every week and daily food and energy intakes assessed during the diet challenge. The animals were sacrificed when aged 6 months, after an overnight food deprivation. By analogy with the body mass index (BMI) in humans, a corpulence index (expressed in g/cm^2) was calculated from the body weight (g) and the naso-anal length (cm). Blood, liver and hypothalamus were removed as above.

Biochemical analyses

Recombinant rat leptin was produced as previously described [36]. Phospho-STAT-3 (Tyr705), STAT-3, phospho-ERK and ERK antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA). Secondary antibodies (from mouse and rabbit) conjugated to peroxidase were purchased from Sigma-Aldrich (Missouri, USA). Other chemicals were generally purchased from Sigma-Aldrich (France).

Plasma glucose, cholesterol and triglyceride levels were measured by enzymatic procedures using commercial kits (Elitech, Salon de Provence, France), by means of an automatic analyzer (Abbott VP, Rungis, France). Insulin and leptin were assayed by radioimmunoassay using commercial diagnostic kits (Linco Research, St. Louis, MO, USA). The homeostatic model assessment for insulin resistance was calculated from insulin and glucose concentrations [37].

Western blot analysis

Samples were prepared as previously described [38]. Briefly, frozen hypothalami were homogenized in lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA,

0.5% nonidet-P40, 1% Triton X-100, protease inhibitor cocktail (0.35 mg/ml PMSF, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin) and phosphatase inhibitor cocktail (10 mM sodium fluoride, 1 mM sodium orthovanadate, 20 mM sodium b-glycerophosphate, 10 mM benzamide). After lysis in ice for 90 min, insoluble materials were removed by centrifugation (15,000 rpm at 4°C for 45 min) and protein concentrations of the resulting lysates were determined using a protein assay kit (Pierce, Perbio Science, France). Proteins (50 μg) were subjected to SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Blots were blocked with 5% non-fat milk and then incubated in the presence of appropriate primary and secondary antibodies. Following nitrocellulose membrane washing, targeted proteins were revealed using enhanced chemiluminescence reagents (ECL, Amersham Life Science, France). The intensity of bands was determined using Molecular Imaging apparatus (Vilber Lourmat, France) and BIO-1D software.

Quantitative RT-PCR

Total RNA from hypothalamus and liver was extracted using Trizol (Invitrogen, France) according to manufacturer's recommendations. 1 μg of total denatured RNA was reverse transcribed, and the resulting cDNAs were submitted to quantitative PCR. The PCR primer sequences used were as follows, UCP-2 forward: 5'TGGCGGTGGTTCGGAGATAC3', reverse: 5'GGCAAGG-GAGGTCGTCTGTC3'; NPY forward 5'ATGCTAGGTAA-CAAACG3', reverse 5'ATGTAGTGTTCGCAGAG3'; POMC forward: 5'AGGTTAAGGAGCAGTGAC3', reverse: 5'CGT-CTATGGAGGTCTGAAGC3'; LEPRb forward 5' ACCACA-TACCTCCTCACACTA 3', reverse 5' AGCAGTCCAGCCTA-CACTCTT 3'; AdipoR1 forward 5'GCTGGCCTTTATGC-TGCTCG3', reverse 5' TCTAGGCCGTAAACGGAATTC3';

AdipoR2 forward 5' ATAGGGCAGATAGGCTGGTTGA3', reverse 5'GGATCCGGGCAGCATACA3'; 18S forward 5'TC-CCCGAGAAGTTTCAGCACAT3', reverse 5'CTTCCCAT-CCTTCACGTCTTC3'. Real-time PCR was carried out using the Step One apparatus (Applied Biosystems, USA) and the Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA). A ratio of specific mRNA/18S amplification was calculated, to correct for any difference in efficiency at RT.

Immunohistochemistry

One-month old male (n = 10) and female (n = 6) rats born to C or HF dams were used for the immunohistochemical detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and laminin in the ARC. After deep anesthesia with a ketamin (75 mg/kg) and domitor (0,5 mg/kg) cocktail, animals were perfused with 100 mL of phosphate buffered saline (PBS) 1 × pH 7.4, followed by 500 mL of 4% paraformaldehyde in PBS 1X. Brain sections (50-µm thick) were cut with a microtome (HM 650V, Thermo Scientific Microm, Walldorf, Germany) before being incubated with a monoclonal mouse anti-GFAP antibody (1:1000, Sigma) and a rabbit polyclonal anti-laminin antibody (7:1000, Sigma) for 12 h at 4°C. Primary antibodies were then visualized with a donkey anti-rabbit IgG coupled to FluoProbes-488 (FP-488; Interchim, Montluçon, France) or a donkey anti-mouse coupled to cyanine-5 (Cy5; Jackson ImmunoResearch Laboratories; Suffolk, UK) antibodies (1:500). Immunofluorescence (IF) was examined under a confocal microscope (Zeiss LSM 510 system, Germany). Optical

sections were taken through the Z axis at 1 µm intervals and averaged four times. Quantification was performed with ImageJ 1.36b software (NIH, USA). Perivascular GFAP coverage was assessed by measuring the GFAP-positive fraction on blood vessels contours in whole bilateral ARC and after background subtraction. This operation was performed on six different vessels throughout six different sections homogeneously distributed through the ARC in each animal.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using (Stat View Software, ver.5) to detect significant intergroup differences. Values were expressed as means ± SE, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Supporting Information

Figure S1 Detection of α MSH (upper panel) and AgRp (lower panel) in male offspring rats born to dams fed a control (CC) or high-fat diet (HF) in the arcuate nucleus at weaning. (TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JF MT. Performed the experiments: OC JF DG CS DC AA C-MV AG MT. Analyzed the data: JF C-MV OC MT. Wrote the paper: JF MT.

References

- Cripps RL, Archer ZA, Mercer JG, Ozanne SE (2007) Early life programming of energy balance. *Biochem Soc Trans* 35: 1203–4.
- Hales CN, Barker DJ (2001) The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60: 5–20.
- Ikenasio-Thorpe BA, Brier BH, Vickers MH, Fraser M (2007) *J Endocrinol* 193: 31–37.
- Phillips DL, Jones A, Goulden PA (2006) Birth weight, stress, and the metabolic syndrome in adult life. *Ann N Y Acad Sci* 1083: 28–36.
- Harder T, Schellong K, Stupin J, Dudenhausen JW, Plagemann A (2007) Where is the evidence that low birthweight leads to obesity? *Lancet* 369: 1081–1082.
- Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD (2000) Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E83–E87.
- Stocker C, O'Dowd J, Morton NM, Wargent E, Sennitt MV, et al. (2004) Modulation of susceptibility to weight gain and insulin resistance in low birthweight rats by treatment of their mothers with leptin during pregnancy and lactation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 129–136.
- Stocker C, Wargent E, O'Dowd J, Cornick C, Speakman JR, et al. (2007) Prevention of diet-induced obesity and impaired glucose tolerance in rats following administration of leptin to their mothers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1810–R1818.
- Vickers MH, Gluckman PD, Coveny AH, Hofman PL, Cutfield WS, et al. (2005) Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinology* 146: 4211–4216.
- Bouret SG, Simerly RB (2007) Development of leptin-sensitive circuits. *J Neuroendocrinol* 19: 575–82.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, et al. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425–432.
- Nohr EA, Vaeth M, Baker JL, Sorensen TI, Olsen J, et al. (2009) Pregnancy outcomes related to gestational weight gain in women defined by their body mass index, parity, height, and smoking status. *Am J Clin Nutr* 90: 1288–1294.
- Lins MC, de Moura EG, Lisboa PC, Bonomo IT, Passos MC (2005) Effects of maternal leptin treatment during lactation on the body weight and leptin resistance of adult offspring. *Regul Pept* 127: 197–202.
- Davidowa H, Plagemann A (2007) Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport* 18: 521–524.
- Armitage JA, Poston L, Taylor PD (2008) Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. *Front Horm Res* 36: 73–84.
- Gallou-Kabani C, Junien C (2005) Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. *Diabetes* 54: 1899–1906.
- Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJ, et al. (2008) Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R528–R538.
- McMillen IC, Rattanatray L, Duffield JA, Morrison JL, MacLaughlin SM, et al. (2009) The early origins of later obesity: pathways and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 646: 71–81.
- Guo F, Jen KL (1995) High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* 57: 681–686.
- Levin BE (2006) Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1107–1121.
- Cripps RL, Archer ZA, Mercer JG, Ozanne SE (2007) Early life programming of energy balance. *Biochem Soc Trans* 35: 1203–1204.
- Ferezou-Viala J, Roy AF, Serougne C, Grippois D, Parquet M, et al. (2007) Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1056–R1062.
- Gluckman PD, Hanson MA (2004) Living the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 305: 1733–1736.
- Khan IY, Taylor PD, Dekou V, Seed PT, Lakasing L, et al. (2003) Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension* 41: 168–175.
- Khan I, Dekou V, Hanson M, Poston L, Taylor P (2004) Predictive adaptive responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. *Circulation* 110: 1097–1102.
- Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, et al. (2005) A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R127–133.
- Holemans K, Caluwaerts S, Poston L, Van Assche FA (2004) Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 190: 858–865.
- Atig L, Solomon G, Ferezou J, Abdennebi-Najar L, Taouis M, et al. (2008) Early postnatal blockade leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *Int J Obes (Lond)* 32: 1153–1160.
- Coppola A, Liu Z, Andrews Z, Paradis E, Roy MC, et al. (2007) A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* 5: 21–33.
- Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, et al. (2008) UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454: 846–851.
- Degasperi GR, Romanatto T, Denis RGP, Araujo EP, Moraes J, et al. (2008) UCP2 protects hypothalamic cells from TNF- α -induced damage. *FEBS Letters* 582: 3103–3110.
- Kadowaki T, Yamauchi T (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Reviews* 26: 439–451.
- Mong JA, Glaser E, McCarthy MM (1999) Gonadal steroids promote glial differentiation and alter neuronal morphology in the developing hypothalamus in regionally specific manner. *J Neuroscience* 19: 1464–1472.

34. Amateau SK, McCarthy MM (2002) Sexual differentiation of astrocytic morphology in the developing rat preoptic area. *J Neuroendocrinol* 14: 904–910.
35. Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, et al. (2008) Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain response to subsequent high fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1370–R1375.
36. Salomon G, Niv-Spector L, Gussakovsky EE, Gertler A (2006) Large scale preparation of biologically active mouse and rat leptons and their L39A/D40A/F41A mutants which act as potent antagonists. *Protein Expr Purif* 47: 128–136.
37. Turner RC, Levy JC, Rudesnki AS, Hammersley M, Page R (1993) Measurement of insulin resistance and beta-cell function: the HOMA and CIGMA approach. *Current topics in diabetes research* (eds) F. Belfiore, R. Bergman and G. Molinatti *Front Diabetes. Basel, Karger* 12: 66–75.
38. Benomar Y, Wetzler S, Larue-Achagiotis C, Djiane J, Tome D, et al. (2005) In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signaling in liver and hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol* 242: 59–66.

Principaux résultats

Le but de cette étude était d'évaluer l'impact d'un régime maternel hyperlipidique (régime HF) sur la prédisposition de la descendance à développer une obésité sous régime hypercalorique de haute palatabilité à l'âge adulte : le régime P. La figure p schématise les principaux résultats observés.

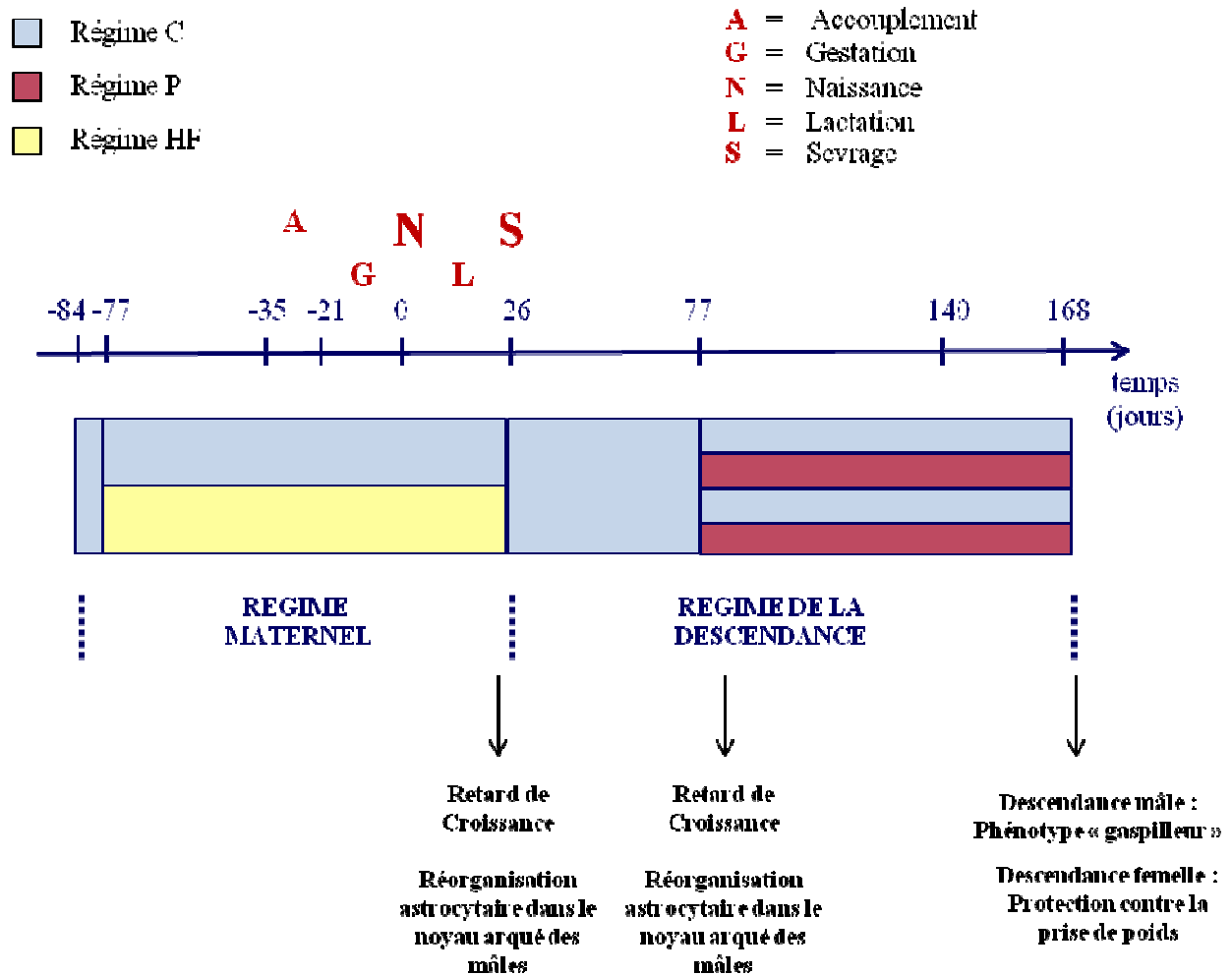


Figure 24 : résumé des principaux résultats de l'étude (Expérience 2)

Nous avons observé que le régime maternel HF induisait chez la descendance :

- un retard de croissance significatif au sevrage (32%) partiellement compensé mais toujours significatif à l'âge de 3 mois (12 à 17%)
- une protection de la descendance contre le régime P en terme de prise de poids

- une consommation énergétique plus importante chez la descendance mâle à poids corporel égal associées à des modifications d'expression génique de marqueurs de la dépense énergétique dans l'hypothalamus et le foie
- une réorganisation précoce et durable des prolongements astrocytaires autour des vaisseaux sanguins dans le noyau arqué de la descendance mâle

A l'issue de cette étude, nous pouvons conclure que le régime maternel HF n'a pas eu pour conséquence de prédisposer la descendance à développer une obésité à l'âge adulte et induirait des réponses différentes suivant le sexe ; protégeant majoritairement les femelles contre la prise de poids induite par le régime P à l'âge adulte et induisant chez les mâles l'acquisition d'un phénotype « gaspilleur » ainsi que des réorganisations astrocytaires importantes dans le noyau arqué de l'hypothalamus.

Ces dernières données nous ont amenés à nous intéresser à l'impact du régime maternel HF sur l'organisation cytoarchitectonique du noyau arqué. Les paramètres évalués sont présentés en résultats complémentaires.

Résultats complémentaires

Impact d'un régime maternel hyperlipidique postnatal sur l'organisation gliale dans le noyau arqué de la descendance adulte

Dans un 1^{er} temps, nous avons souhaité préciser la fenêtre d'acquisition des modifications développementales précédemment présentées. Dans ce but, les rates ont été nourries avec une alimentation standard pendant la période prénatale et soumises à une alimentation HF uniquement à partir de la naissance des petits, selon le protocole dit « court » (cf [Chapitre Procédures Expérimentales, Paragraphe 1.3.2. Modèle de programmation métabolique](#)). Le régime maternel HF induisant des réorganisations astrocytaires visibles dès le sevrage et conservées à l'âge adulte, nous nous sommes attachés à caractériser la glie dans le noyau arqué de ces animaux à 3 mois.

Organisation astrocytaire dans le noyau arqué

Le marquage de la laminine (en rouge), protéine de la matrice extracellulaire constitutive de la lame basale notamment sécrétée par les cellules endothéliales, nous a permis de délimiter les vaisseaux sanguins présents dans le noyau arqué (en rouge, Fig. 1A,D). Les astrocytes ont été mis en évidence par le marquage de la GFAP, protéine du cytosquelette des astrocytes matures marquant essentiellement les prolongements astrocytaires et, dans une moindre mesure les corps cellulaires (en vert, Fig. 1B,E).

Nous avons observé que la couverture astrocytaire globale, était significativement plus importante dans le noyau arqué des rats dont la mère avait reçu un régime HF (régime maternel C : 14,6% \pm 3,2 ; régime maternel HF : 32,3% \pm 3,6 ; $p < 0,05$). Les prolongements astrocytaires étaient par ailleurs réorganisés autour des vaisseaux sanguins (Fig. 1C,F). La surface endothéliale contactée par des prolongements astrocytaires, ou couverture astrocytaire périvasculaire, était en effet significativement plus que doublée chez les animaux dont la mère avait reçu un régime HF (régime maternel C : 20,8 % \pm 3,5; régime maternel HF : 49% \pm 4,6 ; $p < 0,05$).

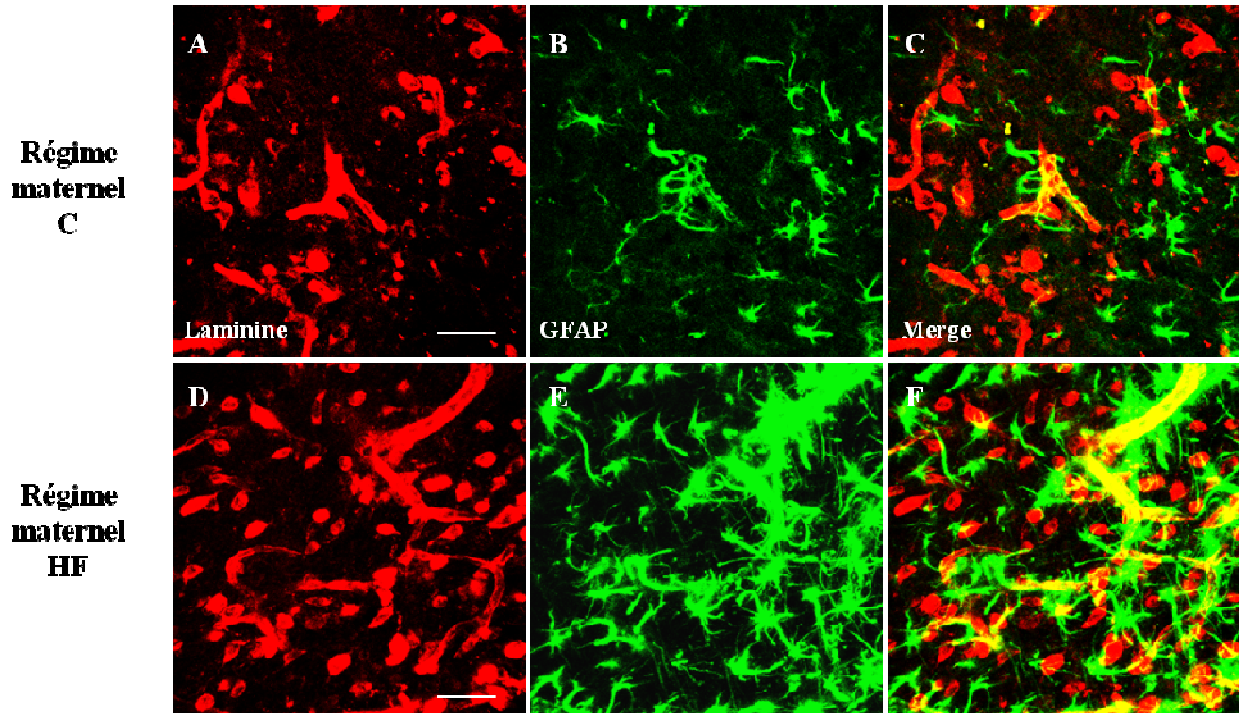


Figure 1 : Double-immunohistochimie fluorescente. Co-détection en microscopie confocale de la laminine (en rouge) et de la GFAP (en vert) dans le noyau arqué de rats issus de mère contrôle (A-C) ou HF (D-E). Le régime maternel HF induit une augmentation significative de la couverture astrocytaire périvasculaire chez la descendance. Superposition de 25 plans focaux. Barres d'échelle : 40 µm.

Le niveau de vascularisation a été testé entre les deux groupes par un marquage immunohistochimique de la lectine, glycoprotéine liant les carbohydrates présents à la surface des cellules endothéliales (Fig. 2A,B).

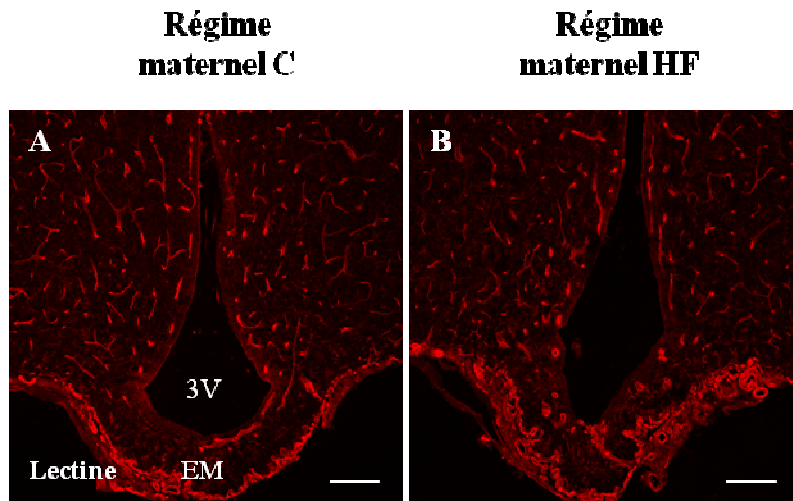


Figure 2 : Immunohistochimie fluorescente. Détection de la lectine en microscopie confocale chez des rats issus de mère contrôle (A) ou HF (B.) Le régime maternel HF n'induit pas de modification significative du niveau de vascularisation chez la descendance. Superposition de 28 plans focaux. Barres d'échelle : 70 µm.

La détection immunohistochimique de la protéine S100 β nous a permis de mettre en évidence les corps cellulaires des astrocytes et donc d'en estimer la densité dans le noyau arqué. Nous n'avons pas observé de différence significative du nombre de cellules S100 β -positives entre les deux groupes (Fig. 3A,B). En revanche, cet immunomarquage nous a permis de confirmer la réorganisation des prolongements astrocytaires autour des vaisseaux sanguins (Fig. 3B).

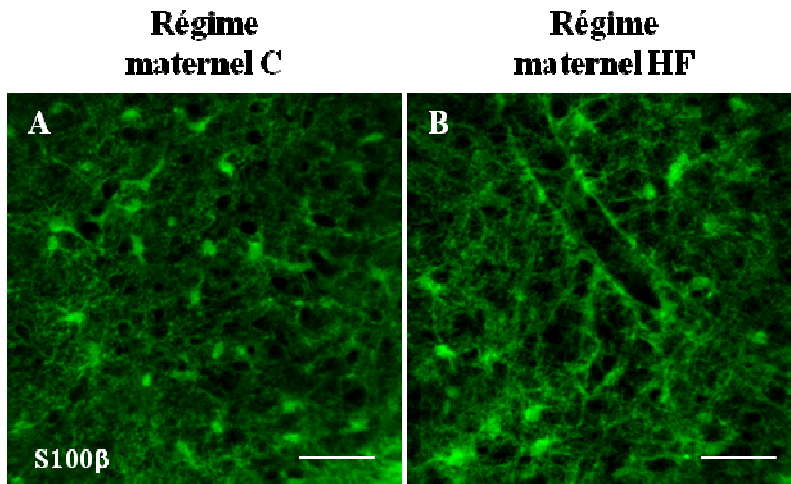


Figure 3 : Immunohistochimie fluorescente. Détection de la S100 β en microscopie confocale chez des rats issus de mère contrôle (A) ou HF (B.) Le régime maternel HF n'induit pas de modification significatives du nombre d'astrocytes chez la descendance. Superposition de 20 plans focaux. Barres d'échelle : 50 μ m.

Organisation tancytaire dans le noyau arqué

Les épendymocytes du noyau arqué, ou tancytes, ont été détectés par immunomarquage de la vimentine. Afin d'évaluer la surface occupée par les prolongements tancytaires, nous avons procédé de la même façon que pour le marquage GFAP.

Nous avons observé que les animaux dont la mère avait reçu une alimentation HF pendant la lactation présentaient une couverture tancytaire significativement plus importante que les animaux contrôles (Fig4. A,B ; régime maternel C : 5,4% \pm 0,6 ; régime maternel HF : 12,4% \pm 3,2 ; $p < 0,05$).

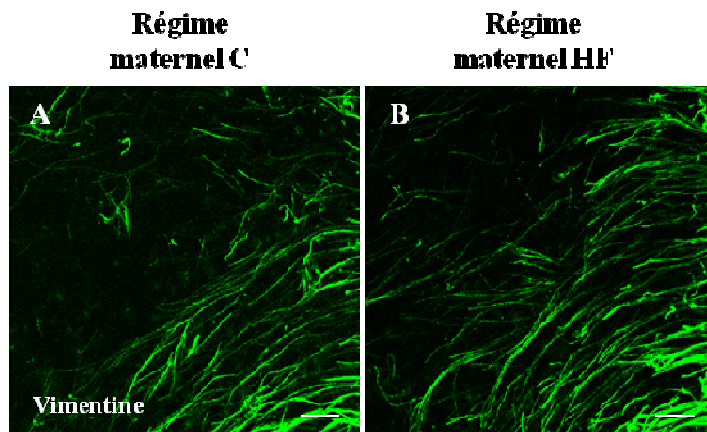


Figure 4 : Immunohistochimie fluorescente. Détection de la vimentine en microscopie confocale dans le noyau arqué de rats issus de mère contrôle (A) ou HF (B.) Le régime maternel HF induit une augmentation significative de la couverture tancytaire. Superposition de 16 plans focaux. Barres d'échelle : 40 μ m.

La surface Glut-1-positive, qui colocalise en grande partie avec le marquage vimentine-positif, était également significativement plus élevée chez ces animaux (Fig. 5A,B ; régime maternel C : $9,1\% \pm 0,6$; régime maternel HF : $13,4\% \pm 1,2$; $p < 0,05$).

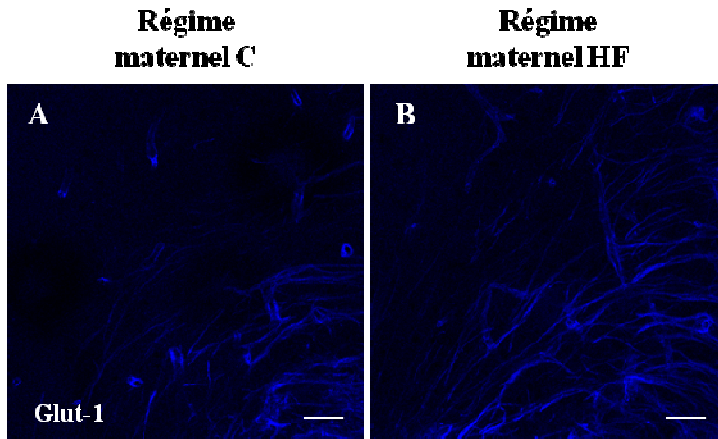


Figure 5 : Immunohistochimie fluorescente. Détection de Glut-1 par microscopie confocale dans le noyau arqué de rats issus de mère contrôle (A) ou HF (B.) Le régime maternel HF induit une augmentation de la surface Glut-1-positive. Superposition de 19 plans focaux. Barres d'échelle : 40 μ m.

Evaluation de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique

Les prolongements astrocytaires étant une composante clef dans la structure de la barrière hémato-encéphalique, nous nous sommes intéressés à la perméabilité de cette dernière chez les animaux présentant une réorganisation des prolongements GFAP-positifs et Glut-1 positifs. Pour évaluer l'intégrité de cette structure, nous avons mesuré l'absorption par le noyau arqué d'un colorant, le bleu trypan, injecté dans la circulation sanguine du rat. Nous avons ainsi observé que le régime maternel HF induisait une augmentation significative de l'intensité de fluorescence (en u.a) liée passage de bleu trypan du sang vers le noyau arqué chez la descendance (Fig. 6A,B : régime maternel C : $122,7 \pm 5,6$; régime maternel HF : $155,1 \pm 6,5$; $p \text{ value} < 0,05$).

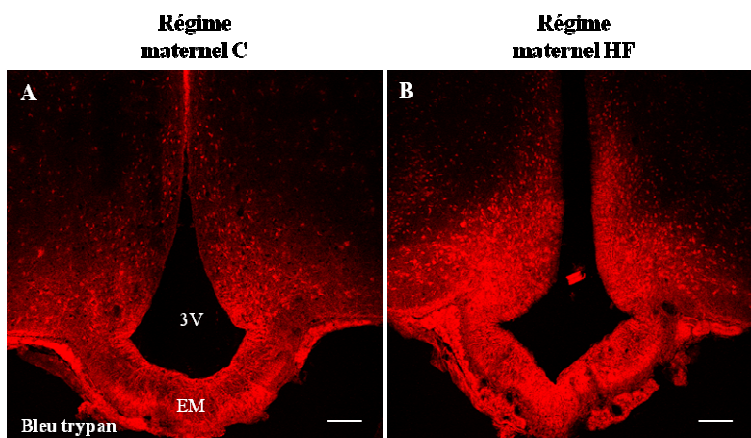


Figure 6 : Immunohistochimie fluorescente. Détection de la diffusion du bleu trypan en microscopie confocale dans le noyau arqué de rats issus de mère contrôle (A) ou HF(B). Le régime maternel HF est associé à une diffusion significativement plus importante de bleu trypan dans le noyau arqué de la descendance. Superposition de 25 plans focaux. Barres d'échelle : 70 μ m.

Couverture astrocytaire périvasculaire dans le modèle Zucker

Le rat *Zucker* est un modèle d'obésité génétique due à une mutation du gène codant le récepteur de la leptine. Nous avons utilisé ce modèle animal afin d'évaluer l'incidence d'un défaut de signalisation de la leptine sur l'organisation des astrocytes dans le noyau arqué.

Les doubles-marquages GFAP-Laminine montraient une faible proportion d'astrocytes accolés aux vaisseaux sanguins chez les rats sauvages Fa/Fa, tandis que la couverture astrocytaire périvasculaire des rats fa/fa obèses était significativement plus dense (Fig. 7A-F ; rat Fa/Fa : $8,5 \% \pm 1,5$; rat fa/fa : $26,4 \% \pm 0,8$; $p < 0,05$). Nous n'avons pas observé de variation de la couverture astrocytaire globale chez les rats fa/fa.

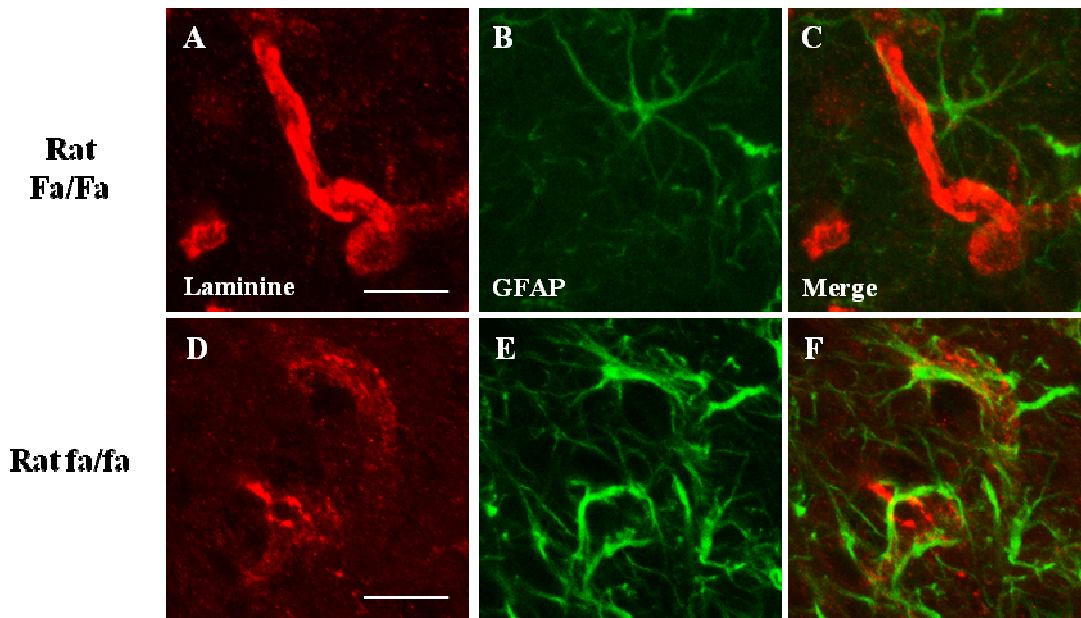


Figure 7 : Double -immunohistochimie fluorescente. Co-détection en microscopie confocale de la laminine et de la GFAP dans le noyau arqué de rats Fa/Fa (A-C) ou fa/fa obèses (D-E) Les rats fa/fa présentent une augmentation de la couverture astrocytaire périvasculaire significative. Superposition de 10 plans focaux. Barres d'échelle : 40 µm.

Etude 2

Mécanismes d'action du CNTF dans le contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique

The anorexigenic cytokine Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) stimulates POMC gene expression via receptors localized in the nucleus of arcuate neurons

*Couvreur O., Aubourg A., Crépin D., Degrouard J., Gertler A., Taouis M., CM.
Am J Physiol Endocrinol Metab. In revision*

Présentation de l'étude

Le CNTF est une neurocytokine de la même famille que la leptine. Si cette molécule a tout d'abord été décrite pour son rôle neurotrophique, son implication dans la régulation de nombreux autres processus physiologiques, et notamment dans le contrôle de l'homéostasie énergétique est désormais connue. En effet, le CNTF stimule la perte de poids, même dans des situations de leptino-résistance, en activant les mêmes voies de signalisation que la leptine (Lambert et al., 2001). L'action du CNTF nécessite sa liaison à son récepteur trimérique : CNTFR α -LIF-R-gp130 (Davis et al., 1993 a,b ; Ip et al., 1993).

Une récente étude a démontré que le CNTF et ses sous-unités réceptrices étaient exprimés par les populations astrocytaires et neuronales du noyau arqué de l'hypothalamus. Par ailleurs, le CNTF endogène serait capable de protéger une fraction d'individus contre la prise de poids induite par un régime hypercalorique, suggérant un nouveau rôle pour la cytokine (Vacher et al., 2008).

A ce jour, les mécanismes d'action du CNTF restaient cependant incompris car ce dernier ne possédant pas de peptide signal, il ne peut être sécrété par les voies classiques de l'exocytose. Une étude menée *in vitro* a suggéré que le CNTF pouvait exercer une action intracellulaire (Monville et al., 2002).

Le but de cette seconde étude a donc été de tester cette hypothèse *in vivo* chez le rat.

Title page

The anorexigenic cytokine Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) stimulates POMC gene expression via receptors localized in the nucleus of arcuate neurons

Running head: Nuclear CNTF regulates POMC gene expression in the rat ARC

Odile Couvreur^{1,2}, Alain Aubourg^{1,2}, Delphine Crépin^{1,2}, Jéril Degrouard³, Arieh Gertler⁴, Mohammed Taouis^{1,2}, Claire-Marie Vacher^{1,2}

1 Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire, University of Paris-Sud, UMR 8195, Orsay, F-91405, France

2 Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire, CNRS, Centre de Neurosciences Paris-Sud UMR8195, Orsay, F-91405, France

3 Développement et Evolution, Centre Commun de Microscopie Electronique, UMR 8080, University of Paris-Sud, Orsay, F-91405, France

4 The Hebrew University of Jerusalem, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences Institute of Biochemistry Food Science and Nutrition, Rehovot, 76100, Israel

Corresponding author:

Phone : +33 1 69 15 58 94

Fax : +33 1 69 15 74 70

Email address : claire-marie.vacher@u-psud.fr

List of abbreviations: ARC, arcuate nucleus; CNTF, ciliary neurotrophic factor; CNTFR α , CNTF receptor alpha; EtH-2, ethidium homodimer 2; gp130, glycoprotein 130 kDa; -IF, immunofluorescent; JAK-2, Janus kinase 2; LIFR, leukaemia inhibitory factor receptor.

Abstract

CNTF (ciliary neurotrophic factor) is a neural cytokine that reduces appetite and body weight when administered to rodents or humans. We have recently demonstrated that the level of CNTF in the arcuate nucleus (ARC), a key hypothalamic region involved in food intake regulation, is positively correlated with protection against diet-induced obesity. However, the comprehension of the physiological significance of neural CNTF action was still incomplete because CNTF lacks a signal peptide, and thus may not be secreted by the classical exocytosis pathways. Knowing that CNTF distribution shares similarities with that of its receptor subunits in the rat ARC, we hypothesized that CNTF could exert a direct intracrine effect in ARC cells. Here we demonstrate that CNTF, together with its receptor subunits, translocates to the cell nucleus of anorexigenic POMC neurons in the rat ARC. Furthermore, the stimulation of hypothalamic nuclear fractions with CNTF induces the phosphorylation of several signaling proteins including Akt, as well as the transcription of the POMC gene. These data strongly suggest that intracellular CNTF may directly modulate POMC gene expression via the activation of receptors localized in the cell nucleus, providing a novel plausible mechanism of CNTF action in regulating energy homeostasis.

Keywords: Energy homeostasis; Signaling pathways; Confocal microscopy; Transmission electron microscopy; Run on.

Introduction

CNTF (ciliary neurotrophic factor) is a 22 kDa cytokine expressed mainly in the nervous system by neuronal and glial cells. Originally, it was shown to promote the survival of ciliary ganglion neurons (6, 26). Today, we know that its spectrum of activities is much broader since it includes the differentiation and/or survival of a variety of nervous cells such as motor neurons, oligodendrocytes and astrocytes (29, 38, 50). In an initial clinical trial designed to test the efficacy of a CNTF analogue to prevent motor neuron degeneration, some patients suffered a substantial weight loss (39). Since then the mechanisms by which CNTF induces weight loss have been deciphered using animal models and it has been shown that CNTF mimics the ability of leptin, an adipocyte-secreted cytokine, to decrease food intake and produce fat loss. Moreover, and interestingly, CNTF is able to bypass leptin resistance in diet-induced obesity model, a more representative model of human obesity (19).

Similar to leptin, CNTF acts through neurons located in hypothalamic centers that control energy homeostasis, including the arcuate nucleus (ARC) (36). The ARC contains two main neuronal populations that exert opposite effects: neuropeptide Y (NPY)-producing neurons and pro-opiomelanocortin (POMC)-synthesizing neurons, which stimulate and inhibit appetite, respectively. The anorexigenic action of exogenous CNTF has been attributed to a decrease in NPY gene expression (63) and an increase in POMC transcription (1) in rats.

Functional CNTF receptor encompasses three subunits. CNTF first binds to its specific CNTF receptor (CNTFR α), which induces heterodimerization of the “ β ” components of the receptor complex, gp130 and leukemia inhibitory factor receptor β (LIFR) (14-15, 30). In rodents, CNTF shares signaling cascades with leptin in the ARC. Indeed, the β component dimerization initiates the association with janus kinase-2 (JAK-2), and this subsequently phosphorylates specific tyrosine residues on the intracellular domains, creating docking sites for Src homology-containing signaling components. Briefly, this leads to the inhibition of AMP-activated protein kinase (AMPK) (55) and the activation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt, mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/ERK) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathways (14-15, 44, 53). Phosphorylated STAT3 forms a dimer that translocates to the nucleus where it activates the transcription of target genes, such as that encoding POMC (54). The activation of this signaling pathway by CNTF is negatively modulated by members of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) family of proteins (11). Interestingly, we have shown that leptin but not CNTF is able to induce protein-tyrosine phosphatase-1B (PTP-1B) expression. In addition, CNTF signaling was not affected by PTP-1B over-expression, which may at least partially explain its efficacy in leptin resistant state (9).

Recently, the contribution of endogenous CNTF to the physiological control of energy homeostasis has been proposed with the finding of a body weight-dependent production of CNTF in the rat ARC (57). Nevertheless, the comprehension of the physiological significance of neural CNTF action was still incomplete because CNTF lacks a signal peptide (49), and thus may not be secreted by the classical exocytosis pathways. Several studies have indicated that CNTF may be released in pathological states such as brain lesions or inflammation (23, 51, 62). However, the synthesis of CNTF is not limited to these conditions. Thus, we propose here that besides its extracellular action in pathological situations, endogenous CNTF may act also intracellularly to take part in the control of energy homeostasis.

We have previously shown that CNTF distribution shares similarities with that of its receptor subunits in the rat ARC. Indeed, a majority of neurons and astrocytes express both CNTF and CNTFR α , and both β components of the receptor are ubiquitous in the rat ARC (57), suggesting the possibility of an intracrine effect of the cytokine as previously envisaged in cell culture (40). The aim of the current work was to validate this hypothesis *in vivo*, and to evaluate the impact of such a mechanism on the hypothalamic control of energy homeostasis.

Here we demonstrate that CNTF and its receptors interact in the nucleus of ARC cells, including anorexigenic POMC neurons. Moreover, CNTF stimulation of hypothalamic isolated nuclei increased Akt phosphorylation and POMC gene transcription. Taken together, these data indicate that intracellular CNTF may exert an endogenous anorexigenic action via the activation of receptors localized in the cell nucleus that leads to the stimulation of POMC gene expression. These data provide a novel plausible mechanism of CNTF action in the hypothalamic regulation of energy homeostasis.

Materials and Methods

Animals and housing. All experiments were performed in agreement with European legal requirements (Decree 86/609/EEC) and approved by the local committee on Animal Welfare. Thirty 3-month-old Wistar male rats (*Rattus norvegicus*) were used. They were housed under 12 hrs light/dark cycles (lights on 0700; lights off 1900) with access to food and water *ad libitum*. They were killed at the same time of the day (between 1400 and 1600).

SH-SY5Y cells. The human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) was obtained from Dr. B. Dufy (UMR 5543, CNRS, Bordeaux-II University, France) and cultured according to (10).

Immunofluorescence. The immunohistochemical analyses were performed as previously described (57) in ten rats. Hypothalamic floating sections (50- μ m thick) were incubated with a combination of goat anti-CNTF (1:200, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), goat anti-CNTFR α (1:200; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), rabbit anti-LIFR (C-terminal) (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), mouse anti-GFAP (Glial Fibrillary Protein, 1:500, Sigma, St-Quentin-Fallavier, France), rabbit anti-gp130 (N-terminal) (1:200; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-JAK-2 (1:100; Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-Akt (1:100, Cell Signaling), mouse anti-NeuN (Neuronal Nuclei, 1:1000, Millipore, Molsheim, France), and rabbit anti-POMC (1:5000, Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA) antibodies. Primary antibodies were visualized by using FluoProbes-488 (FP-488; Interchim, Montluçon, France) or cyanine-5 (Cy5; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) conjugated donkey anti-goat, rabbit, mouse or sheep antibodies (1:400). The choice of antibodies was based on their cross-reactivity for the rat forms of our molecules of interest and on their previous characterization on system nervous sections (8, 17, 24, 35, 61). Moreover, their specificity was tested on Western blots and with several controls: incubation with blocking peptides (Santa Cruz Biotechnology; 1 h at room temperature prior to addition to sections) and omission of the antibodies. In all cases, immunofluorescence was reduced to background levels. Moreover, the specificity of CNTF antibody was tested on brain sections coming from CNTF knock-out mice (generously given by Prof. R. Sendtner; (37)). Some sections were counterstained with DAPI or ethidium homodimer-2 (EtH-2; 2 μ g/ml; 1 hr; Invitrogen-Molecular Probes), a membrane-permeable fluorescent dye which binds to nucleic acids allowing the visualization of the different cellular compartments.

Microscopy and image acquisition

Immunofluorescence was examined by confocal microscopy (Zeiss MRC 1024ES; Zeiss microscopy, Jena, Germany). Series of optical sections were collected through the Z axis at 0.4 μ m or 0.2 μ m intervals and averaged three times. Four lasers at 450 nm, 488 nm, 543 nm and 633 nm were used for the excitation of DAPI, FP-488, EtH-2/PLA and Cy5, respectively. Images were taken through a 40 \times or a 63 \times oil immersion objective. The images used for three dimensional cell reconstructions were scanned with a zoom of 3.5.

Image processing and analysis

CNTF- and its receptor subunits-immunofluorescence exhibited a punctiform-like pattern. To investigate the distribution of these punctae through the ARC cells, 0.2- μ m-thick focal planes of EtH-2 stained cells were acquired and processed for 3D reconstructions. Confocal image stacks were automatically converted to a format enabling their processing by programs developed using the Free-D software libraries (2). The segmentation was then performed as follows. The cell and nucleus contours were delineated manually on each EtH-2 colored focal plane and a surface model of the plasmic membrane (in grey) and the nuclear envelope (in red) was generated. A third model was created to point immunofluorescent spots (in green). The distribution of green spots was quantified in the cytoplasm and the nucleus on 3 different cells from 3 different sections and 3 different rats using ImageJ 1.36b software (NIH, USA).

Immunogold electron microscopy. Rats were perfused with a fixative solution (2% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde; Electron Microscopy Sciences, Washington, PA, USA). Briefly bilateral ARC were microdissected from hypothalamic slices, dehydrated and embedded in LR White resin (Sigma). Ultrathin sections (70 nm) were cut and transferred to nickel grids with a formvar/carbon film for postembedding immunogold labelling. These sections were saturated and incubated with a combination of primary antibodies raised against CNTF (1:50), CNTFR α (1:100), LIFR (1:200) or gp130 (1:50) overnight at 4°C. The sections were then incubated with donkey anti-goat and/or donkey anti-rabbit immunoglobulins respectively coupled to 10 or 6 nm colloidal gold particles (1:30; Aurion Costerwegs, Wageningen, The Netherlands). Sections were finally contrast-stained in a 5% uranyl acetate solution, observed with a transmission electron microscope at 80 kV (EM 208, Philips, Eindhoven, The Netherlands) and pictures were taken using a CCD wide angle camera (AMT, MA, USA). Control experiments were performed by omitting primary antibodies. For each group of particles, deposits were performed in order to evaluate particle size segregation. Diameter mean and SEM were calculated and particle diameters were plotted in a frequency distribution. Immunogold particles localized in the cytoplasmic, nuclear and extra-cellular compartments were counted manually.

Preparation of nuclear and cytosolic extracts. Hypothalamic samples from five rats were homogenized and then nuclear, cytoplasmic and membrane fractions prepared as previously described (21). Briefly, whole hypothalami were homogenized individually in a nuclear homogenization buffer (NHB) containing 20 mM Tris, pH 7.5, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl₂. Nonidet P-40 at the final concentration of 0.15%, 10 mM NaF, 20 mM β glycerol phosphate, 1 mM PMSF, 1mM Na₃VO₄, 2 μ g/mL leupeptin and 2 μ g/mL aprotinin were then added. Homogenates were centrifuged for 5 min at 1500 rpm. Supernatants were kept as cytosolic extracts and nuclear pellets were resuspended in 0.5 volume of NHB and centrifuged at 1500 rpm for 5 min twice again. Integrity of the nuclei was examined on a small part of the pellets using a toluidin blue staining.

Stimulation of isolated nuclei with CNTF or leptin. The nuclei were resuspended in a stimulation buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 10 mM NaF, 20 mM β glycerol phosphate, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 2 μ g/mL leupeptin and 2 μ g/mL aprotinin before being incubated for 10 min at 37°C with CNTF (1 nM) or leptin (10 nM) in the presence or not of ATP (5 μ M). Proteins (50-80 μ g) were resolved by SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose. Membranes were then incubated with the appropriate primary and secondary antibodies, and targeted proteins were visualized by enhanced chemoluminescence reagents (ECL detection kit).

Immunoprecipitation. Proteins (500 µg) were incubated overnight at 4°C with 10 µL of CNTFR α , LIFR or gp130 antibodies and lysis buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100 and 0.5% Nonidet P-40 for the binding step. Then protein A (40 µL) was added to the preparation and incubated at 4°C for 2 hours to capture the immune complex. After a spin at 13000 rpm for 3 min, the pellets were resuspended in 500 µL of lysis buffer and centrifuged for 3 min at 13 000 rpm again. We performed this step three times before subjecting the proteins to SDS-PAGE and Western blot experiments using CNTFR α and gp130 antibodies. Control experiments were performed by immunoprecipitating our samples with irrelevant antibodies raised against Lammer protein kinase and Protein-tyrosine phosphatase 1B.

Western blots. Proteins (50 µg) were subjected to SDS/PAGE and Western blot analysis using the same antibodies as mentioned above in addition to mouse anti-phosphotyrosine 100 (Millipore, Temecula, CA, USA), rabbit anti-p44/42 ERK (Thr 202/Tyr 204), rabbit anti-44/42 ERK, rabbit anti-pJAK2 (Tyr 1007/1008), rabbit anti-JAK-2, rabbit anti-pAkt (Ser 473), rabbit anti-Akt, rabbit anti-pSTAT3 (Tyr 705) and rabbit anti-STAT3 (Cell Signaling). All Western blots were normalized to the corresponding total proteins. Blot quantification was performed by using Bio1D software (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

Nuclear Run-on reaction. Nuclei isolation from the hypothalamus of five rats was adapted from the previously published method (46). Briefly, hypothalami were isolated from 5 anesthetized Wistar rats. Hypothalamus samples (~70 mg) were rapidly homogenized in ice cold buffer A (15 mM HEPES, pH7.5, 60 mM KCl, 3mg/ml BSA, 300 mM sucrose, 5 mM each of EDTA and EGTA, 1 mM dithiothreitol (DTT) , 0.5 mM spermidine, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 2 µg/ml each of leupeptin and aprotinin). Following centrifugation at 700 g at 4°C for 10 min, the resulting pellet containing crude nuclei was suspended in ice cold buffer B (similar to buffer A except 0.1 mM of each EDTA and EGTA, and the addition of 5 mM MgOAc) and centrifuged in the same condition as described above. The final nuclei pellets were suspended in storage buffer (40% glycerol, 75 mM HEPES, pH 7.5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 5 mM MgAc-, 0.1 mM each of EDTA and EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM spermidine, and 2 µg/ml each of leupetin and aprotinin), and frozen immediately in liquid nitrogen, and stored at -80°C. To determine transcription of POMC gene in response to CNTF, a qRT-PCR based on nuclear run-on technique was used, as previously described (28). Briefly, frozen nuclei were thawed on ice, and equal volumes of nuclei and reaction buffer (20% glycerol, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 4.5 mM DTT, 1.2 mM ATP, 0.6 mM each of CTP, TTP and UTP, and 80 units/ml RNase inhibitor, and finally 1 nM of CNTF was added; and in control CNTF was substituted by equal volume H₂O) were mixed and incubated at 22°C for 45 min. RNA was then extracted using TriZol (Invitrogen, France) according to manufacturer's recommendations.

Quantitative RT-PCR. Nascent RNA from the nuclear run-on reactions was reverse transcribed using the Super-Script II RNase H-system (Invitrogen, France) as previously described (9). The resulting cDNAs were submitted to quantitative PCR. The PCR primer sequences used were as follows, POMC forward: 5'AGGTTAAGGAGCAGTGAC3', reverse: 5'CGTCTATGGAGGTCTGAAGC3'; NPY forward: 5'ATGCTAGGTAACAAACG3', reverse: 5'ATGTAGTGTCGCAGAG3', and 18S forward 5'TCCCCGAGAAGTTTCAGCACAT3', reverse 5'CTTCCCATCCTTCACGTCCTTC3'. Real-time PCR was carried out using the Step One apparatus (Applied Biosystems, USA) and the Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, USA). A ratio of specific Nascent

POMC-RNA/18S amplification was calculated, to correct for any difference in efficiency at RT.

Recombinant CNTF and leptin. Human CNTF and ovine leptin were produced by Protein Laboratories Rehovot (PLR) as previously described and validated (16, 18, 57).

Statistical methods. A 2-tailed Student's *t*-test was used to compare the frequency distribution patterns, and a Friedman test was carried out to detect significant differences between different treated samples. These tests have been performed with StatView (StatView 4.0, Abacus Concept Inc., Berkeley, CA, USA) and with AnaStats.fr (Rilly-sur-Vienne, France). Data are presented as means \pm SEM. Results were considered significant if $p < 0.05$.

Results

CNTF and its receptor subunits are expressed in anorexigenic neurons of the ARC

We have previously demonstrated that CNTF was expressed in 90% of astrocytes and 75% of neurons in the rat ARC (57). Because CNTF administration decreases food intake, we addressed the possibility for the cytokine to be produced in anorexigenic neurons. Thus we have detected POMC by immunohistochemistry in rats. Both approaches evidenced the presence of a punctiform CNTF-immunofluorescent staining in 100% of anorexigenic POMC neurons of the ARC in rat (Fig. 1A-H). The specificity of CNTF staining was validated on hypothalamic sections obtained from CNTF knock-out mice (Fig. 1I-J). Moreover, all POMC neurons of the rat ARC exhibited an immunoreactivity for CNTF receptor subunits, namely CNTFR α (Fig. 2A-C), LIFR (Fig. 2D-F) and gp130 (Fig. 2G-I). It is to note that the immunofluorescence for CNTF and its receptors was particularly intense in the cell nucleus (arrows), as evidenced with the DAPI counterstaining on 0.4-thick-focal planes (Fig. 1A-D) or on 1.2- μ m-thick stacks of high magnification scans (Fig. 1E-H), in POMC neurons as well as in POMC-immunonegative cells. This nuclear staining appeared in clustered dots, which co-localized with the heterochromatin protein 1 (not shown), a positive regulator of active transcription in euchromatin (33), suggesting a potential role of nuclear CNTF in the regulation of gene transcription. Finally, a specific cytoplasmic and extracellular staining was also evidenced for CNTF, CNTFR α , LIFR and gp130, which are known to exist as soluble forms (14, 41, 43, 52).

CNTF and its receptor components are localized in the nucleus of rat ARC cells

In order to confirm and quantify the presence of CNTF and its receptors in the ARC cell nuclei, we have counterstained hypothalamic sections with EtH-2, a fluorescent molecule that stains nucleic acids with a high affinity and that allows the delimitation of the different cell compartments. We then estimated the relative nuclear and cytoplasmic contents of CNTF and its receptors from 3D reconstructions of high magnification confocal stacks. We found that CNTF and its different receptor partners were mainly located in the nuclear compartment. Indeed, 65% \pm 21 of CNTF (Fig. 3A,G), 77% \pm 11 of CNTFR α (Fig. 3B,G), 87% \pm 5 of LIFR (Fig. 3C,G) and 67% \pm 10 of gp130 (Fig. 3D,G) staining were located in the nucleus of rat ARC cells. Besides, a staining of CNTF receptor subunits was observed close to the cell membrane (Fig. 3B-D). It is also noteworthy that the predominant nuclear distribution of CNTF and its receptor subunits was observed throughout the hypothalamus. In addition, JAK-2, a signaling molecule associated to CNTF receptor subunits, was also present in the cell nucleus up to 29% \pm 17 although its main location was cytoplasmic and close to the inner cell membrane (Fig. 3E,G). Finally, Akt, a downstream signaling element, exhibited a nuclear localization that reached 63% \pm 22 in the ARC cells (Fig. 3F,G).

CNTF and its receptor subunits may interact in the cell nucleus of rat ARC cells

Previous *in vitro* studies have demonstrated that the activation of CNTF receptor required the heteromerization of its subunits. To check the possibility that these molecules form a CNTF tripartite complex in the ARC cells, we performed multiple immunogold stainings followed by a transmission electron microscopy analysis. Four pairs of proteins were tested, according to the host species of pre-characterized antibodies (see “Materials and Methods”): CNTF/LIFR, CNTF/gp130, CNTFR α /LIFR and CNTFR α /gp130. For each group of particles, deposits were performed in order to evaluate particle size segregation. Diameter mean and SEM were calculated and particle diameters were plotted in a frequency distribution (Fig. 4A). The difference was highly significant (5.579 ± 0.17 (n=72) *versus* 9.522 ± 0.1 (n=84); $p < 0.0001$; 2-tailed Student's *t*-test). Despite the use of a post-embedding method, chosen to facilitate the accessibility of the antibodies to the deep cellular compartments such as the cell nucleus, the tissue integrity was preserved and the main organelles including rough endoplasmic reticulum, mitochondria, nuclear envelope, heterochromatin and euchromatin were easily identified. The same four pairs of proteins as previously mentioned were tested. Omission of the primary antibody validated the specificity of the immunolabelling. CNTF and its receptor subunits were observed both in the cytoplasm and the nucleus of the ARC cells. The nuclear localization represented respectively $57\% \pm 11$, $65\% \pm 16$, $72\% \pm 12$ and $52\% \pm 7$ of the total CNTF-, CNTFR α -, LIFR-, and gp130-immunostaining (Fig. 4B). The concomitant detection of CNTF and its receptor subunits confirmed the proximity of CNTF and LIFR (Fig. 4C), CNTF and gp130 (Fig. 4D), CNTFR α and LIFR (Fig. 4E), and CNTFR α and gp130 (Fig. 4F) in the cell nucleus. The cytoplasmic compartment contained also CNTF and its receptor subunits. This staining was particularly intense nearby the rough endoplasmic reticulum. Moreover, single or double staining of CNTF and its receptor subunits was also evidenced in nuclear pores (not shown). Finally, it is to note that an extracellular staining was observed for CNTF, CNTFR α and gp130. This soluble fraction was estimated at 17%, 12% and 5% for CNTF, CNTFR α and gp130, respectively (Fig. 4B).

We next performed a Western blot analysis from fractionated hypothalamic samples. These biochemical data corroborated the common nuclear location of CNTF and its receptor subunits in ARC cells. These experiments showed a mixed distribution of CNTF, CNTFR α and gp130 between the cytoplasmic (lane C, Fig. 5A) and the nuclear (lane N, Fig. 5A) compartments, and revealed that LIFR and gp130 were also present at the cell membrane (lane M, Fig. 5A). The fact that CNTFR α was not detected in the membrane fraction, albeit functional after an intraperitoneal injection of CNTF (34, 57), may be due to its labile glycosyl-phosphatidylinositol anchorage to the cell membrane (14). Moreover, JAK-2 and Akt were detected both in cytoplasmic and nuclear fractions (Fig. 5A). The purity of the different fractions was verified by detecting different cytoplasmic or nuclear proteins, such as β -tubulin and GFAP (cytoplasmic) and NeuN (nuclear). Moreover, the examination of cresyl violet stained fractions under a light microscope confirmed the purity and the integrity of the isolated nuclei. The possibility for CNTF receptor subunits to interact in the cell nucleus was assessed by co-immunoprecipitations from hypothalamic nuclear fractions. As shown in Fig. 5B, gp130 was found to co-immunoprecipitate with CNTFR α and LIFR, and CNTFR α co-immunoprecipitated with LIFR and gp130. The immunoprecipitation with irrelevant antibodies raised against Lammer protein kinase and Protein-tyrosine phosphatase 1B confirmed that the immunoprecipitated complexes were specific (not shown).

CNTF stimulates POMC transcription in isolated hypothalamic nuclei

Because nuclear CNTF was found in ARC POMC neurons, we assessed its capability to modulate POMC transcription in isolated nuclei from hypothalamus. A 45-min incubation with CNTF (1 nM) significantly increased the level of nascent POMC-RNA ($p < 0.05$; n=5; Fig. 6).

By contrast, CNTF did not alter the transcription of NPY gene, and leptin treatment had no significant effect on the transcription level of our genes of interest (Fig. 5).

CNTF stimulates signaling pathways in isolated hypothalamic nuclei

We have next investigated the effects of nuclear CNTF on the activation of signaling pathways after the incubation of hypothalamic nuclear extracts from 10 different rats with CNTF. Western blot analysis using anti-pJAK-2 and anti-pAkt antibodies showed that a 10-min incubation with CNTF (1 nM) increased their phosphorylation levels (Fig. 7A). The band intensity analysis of the blots (after normalization with total JAK-2 or total Akt) evidenced a significant increase of the JAK-2 ($p < 0.0005$) and Akt ($p < 0.005$) phosphorylation levels compared to control conditions (Fig. 7B). It is to note that phosphorylation of these proteins was not affected by leptin (10 nM) and was prevented in the absence of ATP. Moreover, CNTF did not induce the phosphorylation of ERK 42/44 in nuclear extracts but it induced that of STAT3 in 2 animals out of 10 (data not shown). We performed the same experiment on nuclear fractions extracted from a neuronal cell line (SH-SY5Y), which expressed POMC. These cells served as a negative control since, unlike gp130, CNTFR α and LIFR were mainly found in the cytoplasm. The incubation of SH-SY5Y nuclear extracts with CNTF (1 nM) was not associated with increased phosphorylation of JAK-2 and Akt (not shown).

Discussion

Anorexigenic properties of CNTF have conferred to this cytokine a promising therapeutic potential in the treatment of obesity. Besides, several studies have tended to show that endogenous CNTF can represent also a new modulator of energy homeostasis. Indeed, a null mutation in CNTF gene has been associated with a significant increase in body mass in humans (25, 42), and variants in CNTF or CNTFR α gene in humans have been associated with lower age at onset of eating disorders (22). Furthermore, hypothalamic neurons controlling food intake represent a significant source of CNTF that varies in inverse ratio with body weight in rats fed a hypercaloric diet, suggesting a protective action of the cytokine, in a fraction of individuals, against diet-induced weight gain (57). However, how hypothalamic CNTF contributes to the control of energy balance is still an open question since it lacks a signal peptide and thus may not be released by the classical exocytose pathways (49). In the current study, we show for the first time that CNTF can exert a direct intracrine action by activating its receptor in the cell nucleus of ARC cells. This leads to the stimulation of POMC expression and may account for the anorexigenic effect of the cytokine.

A variety of hormones (i.e. leptin and insulin) and growth factors (i.e. leukemia inhibitory factor and brain-derived neurotrophic factor) have been shown to operate in an intracrine mode, and most of them have been reported to translocate and bind to the cell nucleus (47). However, although CNTF has been previously described in the nuclear compartment of neurons and glial cells throughout the brain (3-5, 27, 35), the evidence of CNTF in the nucleus of ARC neurons was unexpected. This result was not only validated by the diversity of the approaches used in our study (immunohisto-/cyto-chemistry, 3D reconstructions, and Western blot from fractionated cells) but also by the implementation of several control experiments (omission of the primary antibody, competition with blocking peptide, and use of CNTF knock-out mice). Moreover, we have tested several antibodies obtained from different species and raised against different domains of the protein, and this comparative study confirmed CNTF to be present not only in the cytoplasm but also in the nucleus of ARC cells. The mechanisms underlying the nuclear translocation of CNTF have not been elucidated yet. CNTF gene can be co-transcribed with that encoding ZFP 91 (Zinc Finger Protein 91), a nuclear proliferative and anti-apoptotic factor (Entrez Gene: ZFP91-CNTF transcription unit) (56), but no nuclear targeting signal (NTS) was found for CNTF.

Nevertheless, alternative NTS-independent pathways exist for nuclear transport (reviewed by (59)). *In vitro* studies have indicated that CNTF could reach the nucleus by a facilitated transport mechanism in oocytes and astrocytes (4-5). Moreover, the fact that we evidenced both CNTF and LIFR passing through the nuclear envelope by the same pore could suggest a receptor-mediated translocation, as previously demonstrated for IL-1, another signal peptide lacking cytokine (13).

Our data indicate that CNTF receptor subunits are present not only at the membrane and in the cytoplasm but in the nucleus of ARC cells as well. This observation is in accordance with several studies showing that intracrine factors can usually act both at the membrane and in the nucleus (47). Furthermore, CNTF receptor subunits may associate in the cell nucleus as demonstrated using transmission electron microscopy and by co-immunoprecipitation from nuclear extracts. To our knowledge, among the different CNTF receptor subunits, LIFR is the only one that has been previously described in cell nucleus, notably in neurons (17, 20).

Among the different cell types constituting the ARC, POMC expressing neurons appeared as a privileged place for nuclear CNTF to activate its receptor complex. Indeed, all the partners are present in the nucleus of these neurons and the stimulation of nuclear extract with CNTF induced a specific increase in POMC gene expression. The important transcriptional activity of the activated CNTF receptor complex is illustrated by the high degree of colocalization between these proteins and HP1, a positive regulator of active transcription in euchromatin (33). By comparison, NPY-nascent RNA levels were not affected by CNTF. In the hypothalamus, POMC neurons play a crucial role in the regulation of energy homeostasis by controlling food intake, energy expenditure, and glucose metabolism (45). They integrate nervous and circulating signals to respond to the energy body requirements, and in turn release the anorexigenic α -MSH (alpha-melanocyte stimulating hormone) towards second-order neurons located in different hypothalamic regions, such as the paraventricular nucleus and the lateral hypothalamic area. Furthermore, POMC neurons have been shown to mediate the anorexigenic effect of exogenous CNTF. Indeed, CNTF injection induces an increase in POMC expression (1), and the ablation of gp130 in POMC neurons prevents CNTF from activating STAT3 phosphorylation in these neurons and from inhibiting food intake (32). Thus, here we demonstrate that endogenous CNTF could take part to the control of energy homeostasis by regulating POMC gene expression *via* the activation of its receptor subunits in the cell nucleus of these neurons.

The signaling cascades involved in such a regulation need to be elucidated. According to our results, we can assume that an Akt-dependent pathway mediates the effect of nuclear CNTF on POMC transcription. Indeed, we observed JAK-2 and Akt in the nucleus of ARC cells, and the stimulation of nuclear extracts with CNTF induced the phosphorylation of both proteins. This hypothesis is reinforced by the fact that Akt can be activated directly in the cell nucleus in different cellular models (60). Moreover, POMC gene transcription is known to be regulated by signaling pathways including JAK-2 and Akt (7, 31). The role of STAT3 cannot be totally excluded since CNTF induced its phosphorylation in 2 animals out of 10. By contrast leptin was unable to induce Akt and JAK-2 phosphorylation in isolated nuclei, indicating a specific effect of CNTF. Moreover, the presence of CNTFR α and/or LIFR in the nucleus seems to be necessary to activate these signaling pathways since in the SH-SY5Y neuroblastoma cell line, which exhibits none of these subunits in the nucleus, CNTF failed to activate the JAK-2/Akt signaling pathways in isolated nuclei.

The impact of our data may not be restricted to the comprehension of the central control of energy homeostasis but extended to therapeutic applications. Indeed, the use of a cell penetrating modified CNTF (48, 58), which crosses the cell membrane and translocates to the nucleus, can retain all or part of CNTF activities without inducing the side effects usually caused by the cytokine (i.e. fever, cough, asthenia) (12).

In conclusion, our results indicate that endogenous CNTF could activate its receptor complex in the nucleus of ARC cells, including POMC neurons. This mechanism, which is not shared by leptin, may contribute to the regulation of POMC gene expression, and thus to the control of energy homeostasis. The involvement of such a process in the protective action of endogenous CNTF against diet-induced weight gain deserves further investigation. Nevertheless, these data could influence future drug discovery efforts for the development of new therapeutic targets against obesity.

Acknowledgements. We thank Prof. M. Sendtner for providing CNTF knock-out brains. We also thank Dr. Monique Lavielle, Dr. Nathalie Beaujean and Josiane Aïoun for their helpful comments. We are grateful to Danielle Jaillard for her excellent technical assistance in electron microscopy, and Dr. Yacir Benomar for providing SH-SY5Y cells.

Current address of J ril Degrouard : Laboratoire de Physique des Solides, UMR 8502, University of Paris-Sud, Orsay, F-91405, France.

Grants. This work was supported by the “Agence Nationale pour la Recherche” (ANR-06-JCJC-0107 to CMV) and the “Groupe Lipides et Nutrition” (2009-11 to CMV).

Reference list

1. **Ambati S, Duan J, Duff E, Choi YH, Hartzell DL, Della-Fera MA, and Baile CA** 2007 Gene expression in arcuate nucleus-median eminence of rats treated with leptin or ciliary neurotrophic factor. *Biofactors* 31: 133-144
2. **Andrey P, and Maurin Y** 2005 Free-D: an integrated environment for three-dimensional reconstruction from serial sections. *J Neurosci Methods* 145: 233-244
3. **Asan E, Langenhan T, Holtmann B, Bock H, Sendtner M, and Carroll P** 2003 Ciliary neurotrophic factor in the olfactory bulb of rats and mice. *Neuroscience* 120: 99-112
4. **Bajetto A, Barbero S, Bonavia R, Chimini G, and Schettini G** 2000 Immunofluorescence and biochemical techniques to detect nuclear localization of ciliary neurotrophic factor in glial cells. *Brain Res Brain Res Protoc* 5: 273-281
5. **Bajetto A, Schettini G, and Chimini G** 1999 Nuclear localization of ciliary neurotrophic factor in glial cells. *Brain Res* 818: 565-569
6. **Barbin G, Manthorpe M, and Varon S** 1984 Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem* 43: 1468-1478
7. **Belgardt BF, Husch A, Rother E, Ernst MB, Wunderlich FT, Hampel B, Klockener T, Alessi D, Kloppenburg P, and Bruning JC** 2008 PDK1 deficiency in POMC-expressing cells reveals FOXO1-dependent and -independent pathways in control of energy homeostasis and stress response. *Cell Metab* 7: 291-301
8. **Beltran WA, Rohrer H, and Aguirre GD** 2005 Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha) in mammalian photoreceptor cells. *Mol Vis* 11: 232-244
9. **Benomar Y, Berthou F, Vacher CM, Bailleux V, Gertler A, Djiane J, and Taouis M** 2009 Leptin But Not Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Induces Phosphotyrosine Phosphatase-1B Expression in Human Neuronal Cells (SH-SY5Y): Putative Explanation of CNTF Efficacy in Leptin-Resistant State. *Endocrinology* 150: 1182-1191
10. **Benomar Y, Roy AF, 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: 929-939
11. **Bjorbaek C, Elmquist JK, El-Haschimi K, Kelly J, Ahima RS, Hileman S, and Flier JS** 1999 Activation of SOCS-3 messenger ribonucleic acid in the hypothalamus by ciliary neurotrophic factor. *Endocrinology* 140: 2035-2043
12. **Bongioanni P, Reali C, and Sogos V** 2004 Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev* CD004302
13. **Curtis BM, Widmer MB, deRoos P, and Qwarnstrom EE** 1990 IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. *J Immunol* 144: 1295-1303
14. **Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, DiStefano PS, Curtis R, Panayotatos N, Gascan H, and et al.** 1993 Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* 259: 1736-1739
15. **Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, and Yancopoulos GD** 1993 LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260: 1805-1808
16. **Ferezou-Viala J, Roy AF, Serougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, Gertler A, Delplanque B, Djiane J, Riottot M, and Taouis M** 2007 Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R1056-1062
17. **Gardiner NJ, Cafferty WB, Slack SE, and Thompson SW** 2002 Expression of gp130 and leukaemia inhibitory factor receptor subunits in adult rat sensory neurones: regulation by nerve injury. *J Neurochem* 83: 100-109

18. **Gertler A, Simmons J, and Keisler DH** 1998 Large-scale preparation of biologically active recombinant ovine obese protein (leptin). *FEBS Lett* 422: 137-140
19. **Gloaguen I, Costa P, Demartis A, Lazzaro D, Di Marco A, Graziani R, Paonessa G, Chen F, Rosenblum CI, Van der Ploeg LH, Cortese R, Ciliberto G, and Laufer R** 1997 Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6456-6461
20. **Gouin F, Couillaud S, Cottrel M, Godard A, Passuti N, and Heymann D** 1999 Presence of leukaemia inhibitory factor (LIF) and LIF-receptor chain (gp190) in osteoclast-like cells cultured from human giant cell tumour of bone. Ultrastructural distribution. *Cytokine* 11: 282-289
21. **Graham JM, and Rickwood D.** *Subcellular fractionation : a practical approach.* Oxford: IRL Press at Oxford University Press, 1997, p. xx, 339 p.
22. **Gratacos M, Escaramis G, Bustamante M, Saus E, Aguera Z, Bayes M, Cellini E, Cid RD, Fernandez-Aranda F, Forcano L, Gonzalez JR, Gorwood P, Hebebrand J, Hinney A, Mercader JM, Nacmias B, Ramoz N, Ribases M, Ricca V, Romo L, Sorbi S, Versini A, and Estivill X** 2010 Role of the neurotrophin network in eating disorders' subphenotypes: Body mass index and age at onset of the disease. *J Psychiatr Res*
23. **Guillet C, Fourcin M, Chevalier S, Pouplard A, and Gascan H** 1995 ELISA detection of circulating levels of LIF, OSM, and CNTF in septic shock. *Ann N Y Acad Sci* 762: 407-409
24. **Haas SJ, Ahrens A, Petrov S, Schmitt O, and Wree A** 2004 Quinolinic acid lesions of the caudate putamen in the rat lead to a local increase of ciliary neurotrophic factor. *J Anat* 204: 271-281
25. **Heidema AG, Wang P, van Rossum CT, Feskens EJ, Boer JM, Bouwman FG, Van't Veer P, and Mariman EC** 2010 Sex-specific effects of CNTF, IL6 and UCP2 polymorphisms on weight gain. *Physiol Behav* 99: 1-7
26. **Helfand SL, Smith GA, and Wessells NK** 1976 Survival and development in culture of dissociated parasympathetic neurons from ciliary ganglia. *Dev Biol* 50: 541-547
27. **Henderson JT, Seniuk NA, and Roder JC** 1994 Localization of CNTF immunoreactivity to neurons and astroglia in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 22: 151-165
28. **Hildebrandt AL, and Neuffer PD** 2000 Exercise attenuates the fasting-induced transcriptional activation of metabolic genes in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278: E1078-1086
29. **Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, and Sendtner M** 1988 Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 335: 70-73
30. **Ip NY, McClain J, Barrezueta NX, Aldrich TH, Pan L, Li Y, Wiegand SJ, Friedman B, Davis S, and Yancopoulos GD** 1993 The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. *Neuron* 10: 89-102
31. **Iskandar K, Cao Y, Hayashi Y, Nakata M, Takano E, Yada T, Zhang C, Ogawa W, Oki M, Chua S, Jr., Itoh H, Noda T, Kasuga M, and Nakae J** 2010 PDK-1/FoxO1 pathway in POMC neurons regulates Pomc expression and food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E787-798
32. **Janoschek R, Plum L, Koch L, Munzberg H, Diano S, Shanabrough M, Muller W, Horvath TL, and Bruning JC** 2006 gp130 signaling in proopiomelanocortin neurons mediates the acute anorectic response to centrally applied ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10707-10712
33. **Kwon SH, and Workman JL** 2011 The changing faces of HP1: From heterochromatin formation and gene silencing to euchromatic gene expression: HP1 acts as a positive regulator of transcription. *Bioessays* 33: 280-289

34. **Lambert PD, Anderson KD, Sleeman MW, Wong V, Tan J, Hjarunguru A, Corcoran TL, Murray JD, Thabet KE, Yancopoulos GD, and Wiegand SJ** 2001 Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4652-4657
35. **Langenhan T, Sendtner M, Holtmann B, Carroll P, and Asan E** 2005 Ciliary neurotrophic factor-immunoreactivity in olfactory sensory neurons. *Neuroscience* 134: 1179-1194
36. **Markus A** 2005 Neurobiology of obesity. *Nat Neurosci* 8: 551
37. **Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, and Thoenen H** 1993 Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365: 27-32
38. **Mayer M, Bhakoo K, and Noble M** 1994 Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro. *Development* 120: 143-153
39. **Miller RG, Bryan WW, Dietz MA, Munsat TL, Petajan JH, Smith SA, and Goodpasture JC** 1996 Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47: 1329-1331
40. **Monville C, Fages C, Feyens AM, D'Hondt V, Guillet C, Vernallis A, Gascan H, and Peschanski M** 2002 Astroglial expression of the P-glycoprotein is controlled by intracellular CNTF. *BMC Cell Biol* 3: 20
41. **Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, and Kishimoto T** 1993 Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 82: 1120-1126
42. **O'Dell SD, Syddall HE, Sayer AA, Cooper C, Fall CH, Dennison EM, Phillips DI, Gaunt TR, Briggs PJ, and Day IN** 2002 Null mutation in human ciliary neurotrophic factor gene confers higher body mass index in males. *Eur J Hum Genet* 10: 749-752
43. **Panayotatos N, Everdeen D, Liten A, Somogyi R, and Acheson A** 1994 Recombinant human CNTF receptor alpha: production, binding stoichiometry, and characterization of its activity as a diffusible factor. *Biochemistry* 33: 5813-5818
44. **Park K, Luo JM, Hisheh S, Harvey AR, and Cui Q** 2004 Cellular mechanisms associated with spontaneous and ciliary neurotrophic factor-cAMP-induced survival and axonal regeneration of adult retinal ganglion cells. *J Neurosci* 24: 10806-10815
45. **Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, Xu C, Vianna CR, Balthasar N, Lee CE, Elmquist JK, Cowley MA, and Lowell BB** 2007 Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449: 228-232
46. **Pilegaard H, Ordway GA, Saltin B, and Neufer PD** 2000 Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279: E806-814
47. **Re RN, and Cook JL** 2006 The intracrine hypothesis: an update. *Regul Pept* 133: 1-9
48. **Rezende AC, Peroni D, Vieira AS, Rogerio F, Talaisys RL, Costa FT, Langone F, Skaper SD, and Negro A** 2009 Ciliary neurotrophic factor fused to a protein transduction domain retains full neuroprotective activity in the absence of cytokine-like side effects. *J Neurochem* 109: 1680-1690
49. **Sendtner M, Carroll P, Holtmann B, Hughes RA, and Thoenen H** 1994 Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* 25: 1436-1453
50. **Sendtner M, Schmalbruch H, Stockli KA, Carroll P, Kreutzberg GW, and Thoenen H** 1992 Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature* 358: 502-504

51. **Sendtner M, Stockli KA, and Thoenen H** 1992 Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J Cell Biol* 118: 139-148
52. **Sherwin JR, Smith SK, Wilson A, and Sharkey AM** 2002 Soluble gp130 is up-regulated in the implantation window and shows altered secretion in patients with primary unexplained infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3953-3960
53. **Stahl N, Davis S, Wong V, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, and Yancopoulos GD** 1993 Cross-linking identifies leukemia inhibitory factor-binding protein as a ciliary neurotrophic factor receptor component. *J Biol Chem* 268: 7628-7631
54. **Stahl N, and Yancopoulos GD** 1993 The alphas, betas, and kinases of cytokine receptor complexes. *Cell* 74: 587-590
55. **Steinberg GR, Watt MJ, Fam BC, Proietto J, Andrikopoulos S, Allen AM, Febbraio MA, and Kemp BE** 2006 Ciliary neurotrophic factor suppresses hypothalamic AMP-kinase signaling in leptin-resistant obese mice. *Endocrinology* 147: 3906-3914
56. **Unoki M, Okutsu J, and Nakamura Y** 2003 Identification of a novel human gene, ZFP91, involved in acute myelogenous leukemia. *Int J Oncol* 22: 1217-1223
57. **Vacher CM, Crepin D, Aubourg A, Couvreur O, Bailleux V, Nicolas V, Ferezou J, Gripois D, Gertler A, and Taouis M** 2008 A putative physiological role of hypothalamic CNTF in the control of energy homeostasis. *FEBS Lett* 582: 3832-3838
58. **Vieira AS, Rezende AC, Grigoletto J, Rogerio F, Velloso LA, Skaper SD, Negro A, and Langone F** 2009 Ciliary neurotrophic factor infused intracerebroventricularly shows reduced catabolic effects when linked to the TAT protein transduction domain. *J Neurochem* 110: 1557-1566
59. **Wagstaff KM, and Jans DA** 2009 Importins and beyond: non-conventional nuclear transport mechanisms. *Traffic* 10: 1188-1198
60. **Wang R, and Brattain MG** 2006 AKT can be activated in the nucleus. *Cell Signal* 18: 1722-1731
61. **Watt JA, Bone S, Pressler M, Cranston HJ, and Paden CM** 2006 Ciliary neurotrophic factor is expressed in the magnocellular neurosecretory system of the rat in vivo: evidence for injury- and activity-induced upregulation. *Exp Neurol* 197: 206-214
62. **Winter CG, Saotome Y, Levison SW, and Hirsh D** 1995 A role for ciliary neurotrophic factor as an inducer of reactive gliosis, the glial response to central nervous system injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 5865-5869
63. **Xu B, Dube MG, Kalra PS, Farmerie WG, Kaibara A, Moldawer LL, Martin D, and Kalra SP** 1998 Anorectic effects of the cytokine, ciliary neurotrophic factor, are mediated by hypothalamic neuropeptide Y: comparison with leptin. *Endocrinology* 139: 466-473

Figure captions

(A) **Figure 1. CNTF is present in POMC neurons of the rat arcuate nucleus.** POMC and CNTF (A-H) were detected by multiple immunofluorescence followed by a confocal laser scanning. Sections were counterstained with DAPI. (I-J) Detection of CNTF-immunofluorescence in wild type (WT) and CNTF knock-out mice (CNTF^{-/-}). 0.4 μm -thick focal planes (A-D). 1.2- μm -thick stacks of high magnification scan ($\times 63$) (E-H). Epifluorescence observation (I-J). Scale bars = 30 μm (A-D); 10 μm (E-H); 50 μm (I-J).

Figure 2. CNTF receptor subunits are present in POMC neurons of the rat arcuate nucleus. POMC and CNTFR α (A-C), LIFR (D-F) or gp130 (G-I) were detected by multiple immunofluorescence followed by a confocal laser scanning. Sections were counterstained with DAPI. 0.4 μm -thick focal planes. Scale bar = 15 μm .

Figure 3. CNTF and its receptor subunits are localized in the cytoplasm and the nucleus of arcuate cells.

(A-F) The distribution pattern of CNTF-, CNTFR α -, LIFR-, gp130-, JAK-2- and Akt-immunofluorescences was reconstructed in 3D with the FreeD software in EtH-2 counterstained arcuate cells. The plasmic membrane (grey) and nuclear envelope (red) were delineated and the punctiform staining of the different proteins of interest was represented as green spots. Raw 5- μm -thick stacks (which represent the sum of 25 0.2- μm -thick focal planes) are shown in an insert at the bottom of each reconstruction image. Scale bars = 5 μm .

(G) The relative density of green spots was quantified in the cytoplasm and the nucleus on 9 distinct cells from 3 different rats. The data are represented as mean percentages of staining \pm SEM.

Figure 4. CNTF and its receptor subunits are co-localized in the nucleus of rat arcuate cells: transmission electron microscopy analysis.

(A) Deposits of 6-nm or 10-nm immunogold particles were performed to evaluate particle size segregation. Particle diameters are plotted in a frequency distribution.

(B) The relative density of gold particles in the cytoplasm, the nucleus and the extracellular space was quantified and represented as percentage of staining.

(C) CNTF- and CNTFR α -immunoreactivities were detected in the nucleus with 10-nm gold particles (arrowheads) while LIFR- and gp130-immunostainings were visualized with 6-nm particles (arrows). Scale bar = 80 nm.

Figure 5. CNTF and its receptor subunits interact in the nucleus of hypothalamic extracts.

(A) Fresh hypothalami were homogenized individually. Then membrane (lane M), cytoplasmic (lane C) and nuclear (lane N) fractions were isolated. Their respective content in CNTF, CNTFR α , LIFR, gp130, JAK-2 and Akt was analyzed by Western blot. The purity of the fractions was controlled by detecting cytoplasmic (β -tubulin and GFAP) and nuclear (NeuN) proteins.

(B) Nuclear extracts from rat hypothalamus were immunoprecipitated (IP) with anti-CNTFR α , anti-LIFR or anti-gp130. The precipitates were then immunoblotted with anti-gp130, CNTFR α or LIFR. Arrowheads indicate the level of the immunoblotted receptors. The other bands may correspond to immunoglobulins. MW, molecular weight marker.

Figure 6. CNTF specifically stimulates POMC transcription in hypothalamic isolated nuclei.

Isolated nuclei were obtained from five individual fresh rat hypothalami and subjected to a Run on reaction in the presence or not of CNTF (1 nM) or leptin (10 nM) for 45 min at 22°C. Nascent RNA were reverse transcribed and qRT-PCR based on nuclear run-on technique was performed. Displayed values are means \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to control condition with a paired Student's t-test. $n = 5$ rats.

Figure 7. CNTF stimulates Akt signaling in hypothalamic isolated nuclei.

Isolated nuclei were obtained from individual fresh rat hypothalami and incubated in the presence or not of ATP (5 μ M), CNTF (1 nM) and leptin (10 nM) for 10 min at 37°C. They were then subjected to a SDS-PAGE and Western blot analysis.

(A) Nitrocellulose membranes were blotted with an anti-pJAK-2 or an anti-pAkt before being stripped and blotted a second time with an anti-total (tot) JAK2 or an anti-total (tot) Akt.

(B) Quantification of the blots. The data are presented as the percentage of control condition \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared to control condition with paired Student's t-test. $n=10$ rats.

Figure 1

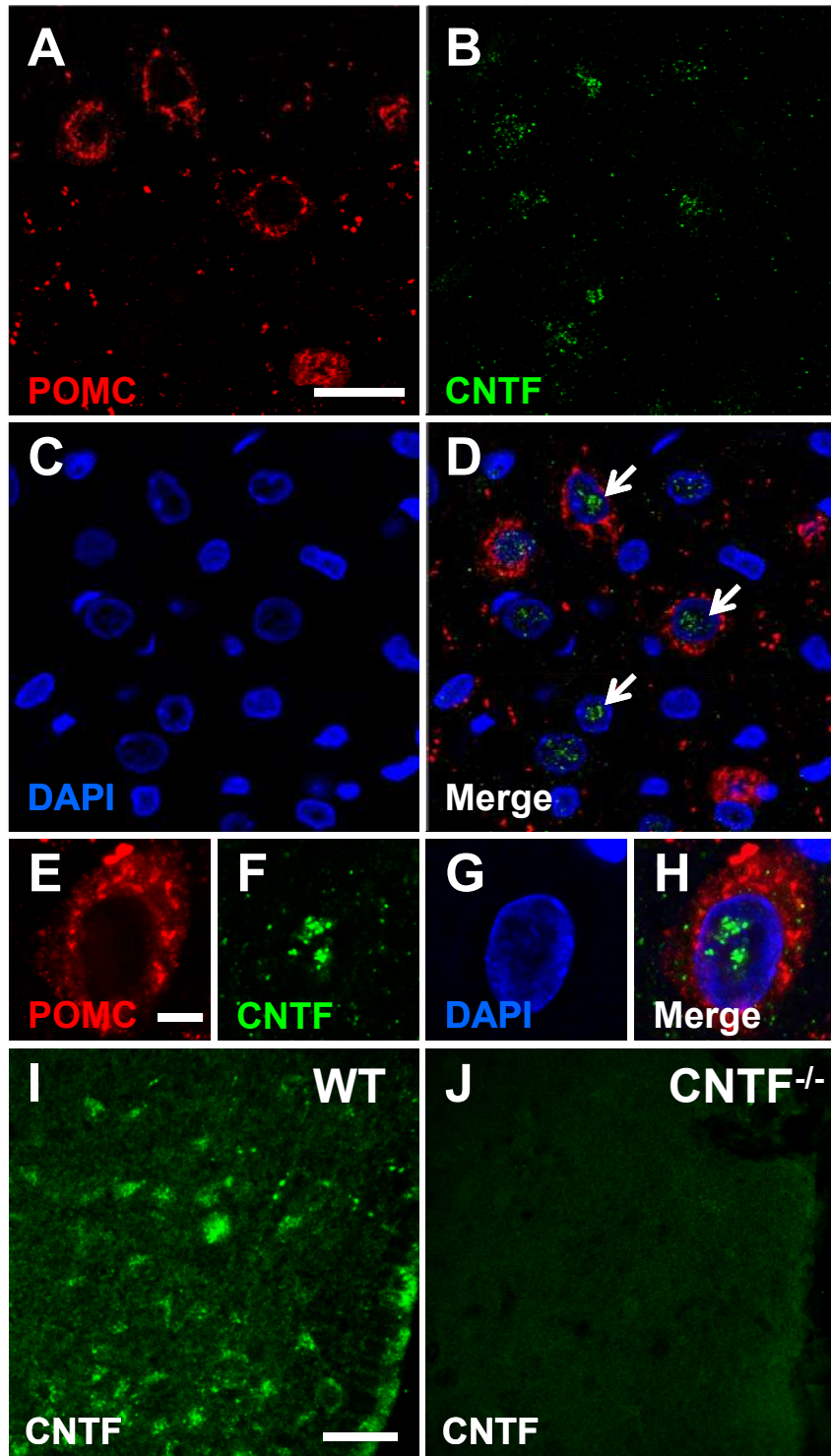


Figure 2

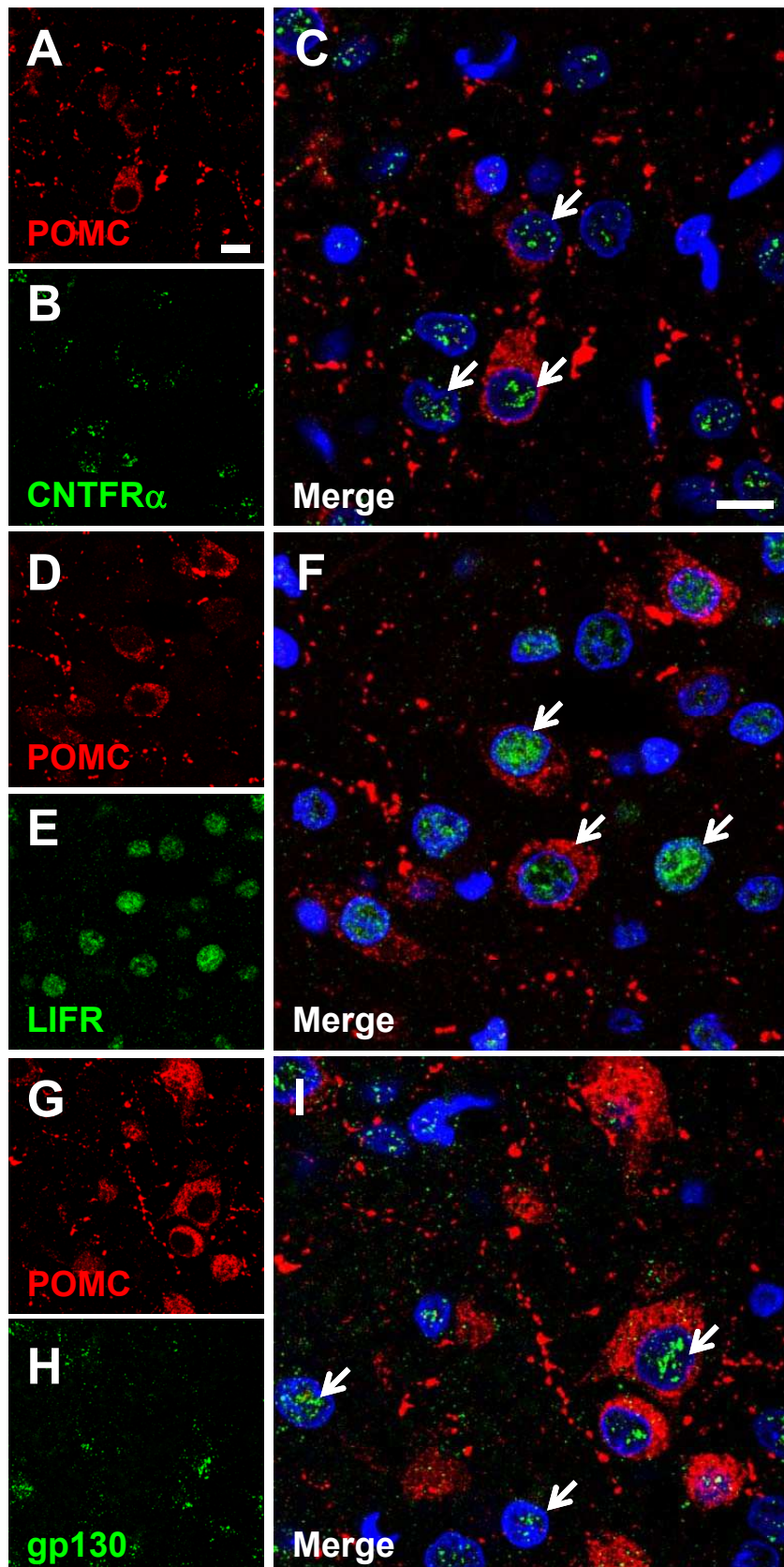


Figure 3

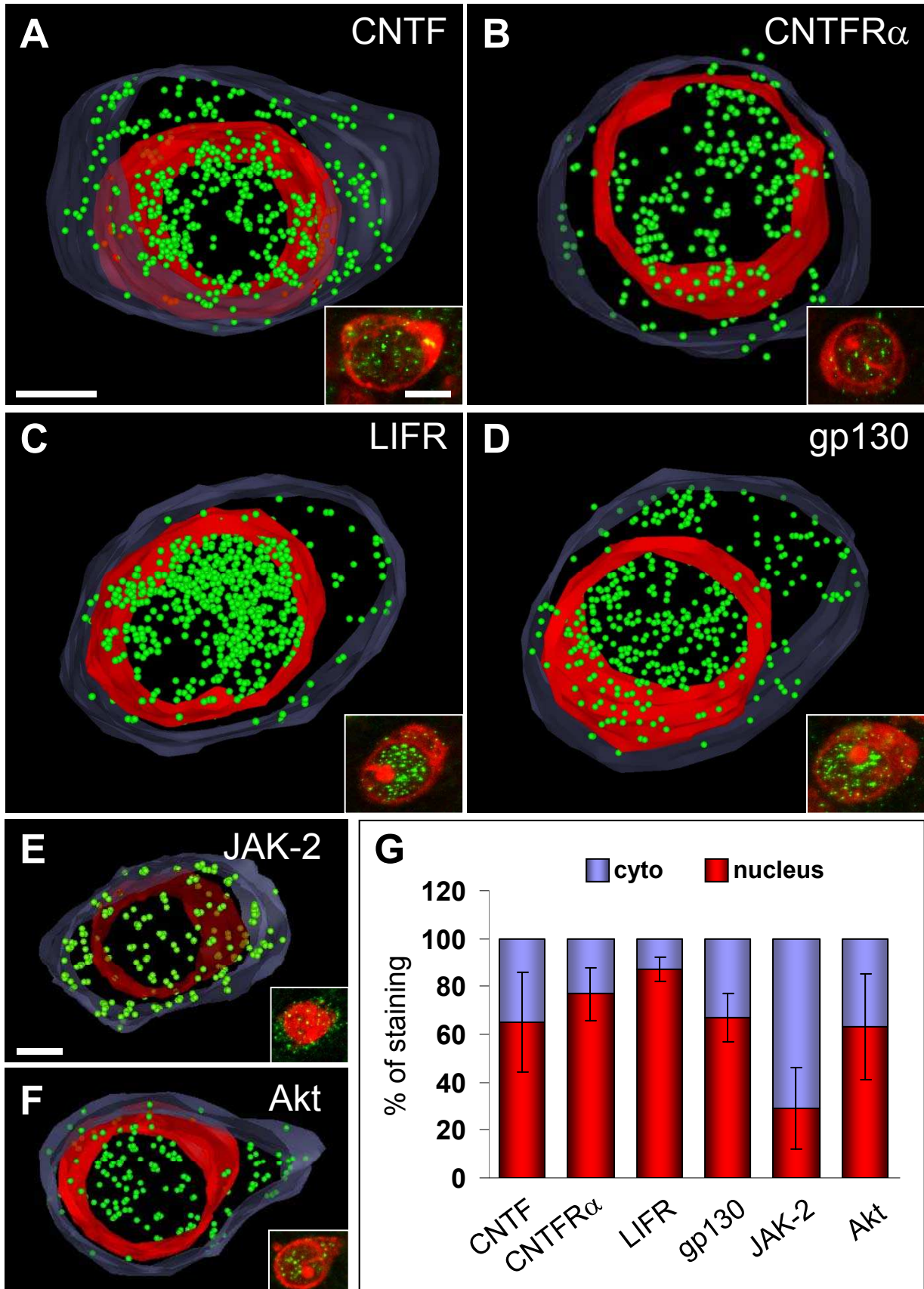


Figure 4

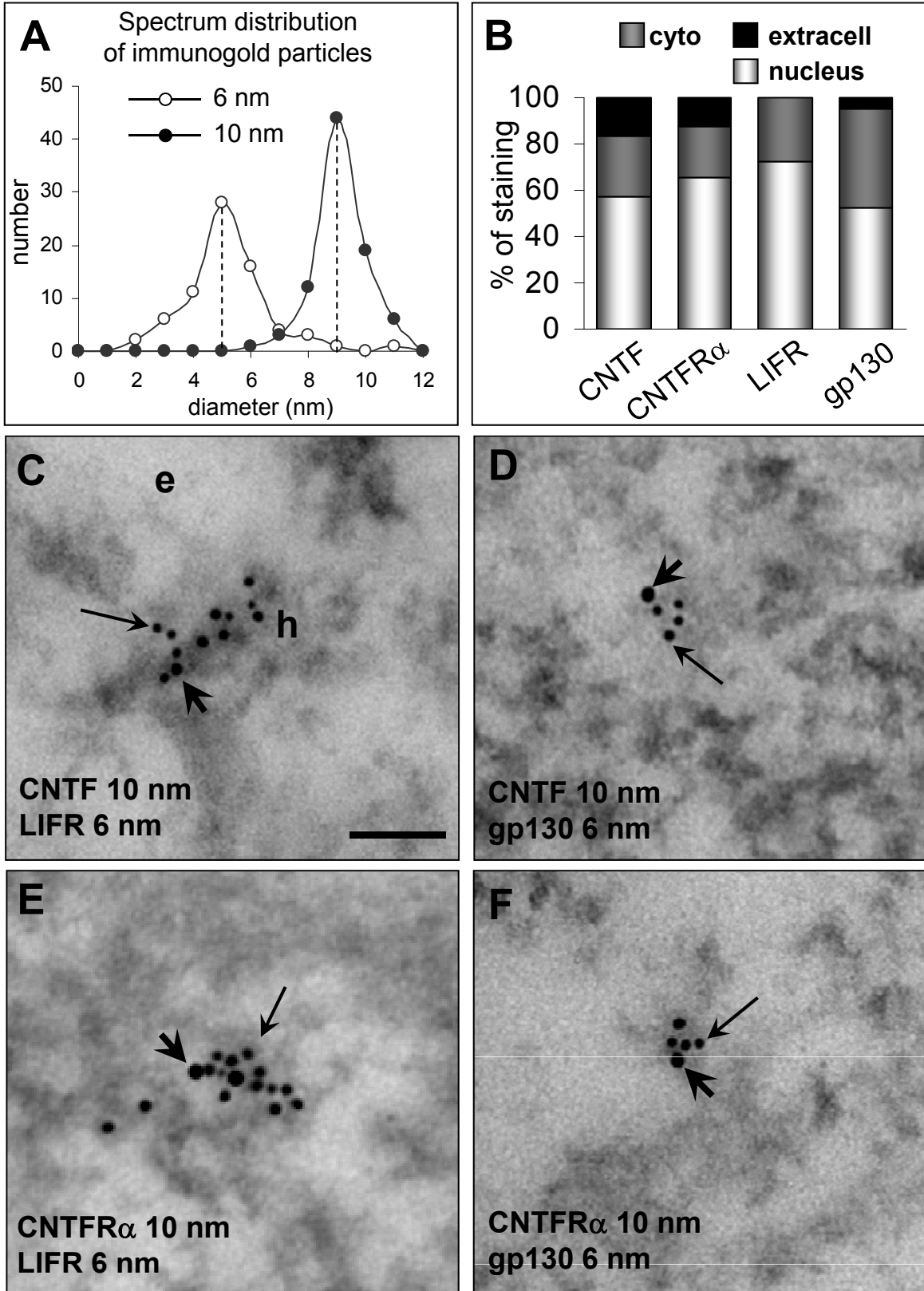


Figure 5

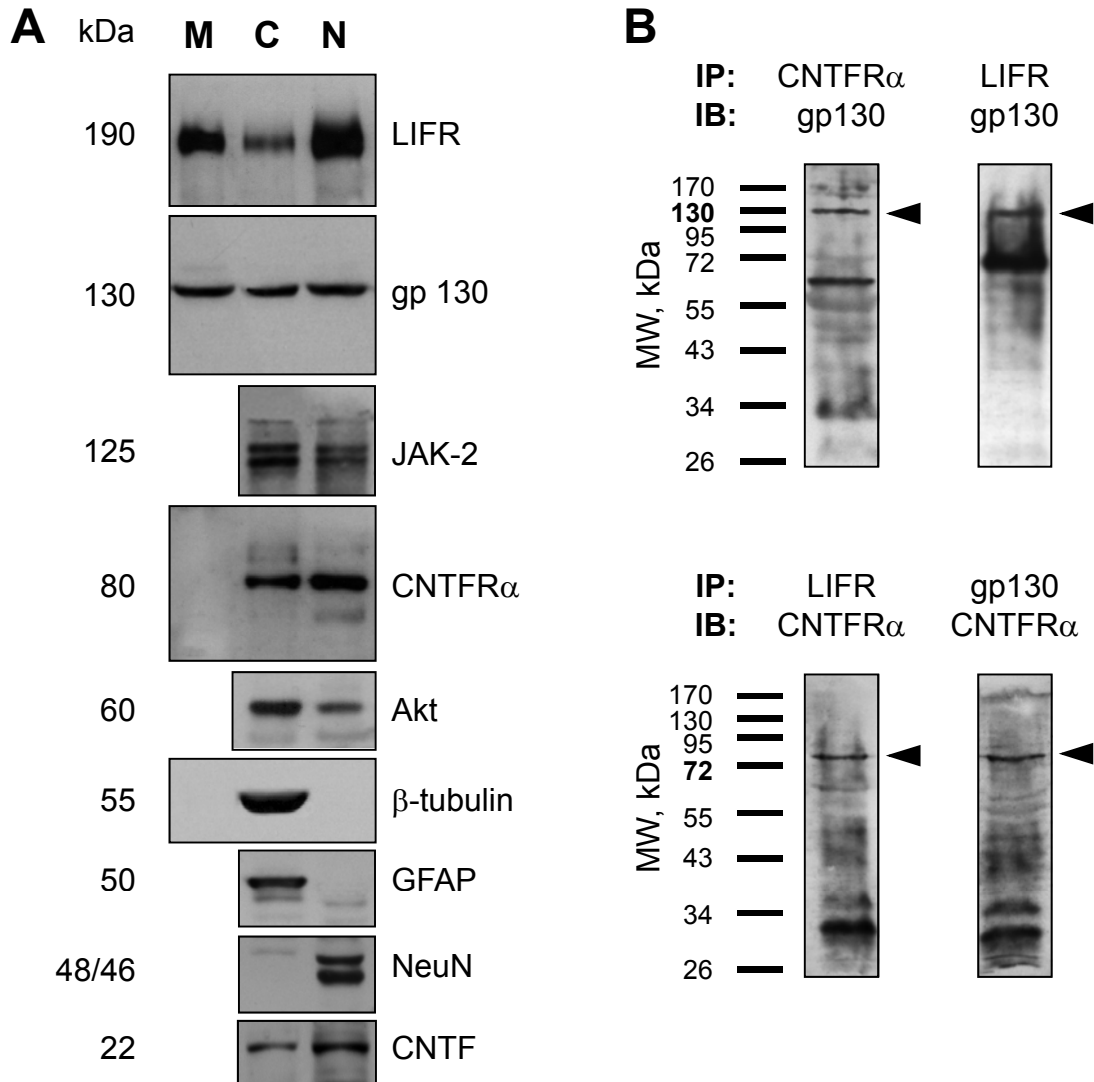


Figure 6

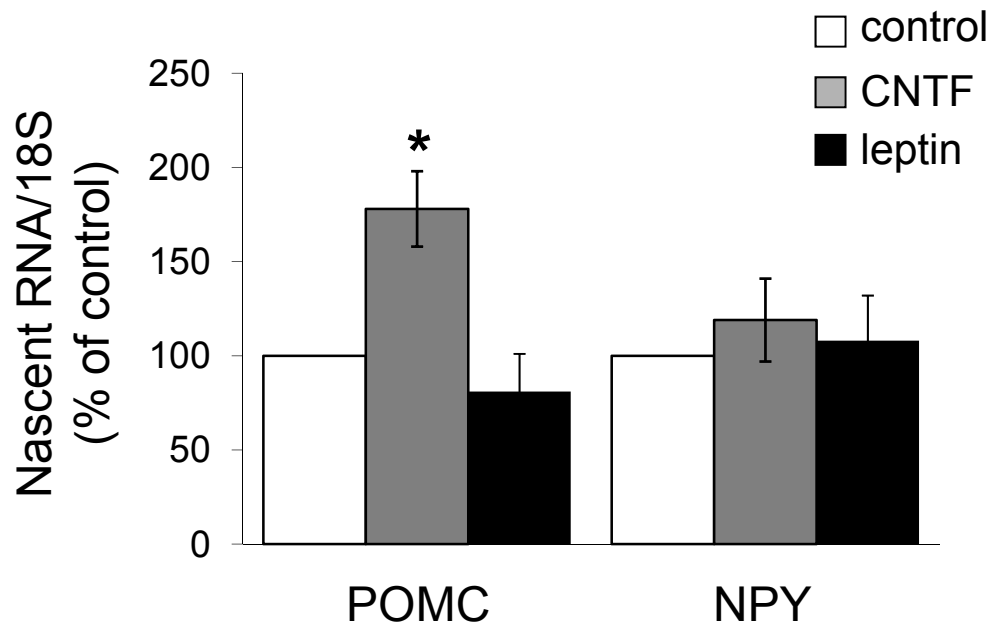
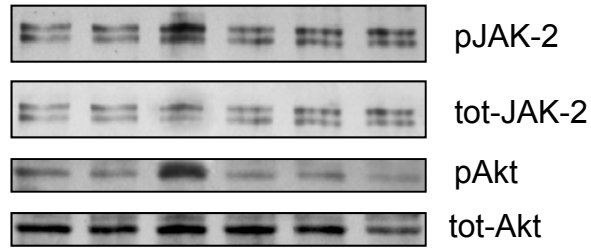


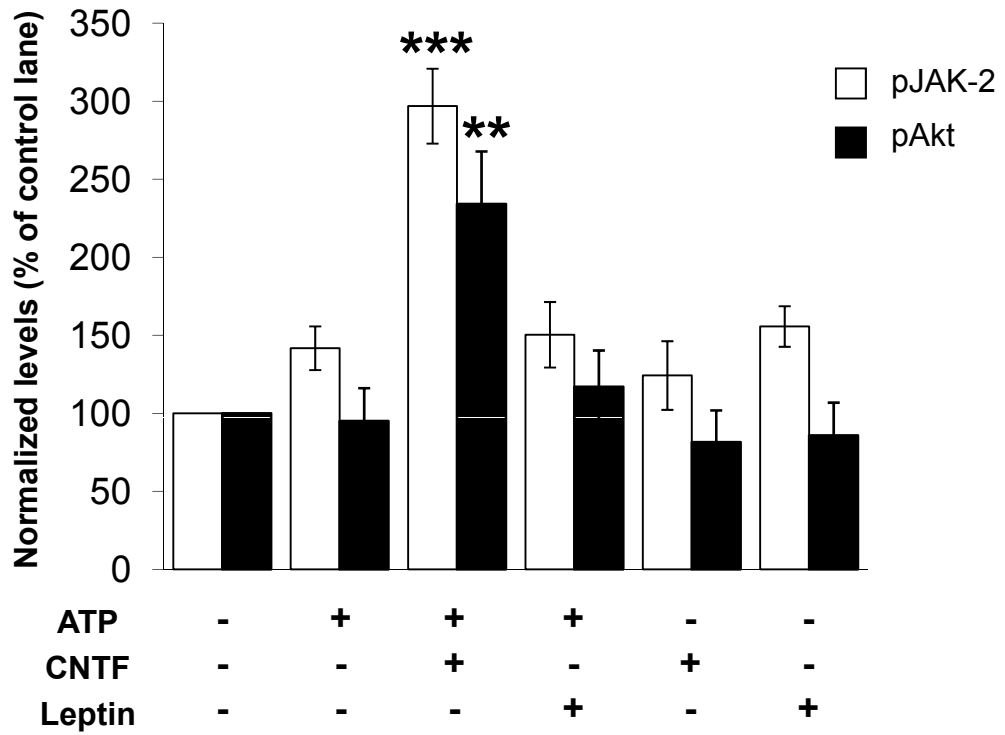
Figure 7

A

ATP	-	+	+	+	-	-
CNTF	-	-	+	-	+	-
Leptin	-	-	-	+	-	+



B



Principaux résultats

Le but de cette seconde étude était de vérifier les potentiels mécanismes d'action intracellulaires du CNTF.

Nos données ont montré que :

- le CNTF et ses sous-unités réceptrices étaient exprimés aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau des neurones POMC du noyau arqué de rat, suggérant une translocation cyto-nucléaire des protéines
- les sous-unités réceptrices du CNTF pouvaient interagir dans le noyau
- la stimulation de fractions nucléaires avec une solution de CNTF induisait l'activation des protéines JAK-2 et Akt, ainsi que la transcription du gène codant POMC

Discussion

Etude 1

- 1. Caractéristiques du régime HF**
- 2. Impact du de régime maternel HF sur la descendance**

Mots clefs : protection - phénotype gaspilleur - organisations gliales

Etude 2

Mots clefs : noyau arqué - compartiment nucléaire – JAK-2 - Akt - POMC

Le maintien de l'homéostasie énergétique est soumis à de nombreuses régulations, notamment au niveau central, où la leptine est considérée comme un facteur crucial. Certaines situations pathologiques telles que l'obésité échappent cependant à ces mécanismes de contrôle.

Etude 1

Le premier objectif de ce travail de thèse a été d'étudier l'impact du régime maternel HF, sur la prédisposition de la descendance à développer l'obésité associée à une altération des facteurs hypothalamiques impliqués dans la régulation de la balance énergétique. En effet, si les facteurs responsables de l'installation de l'obésité sont variés, l'environnement périnatal est maintenant reconnu comme une période critique dans la genèse de la maladie (Eckel, 2005; McMillen and Robinson, 2005; Plagemann, 2006; Vickers et al., 2007) Le concept de programmation métabolique fait aussi l'hypothèse que l'alimentation maternelle créerait une empreinte épigénétique chez le fœtus et le nouveau-né, modifiant ainsi durablement son métabolisme (Harding et al., 2001; Junien et al., 2005).

Nos données montrent que le régime maternel HF « protégerait » la descendance contre le développement de l'obésité induite par un régime hautement palatable. Cette protection serait par ailleurs plus importante chez la descendance femelle que chez la descendance mâle, laquelle présenterait quant à elle des dépenses énergétiques accrues, signes d'un « phénotype gaspilleur », ainsi que des modifications cytoarchitectoniques dans le noyau arqué.

1. Caractéristiques du régime High-Fat (HF)

L'étude des paramètres morphologiques des animaux dans notre modèle de programmation métabolique a révélé que les rates nourries avec le régime HF présentaient un léger surpoids corporel, bien que significatif, avant la conception (soit après 6 semaines de régime HF). Cette différence s'atténuait au cours de la gestation comme précédemment observé chez Guo et Jen (1995). De plus, elles adaptaient strictement leur prise alimentaire à l'apport énergétique des animaux contrôles. Plusieurs études de la littérature avaient fait la même observation, suggérant que les éventuelles modifications observées chez la descendance résultent de la qualité nutritive du régime maternel plutôt que des apports énergétiques *per se* (Del Prado et al., 1997; Guo and Jen, 1995; Langley-Evans, 1996; Taylor et al., 2003).

A la naissance, les descendants des rates HF présentaient un poids corporel significativement plus faible que celui des contrôles. Ce retard de croissance était partiellement compensé à

l'âge adulte. Si ces données confirment les résultats obtenus lors d'une précédente étude (Ferezou-Viala et al., 2007a), elles sont en désaccord avec celles de Guo & Jen démontrant que le régime maternel HF était associé à un poids plus élevé chez la descendance dès le 20^{ème} jour postnatal (Guo and Jen, 1995). Cette différence peut s'expliquer par la divergence des protocoles expérimentaux, puisque les travaux de Guo & Jen s'appuient sur un modèle de portées réduites (n=6) tandis que les portées de notre modèle avaient été normalisées (n=10), limitant la possibilité d'un « rattrapage de croissance précoce » (*catch-up*). Par ailleurs, dans notre étude, les rates nourries avec le régime HF présentaient une perte de poids drastique pendant la seconde moitié de la lactation suggérant probablement une altération des apports alimentaires fournis à la descendance. Le lait maternel véhicule non seulement les nutriments nécessaires à la croissance, mais aussi des facteurs neurotrophiques essentiels au développement et à la maturation des noyaux hypothalamiques régulant l'homéostasie énergétique de la descendance (Bautista et al., 2008; Bouret et al., 2004; McMillen and Robinson, 2005; Miralles et al., 2006). La période postnatale apparaît donc comme une période critique dans notre modèle de programmation métabolique, à laquelle nous porterons plus d'attention dans la suite de ce chapitre.

2. Impact du régime maternel HF sur la descendance

Un régime alimentaire de haute palatabilité (régime P) a été utilisé pour tester la susceptibilité de la descendance de rates nourries avec un régime HF à développer une obésité à l'âge adulte. Le régime P est riche en saccharose et constitue une alternative au régime cafeteria décrit dans la littérature (Holemans et al., 2004). Il induit une obésité massive lorsqu'il est administré à des rates Wistar [(Couvreur et al., 2011), Expérience n°1].

Nous avons observé que le régime P induisait une prise de poids significative chez les animaux nés de mères contrôles, et non chez les descendants de mères HF. Ce résultat suggère que le régime maternel HF est susceptible de protéger la descendance contre la prise de poids induite par un régime P. Cette hypothèse avait déjà été formulée lors d'une précédente étude menée au laboratoire dans laquelle l'impact du régime maternel HF sur la prédisposition à développer l'obésité en présence d'un régime HF cette fois, administré depuis le sevrage, avait été apprécié (Ferezou-Viala et al., 2007a). Nos données suggèrent donc que le régime maternel HF protégerait la descendance contre la prise de poids induite par un régime hyperlipidique (Ferezou-Viala et al., 2007) comme hyperglucidique (Couvreur et al., 2011), que celui-ci soit administré dès le sevrage ou à l'âge adulte. La composition du

régime maternel HF, exclusivement constitué de lipides d'origine végétale (huile de palme majoritairement et huile de colza) est pauvre en cholestérol contrairement aux régimes HF classiquement décrits. A notre connaissance, cette donnée n'a pas encore été rapportée par la littérature.

Par ailleurs, les femelles nées de mères HF présentaient un gain de poids significativement moins important que celui des mâles, suggérant l'existence d'un dimorphisme sexuel dans la protection induite par le régime maternel HF. Plusieurs études rendent compte de l'existence de différences sexe-dépendantes dans la régulation du poids corporel et des paramètres métaboliques et endocriniens (Hanson and Gluckman, 2005; Zambrano et al., 2006). Ces différences physiologiques pourraient toucher aussi bien les neurones que les astrocytes du noyau arqué (Mong and McCarthy, 2002).

Dans la suite de ce chapitre, nous discuterons essentiellement des résultats obtenus chez la descendance mâle. A l'âge de 3 mois.

Le « phénotype gaspilleur »

Les mesures de prise alimentaire réalisées chez les descendants adultes de mères HF ont montré que les mâles présentaient des apports énergétiques significativement supérieurs à ceux de leurs contrôles bien que présentant un retard de croissance toujours significatif de l'ordre de 17% par rapport à ces derniers et suggérant donc l'acquisition d'un « phénotype gaspilleur ». Renforçant ce concept, les rat issus de mères HF et soumis au régime P présentaient une augmentation des niveaux d'expression hépatique de AdipoR2 par rapport aux autres groupes. Majoritairement exprimé dans le foie, AdipoR2 stimule la β oxydation des acides gras et la diminution de la triglycémie (Kadowaki and Yamauchi, 2005), ce qui est en accord avec nos données puisque ces animaux présentaient un poids corporel et une triglycémie plus faibles. L'hypothèse du « phénotype gaspilleur », image en miroir du « phénotype économe » décrit par Barker, n'a pas encore été évoquée chez l'homme ; en revanche certaines études menées chez le rongeur rapportent son existence (Ferezou-Viala et al., 2007a; Gallou-Kabani et al., 2007). Nous ne pouvons donc exclure que ce type d'adaptation soit également envisageable chez l'humain.

L'analyse des niveaux d'expression génique des marqueurs de l'homéostasie énergétique dans l'hypothalamus chez ces animaux a révélé que le régime P n'altérait pas l'expression hypothalamique de UCP2 chez la descendance HF. Bien que le rôle d'UCP2 soit encore

controversé, de récentes études lui attribuent un rôle inhibiteur dans l'activation glucose- ou leptine-dépendante des neurones POMC. On peut alors supposer que des niveaux élevés d'UCP2 limitent les capacités d'activations des neurones POMC en fonction du statut énergétique (Mountjoy, 2010). Ainsi, le régime maternel HF pourrait permettre de conserver la sensibilité des neurones POMC chez la descendance soumise à un régime P.

Organisations cellulaires

Des études préliminaires menées au laboratoire ont montré que le régime maternel HF était susceptible de modifier l'organisation cytoarchitectonique de la descendance. Parmi les différents paramètres étudiés, les modifications durables concernaient l'organisation des astrocytes, cellules gliales capables de contacter les capillaires cérébraux *via* leurs prolongements (Kacem et al., 1998; Somjen, 1988).

A l'échelle cellulaire, nous avons observé que le régime maternel HF était lié à une organisation précoce et durable des prolongements astrocytaires autour des vaisseaux sanguins dans le noyau arqué de la descendance mâle, suggérant une sensibilité particulière de ces cellules aux modifications de l'environnement maternel. De nombreuses études ont montré que les astrocytes étaient des cellules dynamiques capables de moduler la façon dont l'information est générée et disséminée dans le cerveau (Haydon and Carmignoto, 2006).

Dans l'hypothalamus, ces cellules influencent la transmission synaptique et la neurosécrétion (Garcia-Segura and McCarthy, 2004; Hatton, 1997; Ojeda et al., 2006; Oliet, 2002; Theodosis, 2002). A côté des contacts qu'ils forment autour des synapses, les astrocytes enveloppent également les capillaires sanguins et les artérioles du système nerveux (Haydon and Carmignoto, 2006; Nedergaard et al., 2003). L'étendue et la distribution de ces contacts suggère l'existence d'unités gliovasculaires qui pourraient participer activement au fonctionnement cérébral (Nedergaard et al., 2003), en dialoguant *via* la libération de signaux endothéliaux et gliaux (Haydon and Carmignoto, 2006) et en participant à la formation de la BHE (Ballabh et al., 2004).

Nous nous sommes intéressés à la période d'acquisition du phénotype astrocytaire précédemment décrit. Chez le rongeur, le développement et la maturation des astrocytes du noyau arqué se font principalement pendant la période postnatale (Suarez et al., 1987). D'autre part, une étude de l'expression de la GFAP dans le noyau arqué de rat pendant la

période postnatale a montré que les niveaux géniques et protéiques de la GFAP augmentaient à partir du 14^{ème} jour postnatal (P14) (Couvreur et al., en préparation). Nous avons donc utilisé un second protocole d'administration du régime maternel, donné aux rates uniquement pendant la lactation selon le protocole dit « court ». A ce jour peu d'équipes s'intéressent à la programmation métabolique au cours de la période postnatale uniquement. La stratégie que nous avons utilisée est une alternative au protocole de « croisement des portées » notamment décrit dans les travaux de Khan et de ses collaborateurs (Khan et al., 2005).

Nos données ont montré que le régime maternel HF administré aux rates pendant la période postnatale uniquement (protocole dit « court ») induisait chez la descendance au sevrage comme à l'âge adulte, des organisations des prolongements astrocytaires similaires à celles observées lorsque le régime était donné pendant les périodes gestationnelles et postnatales (protocole dit « long »). L'organisation de la couverture astrocytaire provoquée par le régime maternel HF serait donc induite pendant la lactation. En effet, la même étude reproduite chez le rat DIO dont l'environnement nutritionnel avait été perturbé à l'âge adulte, n'a pas affecté l'organisation périvasculaire, bien qu'une certaine plasticité astrocytaire ait été maintenue [; [(Vacher et al., 2008) ; données du laboratoire]. Ces données suggèrent donc que la période postnatale représenterait une fenêtre critique pour le développement des projections astrocytaires périvasculaires.

Les immunomarquages lectine et laminine, marqueurs des cellules endothéliales et de la lame basale respectivement, ont révélé qu'il n'y avait pas de modification de la vascularisation chez les animaux issus de mère HF, suggérant que les réorganisations cellulaires mises en évidence étaient dues aux seules modifications astrocytaires. Par ailleurs, nous avons montré que le régime maternel HF n'avait pas d'incidence sur la densité des cellules astrocytaires, mises en évidence par un immunomarquage S100 β , indiquant que seule la morphologie des cellules serait modifiée. Des données de la littérature montrent en effet que l'activation des astrocytes dans des situations pathologiques variées (ischémie, maladies neurodégénératives...) pouvait induire une variation minime de la densité cellulaire (Kalman et al., 2004) et proposent donc que les réactions astrocytaires observées dans une structure cérébrale seraient liées à des modifications de la morphologie des astrocytes de la région considérée (Eddleston and Mucke, 1993).

L'activité neuronale du noyau arqué dépend, comme nulle part ailleurs dans l'encéphale, des multiples messagers hormonaux et métaboliques circulants (glucose, acides gras libres, acides

aminés, insuline, leptine,...). L'accessibilité de ces molécules au noyau arqué représente donc un point névralgique dans la régulation du métabolisme énergétique par cette structure.

Les modifications morphologiques observées nous ont amenés à étudier les conséquences potentielles sur l'accès des signaux au noyau arqué. En effet, des changements d'activation ou de morphologie des astrocytes seraient susceptibles d'avoir des conséquences sur la sensibilité de l'hypothalamus aux signaux périphériques (Garcia-Caceres et al., 2011). Plus spécifiquement, l'une des hypothèses avancées pour expliquer les mécanismes qui sous-tendent l'installation de la leptino-résistance repose sur un défaut de passage de la leptine à travers la BHE (Banks et al., 1999; Burguera et al., 2000; Hileman et al., 2002; Kastin and Pan, 2000; Pan et al., 2008b). Si le rôle des astrocytes dans ce processus n'a pas encore été déterminé, l'expression accrue du récepteur de la leptine dans les astrocytes de l'hypothalamus chez des souris obèses laisse supposer que ces cellules pourraient participer au transport de l'hormone du sang vers le cerveau ou au sein du parenchyme nerveux lui-même (Hsuchou et al., 2009a). Les réorganisations cellulaires observées dans notre modèle pouvant suggérer des modifications de structure de la BHE, nous avons étudié l'intégrité de cette dernière au moyen d'un colorant, le bleu trypan, injecté par voie transcardiaque aux animaux (Eizayaga et al., 2006; Reynolds and Morton, 1998).

Les données obtenues ont montré que le régime maternel HF induisait une augmentation significative de la diffusion du bleu trypan dans le noyau arqué. En se fixant aux protéines plasmatiques telles que l'albumine, le bleu trypan permet de mesurer le taux d'endocytose adsorptive des molécules (Stopa et al., 2006). Ce dernier résultat suggère un passage du sang vers le parenchyme nerveux facilité chez les animaux nés de mère HF. A ce jour, le mécanisme de transport de la leptine à travers la BHE n'a pas encore été clairement défini. L'une des hypothèses propose une internalisation de l'hormone avec son récepteur ObRa (Bouret, 2008), un mécanisme similaire ayant par ailleurs été décrit pour l'insuline (Abbott et al., 2006). L'ensemble de nos résultats indique que le régime maternel HF induit une organisation astrocytaire périvasculaire facilitant l'endocytose de molécules dont la nature reste à identifier et les mécanismes à approfondir.

Le régime maternel HF étant susceptible d'induire des modifications astrocytaires, qu'en est-il des autres paramètres gliaux ? Les vaisseaux sanguins ne constituent en effet qu'une voie d'entrée vers le noyau arqué, le 3^{ème} ventricule en constitue une deuxième. Le noyau arqué comporte des cellules gliales caractéristiques bordant le 3^{ème} ventricule, appelées tanocytes,

qui présentent des propriétés en partie communes aux astrocytes et à la glie radiaire mais aussi une morphologie cellulaire unique. Les corps cellulaires des tanocytes sont situés le long du 3^{ème} ventricule dont ils constituent la bordure, tandis que leurs prolongements s'enfoncent dans le parenchyme nerveux. Chaque cellule émet un prolongement unique, à la différence des astrocytes (Rodriguez et al., 2005). Les tanocytes constituent une population hétérogène dont quatre types cellulaires ont été identifiés dans l'hypothalamus de rat : $\alpha 1$, situés dans les noyaux dorso-et ventromédians ; $\alpha 2$, situés dans le noyau arqué ; $\beta 1$, qui constituent une barrière entre le noyau arqué et l'éminence médiane ; et $\beta 2$, appartenant à l'éminence médiane.

Nous avons mis en évidence les tanocytes du noyau arqué par l'immunomarquage de la vimentine, protéine des filaments intermédiaires du cytosquelette (Leonhardt et al., 1987). Nos résultats ont montré que le régime maternel HF augmentait la couverture tanocytaire dans le noyau arqué de la descendance. Etant donné leur localisation, les tanocytes mis en évidence seraient probablement de type $\alpha 2$. Ces cellules présentent la particularité de conserver des propriétés neurogéniques (Xu et al., 2005). En effet, les tanocytes hypothalamiques sont les seules cellules ayant pour origine la glie radiaire conservées à l'âge adulte. Des études de la neurogenèse après destruction des neurones du noyau arqué entre P15 et P30 ont montré la formation de cellules de phénotype neuronal et astrocytaire dans la couche cellulaire des tanocytes $\alpha 2$ (Rodriguez et al., 2005). Cette population tanocytaire serait aussi impliquée dans la détection du glucose présent dans le LCR (Garcia et al., 2001). Les tanocytes $\alpha 2$ comme $\beta 1$ expriment en effet le transporteur de glucose Glut-1. L'immunomarquage de cette protéine dans le noyau arqué a montré que la surface Glut-1-positive était significativement accrue chez les rats issus de mère HF, donnée en accord avec l'augmentation de la surface vimentine-positive. Glut-1, exprimé non seulement au niveau des tanocytes mais aussi dans les capillaires cérébraux s'avère être un marqueur de la BHE (Norsted et al., 2008). Nos données pourraient donc suggérer une réorganisation des tanocytes afin de faciliter le transport du glucose du LCR vers le parenchyme nerveux. La signification physiologique de ces modifications reste à définir, néanmoins, le glucose étant le principal substrat énergétique de l'encéphale, un transport accru pourrait refléter une activité nerveuse elle aussi accrue (Magistretti, 2006). Dans l'état de nos connaissances il ne nous est cependant pas possible de répondre à cette question.

Les mécanismes sous-tendant la programmation métabolique ne sont pas identifiés à ce jour, néanmoins, la leptine pourrait être l'un des acteurs de ce processus. En effet, pendant la gestation, l'hormone est capable de traverser la barrière foeto-placentaire (Smith and Waddell, 2003) et est aussi véhiculée par le lait maternel pendant la lactation (Bautista et al., 2008). Ainsi, des modifications de la leptinémie maternelle seraient susceptibles d'avoir des retombées sur le développement de la descendance. La reproduction du phénotype économe chez l'animal (Stocker et al., 2005; Vickers et al., 2000) a permis de démontrer que ce phénotype serait dû à un défaut développemental lié à un manque de leptine lors de périodes cruciales de la formation des réseaux neuronaux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire (Bouret et al., 2004; Simerly, 2005). A l'inverse, un environnement hyperleptinémique en période périnatale (diabète gestationnel, suralimentation des nouveau-nés) prédisposerait aussi à développer par la suite un syndrome métabolique : ce modèle a été validé chez le rat rendu susceptible de développer une obésité à l'âge adulte s'il est traité par la leptine en période néonatale (Toste et al., 2006).

L'utilisation du modèle « Zucker » possédant un récepteur de la leptine non fonctionnel présentant une réorganisation astrocytaire périvasculaire similaire à celle induite par le régime maternel HF, suggère l'implication de la signalisation leptine dans ce mode de plasticité hypothalamique. Des études récentes ont démontré que la morphologie astrocytaire dans l'hypothalamus pouvait être modifiée par la leptine (Garcia-Caceres et al., 2011), l'implication de l'hormone dans notre modèle d'étude semble donc être d'un intérêt majeur pour le futur.

La programmation métabolique de l'altération de l'homéostasie énergétique représente donc une situation physiopathologique parmi d'autres. Etudier les facteurs impliqués dans la genèse de cette pathologie ainsi que les potentiels agents thérapeutiques constitue donc un enjeu majeur. D'abord étudié pour ses propriétés neurotrophiques dans le ganglion sympathique, le rôle du CNTF dans le contrôle de l'homéostasie énergétique s'est depuis dessiné.

Etude 2

CNTF et contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique

Dans ce second travail, nous avons étudié les mécanismes d'action du CNTF dans le maintien de l'homéostasie énergétique. La littérature s'est attachée depuis une dizaine d'années à décrire l'effet de cette cytokine sur la prise alimentaire et le poids corporel (Ambati et al., 2007; Gloaguen et al., 1997; Lambert et al., 2001; Xu et al., 1998). Il est désormais connu que le CNTF exogène exerce une action anorexigène, même en cas de résistance à la leptine dont il partage de nombreuses voies de signalisation. De plus des études récentes suggèrent que le CNTF endogène pourrait être impliqué dans le contrôle de la balance énergétique (Heidema et al., 2010; O'Dell et al., 2002; Vacher et al., 2008).

Toutefois, les mécanismes d'action du CNTF restaient à ce jour mal compris. En effet, le CNTF présente la particularité d'être dénué de peptide signal et ne peut donc être sécrété selon les voies classiques d'exocytose. Parmi les différentes hypothèses formulées (libération dans le milieu extracellulaire après lyse de la cellule, sécrétion du CNTF lié aux formes solubles de ses sous-unités réceptrices), l'une d'entre elle suggérait un rôle intracellulaire pour cette cytokine (Monville et al., 2002), lequel a été validé *in vitro*. Dans cette seconde étude, nous avons donc souhaité vérifier cette hypothèse *in vivo*.

Nos résultats ont montré que le CNTF était capable d'interagir avec ses sous-unités réceptrices dans le noyau des cellules du noyau arqué, d'y activer certaines des voies de signalisations qui lui sont associées et d'activer l'expression de POMC.

Une précédente étude menée au laboratoire s'était attachée à caractériser la distribution cellulaire du CNTF dans le noyau arqué et avait montré que la cytokine était exprimée par 90% des astrocytes et 75% des neurones de cette structure (Vacher et al., 2008). En revanche, la distribution subcellulaire du CNTF dans les cellules du noyau arqué n'était pas encore connue. Des analyses en microscopies confocale et électronique à transmission ont montré que le CNTF pouvait être localisé dans le cytoplasme et le noyau des cellules du noyau arqué. Ces localisations dans les différents compartiments cellulaires pourraient suggérer un mécanisme d'action intracellulaire du CNTF, comme cela a été décrit pour d'autres molécules telles que le LIF, l'insuline ou la leptine (Re and Cook, 2006). La littérature montre qu'une localisation nucléaire du CNTF avait déjà été observée dans le bulbe olfactif (Asan et al., 2003; Langenhan et al., 2005), le cortex cérébral, l'hippocampe, le locus coeruleus, le cervelet

ou encore la substance noire (Bajetto et al., 2000; Bajetto et al., 1999), bien que le rôle du CNTF dans le noyau cellulaire de ces structures n'aie pas été défini.

Nos données ont montré que les sous-unités réceptrices du CNTF étaient localisées à la membrane plasmique, mais aussi dans les compartiments cytosoliques et nucléaires des cellules du noyau arqué. A ce jour, parmi ces trois sous-unité réceptrices, seule la présence du LIF-R avait été mise en évidence dans le compartiment nucléaire (Gouin et al., 1999), les distributions subcellulaires de gp130 et CNTFR α n'ayant pas encore été décrites à notre connaissance. Toutes les données obtenues en microscopie confocale et électronique à transmission ont été validées par des reconstructions tri-dimensionnelles en microscopie confocale ainsi que par des détections en *western blot* des protéines d'intérêt sur des fractions membranaires, cytoplasmiques et nucléaires.

La distribution du CNTF et de ses sous-unités réceptrices dans le cytoplasme et le noyau des cellules du noyau arqué suggèrerait l'existence de transports entre les deux compartiments cellulaires. Le mécanisme classique du transport cyto-nucléaire nécessite la reconnaissance d'un signal de localisation nucléaire de la protéine « cargo » par une importine, protéine associée au complexe du pore nucléaire, suivie par la translocation de la protéine « cargo » dans le noyau. Une fois la translocation effectuée, le complexe s'associe à la protéine Ran dans le nucléoplasme et libère l'importine qui est recyclée dans le cytoplasme (Azuma and Dasso, 2000; Goldfarb et al., 2004; Poon and Jans, 2005). A côté de ce mécanisme conventionnel de translocation cyto-nucléoplasmique ont été décrits d'autres types de transports, dépendant des éléments du cytosquelette (Campbell and Hope, 2003; Giannakakou et al., 2000; Lam et al., 2002; Poon and Jans, 2005), pour des virus ou des protéines appartenant au cycle cellulaire; ou encore pour des protéines, comme le CNTF, dénuées de peptide signal. L'un des exemples les plus étudiés pour cette dernière catégorie est celui de la β -caténine, qui ne présente pas de peptide signal passe dans le noyau en se fixant à d'autres protéines cytoplasmiques (Huber et al., 1996; Kim and Hay, 2001) ou en liant directement les protéines des pores nucléaires (Izaurralde et al., 1999). A ce jour, les mécanismes de translocation cyto-nucléoplasmique du CNTF ne sont pas connus, bien que quelques études mentionnent l'existence d'un transport facilité thermosensible dans l'ovocyte de xénope et les astrocytes (Bajetto et al., 2000; Bajetto et al., 1999). Nos données de microscopie électronique ayant mis en évidence le passage simultané du CNTF et de l'une de ses sous-unités réceptrice, le LIF-R, par un même pore nucléaire, cette observation pourrait suggérer une translocation

du ligand avec sa ou ses sous-unité(s) réceptrice(s) dans le noyau, mécanisme connu pour l'IL-1, autre protéine dénuée de peptide signal (Curtis et al., 1990).

Si le CNTF et ses récepteurs sont présents dans le compartiment nucléaire des cellules du noyau arqué, sont-ils pour autant capables de s'assembler pour former un complexe fonctionnel ? En effet, bien que le CNTF puisse occasionnellement se lier directement à gp130 ou LIF-R, la signalisation du CNTF nécessite la formation d'un complexe trimérique composé de LIF-R, gp130 et CNTFR α (Davis et al., 1993a; Davis et al., 1993b; Ip et al., 1993a). Notre étude a montré par des expériences de co-immunoprécipitation que les sous-unités réceptrices du CNTF interagissaient dans les fractions nucléaires isolées de l'hypothalamus. D'un point de vue fonctionnel, les conséquences de ces observations ont été testées en stimulant des fractions nucléaires d'hypothalamus avec une solution de CNTF ou de leptine, contrôle négatif de notre étude car partageant les mêmes voies de signalisation que le CNTF mais dont le récepteur n'a pas été mis en évidence dans le noyau des cellules hypothalamiques (données du laboratoire). Nos résultats ont montré qu'une stimulation des fractions nucléaires de l'hypothalamus avec une solution de CNTF induisait une augmentation des niveaux d'expression géniques du neuropeptide anorexigène POMC. Ce dernier résultat est en accord avec les données de la littérature qui ont montré que l'action anorexigène du CNTF était notamment assurée par une augmentation d'expression de POMC (Ambati et al., 2007; Janoschek et al., 2006). Par ailleurs, la détection du CNTF et de ses sous-unités réceptrices dans le compartiment nucléaire des neurones POMC du noyau arqué, confirmerait l'action privilégiée du CNTF dans le noyau de ces cellules. Nous nous sommes donc attachés à caractériser les voies de signalisation susceptibles d'intervenir dans ce processus. Nos données ont montré que le CNTF augmentait la phosphorylation de JAK-2 et de Akt dans des fractions nucléaires d'hypothalamus. Les protéines JAK-2 et Akt sont respectivement associées aux voies de transduction JAK-2/STAT3 et IRS/PI3K/Akt, toutes deux stimulées par le CNTF (Stahl and Yancopoulos, 1994). Nous avons validé la présence de JAK-2 et Akt dans le noyau des cellules hypothalamiques par des approches de microscopie et de biochimie sur fraction cellulaires. Ces données sont en accord avec celles de la littérature ayant montré l'existence d'une activation nucléaire d'Akt (Wang and Brattain, 2006) ; ainsi que d'une translocation de JAK-2 du cytoplasme vers le noyau (Qian et al., 2011; Zouein et al., 2011). De récentes études ont démontré que la régulation de la transcription de POMC dépendait des protéines situées en aval de la PI3K dans la voie de signalisation. Ainsi, la délétion de PDK1 (3-phosphoinositidedependent protein kinase 1),

dans les neurones anorexigènes induit une diminution de l'expression hypothalamique de POMC associée à une hyperphagie chez la souris (Belgardt et al., 2008; Iskandar et al., 2010). D'autre part, l'utilisation d'un modèle cellulaire qui n'exprime pas les sous-unités réceptrices CNTFR α et LIF-R dans le compartiment nucléaire, nous a permis de montrer que l'activation des protéines précédemment citées nécessitait la présence du complexe récepteur dans son intégralité dans le noyau des cellules. L'ensemble de ces données suggèrerait donc que le CNTF pourrait donc interagir avec ses sous-unités réceptrices et activer les éléments de signalisation qui leur sont associées dans le compartiment nucléaire des cellules hypothalamiques pour induire la transcription du gène codant POMC.

La compréhension du mécanisme d'action du CNTF a connu des avancées significatives ces dernières années. Récemment, une étude du laboratoire a montré l'existence d'une synthèse endogène de CNTF dans le noyau arqué de l'hypothalamus, susceptible de protéger certains individus contre la prise de poids induite par un régime P (Vacher et al., 2008). Si jusqu'à aujourd'hui les mécanismes d'action du CNTF n'étaient pas connus *in vivo*, notre étude propose désormais une action intracellulaire à cette cytokine, capable d'activer ses sous-unités réceptrices dans le noyau des neurones POMC du noyau arqué. Les conséquences d'un tel processus physiologiques restent à définir, de même que son devenir dans des conditions pathologiques, néanmoins, l'ensemble de nos données laisseraient entrevoir un nouveau mode d'action pour le CNTF, en proposant que le CNTF endogène participe au contrôle de l'homéostasie énergétique en stimulant la synthèse de POMC dans le noyau des cellules du noyau arqué, protégeant ainsi certains individus contre la prise de poids.

Conclusion et perspectives

L'homéostasie énergétique est soumise à une régulation centrale, dont l'hypothalamus constitue le chef d'orchestre. Situé de part et d'autre du 3^{ème} ventricule et accolé à l'éminence médiane, le noyau arqué de l'hypothalamus relaie les informations périphériques vers le parenchyme nerveux afin de contrôler la balance énergétique via une boucle de régulation entre le système nerveux central et la périphérie. L'altération de cette boucle de régulation prédispose à des désordres métaboliques dont l'obésité est un exemple. Si les origines de la maladie sont multiples, il est désormais reconnu que des perturbations de l'environnement périnatal seraient susceptibles de programmer la descendance à développer la pathologie à l'âge adulte.

Ce travail de thèse a mis en évidence qu'étonnamment, un régime maternel HF pouvait protéger la descendance contre le gain de poids excessif induit par un régime hypercalorique. Cet effet est plus prononcé chez les femelles, suggérant un dimorphisme sexuel dont les mécanismes restent à caractériser. Nos données ont montré que chez les mâles, le régime maternel HF était plutôt associé au développement d'un phénotype « gaspilleur » ainsi qu'à des modifications dans l'expression de gènes impliqués dans la dépense énergétique. Le régime maternel HF modifierait de manière permanente l'organisation des prolongements astrocytaires dans le noyau arqué de la descendance mâle. L'utilisation de différents protocoles nutritionnels nous a permis de déterminer que la lactation constituait une fenêtre de temps critique pour la programmation de ces modifications chez la descendance. Les perturbations induites au cours de cette période ont eu des conséquences sur l'organisation des cellules gliales du noyau arqué notamment impliquées dans la structure de la BHE. Les modifications observées ouvrent ainsi de nombreuses perspectives. Il semble nécessaire de caractériser l'impact du régime maternel HF sur l'organisation de la BHE chez la descendance ainsi que sur le transport des signaux de régulation de la périphérie vers le noyau arqué (leptine, insuline, glucose...). Par ailleurs, l'augmentation de la surface Glut-1 positive dans le noyau arqué des rats issus de mère HF pouvant suggérer un transport accru du glucose, reflète potentiellement une activité neuronale accrue. Il serait intéressant d'étudier cette dernière dans cette structure. Enfin, les modifications cytoarchitectoniques étant induites pendant la période postnatale, l'étude de la composition du lait des rates nourries avec un régime HF pendant cette période pourrait nous permettre d'identifier le ou les facteurs impliqués dans l'acquisition du phénotype que nous avons observé. Parce qu'il est capable de protéger certains individus contre la prise de poids induite par un régime hypercalorique, le CNTF

pourrait être l'un de ses facteurs. Le dosage de cette cytokine dans le lait des rates nourries avec le régime HF ainsi que son expression chez la descendance font donc partie des perspectives de cette étude.

Notre second objectif visait à caractériser le mode d'action du CNTF. Nous avons montré que cette cytokine et son récepteur passent dans le noyau des neurones POMC de l'hypothalamus. Cette translocation induit la phosphorylation de protéines associées aux voies de signalisation JAK-2/STAT3 ainsi que IRS/PI3K/Akt et la transcription du gène codant POMC. Cette hypothèse nécessite désormais d'être validée dans des modèles de dérégulation de l'homéostasie énergétique. Le mécanisme d'action intracellulaire du CNTF pourrait aussi offrir des perspectives à visée thérapeutique dans le traitement de l'obésité.

A plus long terme, il serait judicieux d'étudier les mécanismes épigénétiques et moléculaires sous-tendant l'effet protecteur du régime maternel HF. Parmi les acteurs moléculaires potentiels, l'étude des micro-ARN, régulateurs fondamentaux de l'expression génique, notamment au cours du développement serait de première importance. Par ailleurs l'étude des modifications épigénétiques (méthylations...) induites par ce régime représente aussi une perspective majeure à ce travail.

Annexes

A putative physiological role of hypothalamic CNTF in the control of energy homeostasis

C.-M. Vacher^{a,*}, D. Crépin^a, A. Aubourg^a, O. Couvreur^a, V. Bailleux^a, V. Nicolas^b,
J. Férézou^a, D. Grippois^a, A. Gertler^c, M. Taouis^a

^a Laboratoire de Neuroendocrinologie Moléculaire de la Prise Alimentaire, UMR 1197 INRA, Université Paris 11, Bâtiment 447, 91405 Orsay, France

^b Institut de Signalisation et d'Innovation Thérapeutique, IFR 75, Faculté de Pharmacie, Université Paris 11, 92296 Châtenay-Malabry, France

^c The Hebrew University of Jerusalem, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences Institute of Biochemistry Food Science and Nutrition, Rehovot 76100, Israel

Received 24 June 2008; revised 26 August 2008; accepted 10 October 2008

Available online 23 October 2008

Edited by Laszlo Nagy

Abstract Administration of CNTF durably reduces food intake and body weight in obese humans and rodent models. However, the involvement of endogenous CNTF in the central regulation of energy homeostasis needs to be elucidated. Here, we demonstrate that CNTF and its receptor are expressed in the arcuate nucleus, a key hypothalamic region controlling food intake, and that CNTF levels are inversely correlated to body weight in rats fed a high-sucrose diet. Thus endogenous CNTF may act, in some individuals, as a protective factor against weight gain during hypercaloric diet and could account for individual differences in the susceptibility to obesity.

© 2008 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Food intake; Arcuate nucleus; CNTF; Unbalanced diet; Obesity

1. Introduction

The hypothalamic arcuate nucleus (ARC) integrates changes in circulating levels of nutrients and hormones such as leptin and insulin to respond to the energy body requirements [1]. The alteration of hypothalamic hormonal and/or nutrients sensing contributes to the onset of obesity, which is usually associated to hypothalamic leptin resistance [2–5].

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) has been first demonstrated to exert a trophic action on motor neurons of the ciliary ganglion [6]. This cytokine reduces food intake and body weight by activating leptin-like intracellular pathways in the ARC [7]. Interestingly, CNTF causes long-lasting weight loss in most obese patients and animal models bypassing leptin resistance [7–10]. Hence, CNTF has been considered as a promising therapeutic tool for the treatment of obesity and has prompted intense research aimed at identifying the cellular and molecular mechanisms underlying its potent anorexigenic properties. CNTF first binds to its specific receptor subunit (CNTFR α), a membrane glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI)-anchored. Binding of CNTF to CNTFR α induces heterodimerization of the β components of the receptor complex,

leukaemia inhibitory factor receptor (LIFR) and gp130 [11,12], leading to the activation of MAP kinase (MAPK) and JAK-2/STAT-3 signaling pathways [13]. CNTF is also able to regulate hypothalamic and muscle AMP kinase (AMPK) [14,15].

The expression of CNTF and its receptor has been evidenced in the rodent brain. Nevertheless, to date, no exhaustive investigation has regarded the expression of CNTF and its receptor in the ARC. Besides, the role of CNTF as an endogenous modulator of energy homeostasis has not been yet determined. Indeed, correlation studies between CNTF gene disruption and body weight in mice or humans provided controversial data [16–20]. However, compensatory pathways cannot be excluded in such genetic approaches [21]. Thus, in this study, we have reconsidered the hypothesis of a physiological role of CNTF in the central control of energy homeostasis by using complementary morphological and biochemical approaches aimed at identifying the cellular sources and targets of CNTF and examining the impact of a high-sucrose or a high-fat diet on CNTF level in the rat ARC.

2. Materials and methods

2.1. Animal experimental procedure

Adult (9 week-old) Wistar rats (males and females) were fed for 6 weeks with either a chow, a high-sucrose (HS) or a high-fat diet adapted from previous studies [22]. Body weight was registered every week and food intake monitored for the two last weeks before the sacrifice. CNTF (0.3 mg/kg) or saline solution were injected (IP) 45 min before euthanasia. Recombinant CNTF, which crosses the blood–brain barrier [23], was produced as previously described [24]. Experiments were performed according to European legal requirements (Decree 86/609/EEC).

2.2. Plasma parameters determination

Plasma glucose, cholesterol, insulin, leptin and triglycerides were measured as previously described [25]. The homeostatic model assessment (HOMA) for insulin resistance was calculated using the HOMA version 2.2 calculator software (Diabetes Trials Unit, Oxford, UK).

2.3. CNTF *in situ* hybridization

A previously described CNTF oligonucleotide probe [26] (5' CCA GAT AGA ACG GCT ACA GAG GTC CCG GCG GTG AAG GGT CAG AGG 3') was labelled using terminal transferase and digoxigenin (DIG)-ddUTP according to the manufacturer's recommendations (Roche Applied Science, Meylan, France). Free-floating sections prepared from rat hypothalamus were incubated overnight at 42 °C

*Corresponding author. Fax: +33 1 69 15 74 70.

E-mail address: claire-marie.vacher@u-psud.fr (C.-M. Vacher).

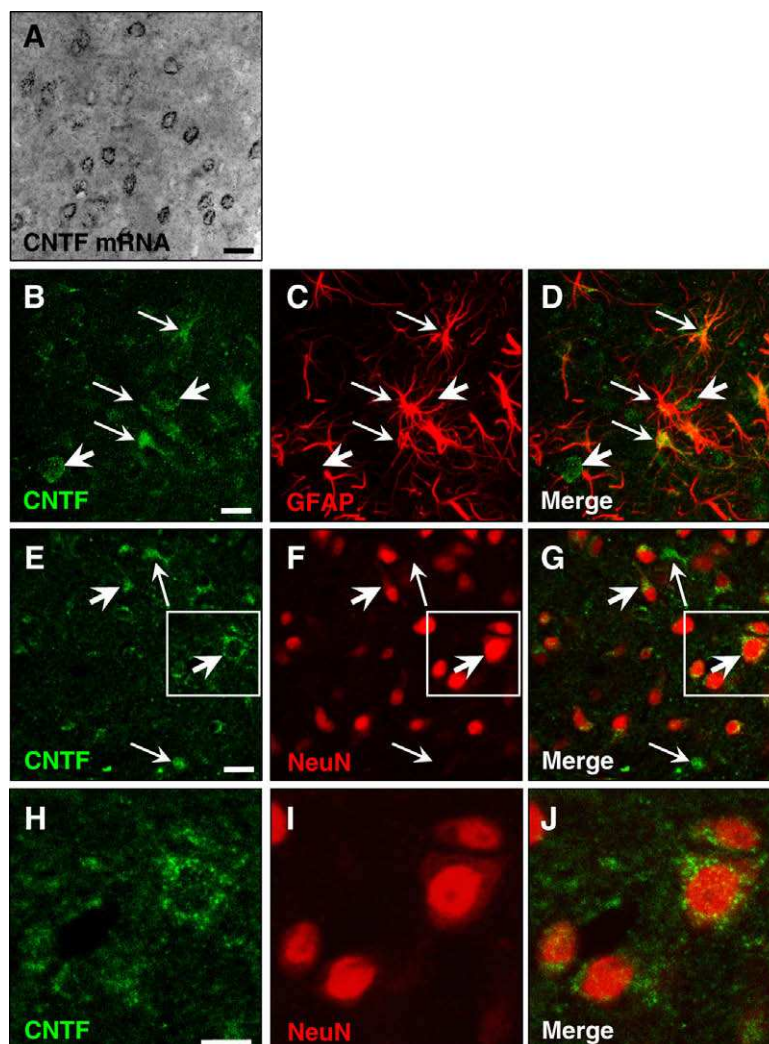


Fig. 1. Detection of CNTF mRNA by *in situ* hybridization and CNTF protein by multiple fluorescent immunohistochemistry. CNTF mRNA is present in rat ARC (A). CNTF-IF is found in astrocytes (arrows) where it overlaps with GFAP-IF (B–D) and in neurons (arrowhead) as shown on NeuN immunolabelled sections (E–J). Overlapping of 3 0.4 μm -thick focal planes. Scale bars = 20 μm for A–D; 10 μm for E–G.

with labelled CNTF probe (0.2 nM). Following several washes as previously described [27], labelled cells were detected by a DIG-DNA detection kit (Roche). Controls were assessed in the presence of the sense probe.

2.4. Fluorescent immunohistochemistry

The immunohistochemical analyses were performed as previously described with slight adaptations [28]. Hypothalamic sections (50 μm) were incubated with goat anti-CNTF (1:200; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), goat anti-CNTFR α (1:50; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) or rabbit anti-p42/44 MAPK (1:200; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). The chosen antibodies cross-react with the rat forms of CNTF and CNTFR α [29,30]. Multiple stainings were performed using a combination of monoclonal mouse anti-GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein; 1:500; Sigma) or anti-NeuN (Neuronal nuclei; 1:100; Chemicon, Temecula, CA, USA) immunoglobulins. Primary antibodies were visualized with Fluorophores-488 (FP-488; Interchim, Montluçon, France) or cyanine-5 (Cy5; Jackson ImmunoResearch Laboratories; Suffolk, UK) conjugated antibodies (1:400). Immunofluorescence (IF) was examined by confocal microscopy (Zeiss LSM 510 system, Germany). Optical sections were taken through the Z axis at 0.4 μm intervals and averaged three times. Quantification was performed with ImageJ 1.36 b software (NIH, USA). Briefly, CNTF levels and GFAP coverage were assessed

by measuring the integrated fluorescence densities or the area fractions, respectively, within the reproductive contours of a whole ARC and after background subtraction.

2.5. Western blots

Whole hypothalamus samples were homogenized as previously described [31]. Proteins (50 μg) were subjected to SDS/PAGE and Western blot analysis using the anti-CNTF antibody. All Western blots were normalized to β -tubulin (1:1000; Cell Signaling Technology). Blot quantification was performed by using Bio1D software (Vilbert Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

2.6. Quantitative real-time PCR

A Fast SYBR Green Master mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) was used to analyze CNTF mRNA expression level in the ARC. The accumulation of PCR products was measured directly by monitoring fluorescence intensity with a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Expression levels of mRNA were calculated after normalization with the housekeeping gene β -actin. Nucleotide sequences of the specific primers used were as follows: 5'-GGACCTCTGTAGCCGTTCTATCTG-3' (sense) and 5'-GGTACACCATCCACT-

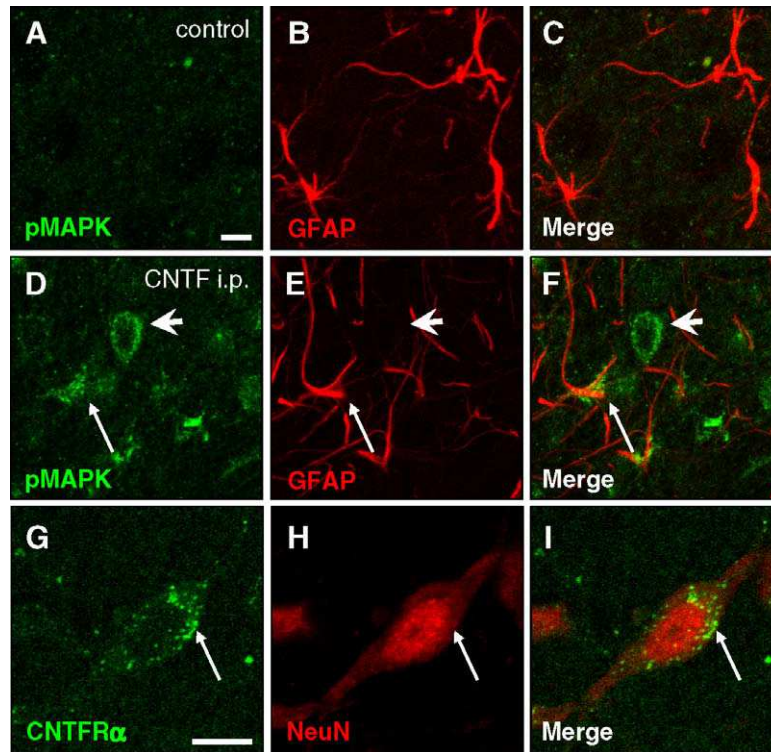


Fig. 2. Multiple fluorescent immunohistochemistry. Co-detection of pMAPK and GFAP in saline (A–C) and CNTF-treated (D–F) rats. A single i.p. injection of CNTF induces MAPK phosphorylation in GFAP-positive (arrow) and GFAP-negative (arrowhead) cells. Co-detection of CNTFR α and NeuN (G–I). CNTFR α -IF is evidenced in the cytoplasm of a NeuN-positive cell. 0.4 μ m-thick focal planes. Scale bars = 10 μ m for A–F; 15 μ m for G–I.

GAGTCAAGG-3' (antisense) for CNTF; 5'-CTATCGGCAAT-GAGCGGTTCC-3' (sense) and 5'-TGTGTTGGCATAGAGGTCTT-TACG-3' (antisense) for β -actin.

2.7. Statistics

Data are represented as the mean percentage of control \pm S.E.M. Unpaired Student's *t*-test was carried out with Statview (SAS Institute, NC, USA). The correlation coefficient was used to examine the relationship between hypothalamic CNTF levels and body weight in control, HS and HF fed animals. In all comparisons, results were considered significant if $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Identification of a local source of CNTF in the rat ARC

3.1.1. CNTF gene expression. Digoxigenin-labelled anti-sense CNTF probes evidenced a perinuclear staining in some ARC cells (Fig. 1A). No staining was observed with the sense probe (not shown). Based upon double immunostaining experiments combining anti-CNTF and anti-GFAP or anti-NeuN antibodies, CNTF-IF appeared to emerge from approximately 90% of astrocytes (Fig. 1B–D) and 75% of neurons (Fig. 1E–J).

Table 1

Final body weights and physiological parameters measured in control, high-sucrose and high-fat diet fed animals.

	C	HS	HF
Final body weight, g	265.28 \pm 2.7	281.9 \pm 4.3**	276.7 \pm 5.8
Energy intake, kcal/day	53.8 \pm 1.5	58.2 \pm 0.9*	57.2 \pm 1.3
Relative adipose tissue, % BW	3.2 \pm 0.2	4.5 \pm 0.2***	5.4 \pm 0.5***
Relative liver weight, % BW	2.6 \pm 0.06	2.53 \pm 0.05	2.52 \pm 0.06
<i>Plasma</i>			
Glucose, g/l	1 \pm 0.02	1 \pm 0.03	1.09 \pm 0.05
Triglycerides, g/l	0.71 \pm 0.16	1.1 \pm 0.25	0.97 \pm 0.23
Cholesterol, g/l	1 \pm 0.07	0.95 \pm 0.11	0.83 \pm 0.03
Insulin, ng/ml	0.74 \pm 0.07	1.11 \pm 0.08*	1.47 \pm 0.94**
Leptin, ng/ml	1.73 \pm 0.15	3.03 \pm 0.19**	3.53 \pm 0.44*
HOMA index	0.79 \pm 0.1	1.19 \pm 0.1*	1.78 \pm 0.2***,£

* $P < 0.05$ versus control.

** $P < 0.005$ versus control.

*** $P < 0.001$ versus control.

£ $P < 0.05$ versus HS.

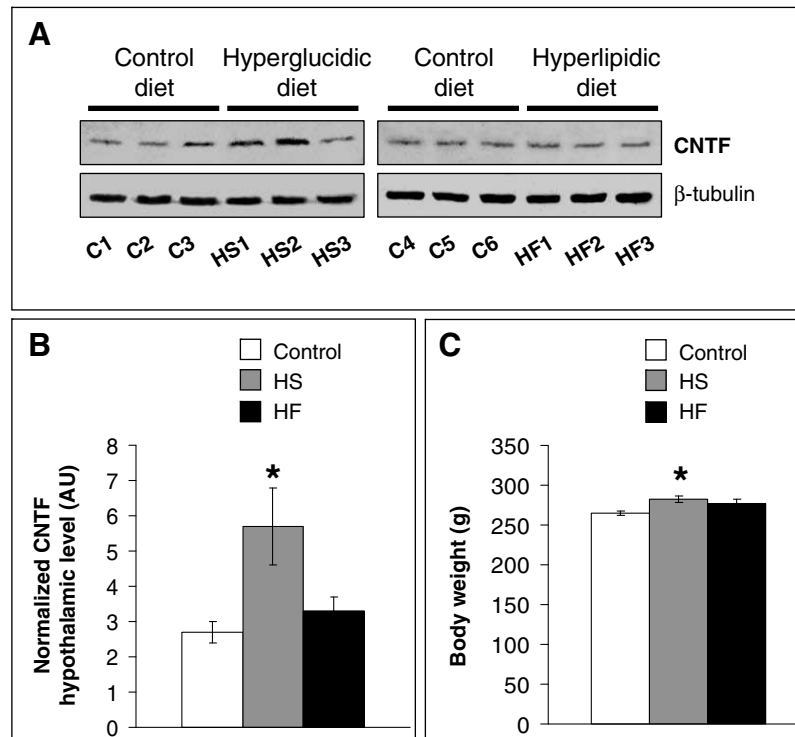


Fig. 3. Western blot analysis aimed at evaluating the impact of a high-sucrose (HS) or a high-fat (HF) diet on CNTF levels in the rat hypothalamus. Compared to control and HF groups, the HS diet induces a significant 2-fold increase in the mean CNTF hypothalamic levels (AB) and a significant 6.4% increase in body weight (C). Unpaired Student's *t*-test * $P < 0.005$.

It is to note that other hypothalamic nuclei, such as the paraventricular nucleus and the lateral hypothalamic area, expressed CNTF. However, the ARC exhibited the highest amount of CNTF (not shown).

3.2. CNTF induces MAPK phosphorylation in the rat ARC

To identify the cellular types exhibiting functional CNTF receptors in the rat ARC, the effect of CNTF on MAPK phosphorylation was examined. While pMAPK levels were low in control animals (Fig. 2A), treated animals exhibited a dramatic increase in MAPK phosphorylation both in astrocytes and neurons, as revealed by detecting GFAP [Fig. 2D–F; arrow pointing at an astrocyte (GFAP-positive cell); arrowhead pointing at a neuron (GFAP-negative cell)]. The neuronal expression of CNTFR α was corroborated since CNTFR α -IF appeared in the shape of large puncta, presumably corresponding to receptor clusters, in NeuN-positive cells (Fig. 2G–I).

3.3. Impact of a different hypercaloric diets on hypothalamic CNTF level

To test the hypothesis of a relationship between the hypothalamic expression of CNTF and the control of energy homeostasis, two unbalanced diets were compared, high-sucrose or high-fat, on CNTF levels in the hypothalamus and the ARC. The endocrine and metabolic parameters are summarized in Table 1. HS but not HF diet induced a significant increase in body weight associated with increased energy intake. Both hypercaloric diets induced a significant increase in relative subcutaneous adipose tissue, insulinemia, leptinemia and HOMA index (Table 1). Plasma glucose, triglycerides

and cholesterol levels were not affected. The HS diet induced a significant (2-fold) increase in CNTF hypothalamic levels compared to control and HF groups ($P < 0.005$; Fig. 3A and B). While no association was evidenced between CNTF hypothalamic levels and body weight in control and HF animals ($r = 0.2774$ in control group; $r = 0.1732$ in HF group; $P > 0.1$; Fig. 4A and C), a significant inverse correlation appeared in HS animals ($r = 0.8592$; $P < 0.001$; Fig. 4B). Indeed, in these conditions, animals with lower body weight exhibited higher amounts of CNTF in the hypothalamus. This result was corroborated in the ARC by evaluating both CNTF-mRNA contents (0.99 in overweight-resistant versus 0.40 in the heaviest rats; qRT-PCR values normalized to β -actin-mRNA) and CNTF-IF (Fig. 5A, D, G). It is noteworthy that this increase in CNTF expression was specific to the ARC. In overweight-resistant animals fed a HS diet, the mean CNTF-IF increase in the ARC could reach $+160\% \pm 3$ ($P < 0.001$; Fig. 5J) and was associated to a significant decrease ($-65\% \pm 10$; $P < 0.01$) in the astrocytic coverage (Fig. 5B, E, H, K). Besides, a positive correlation was found between body weight and body weight gain in HS diet fed rats ($r = 0.9801$; $P < 0.001$).

4. Discussion

Several studies attempted to correlate CNTF genotype and body mass. Except in a report showing that the homozygous null mutation of the CNTF gene is associated to increased body mass in humans [19], no link was found between CNTF gene disruption and body weight [16,20]. However, compensa-

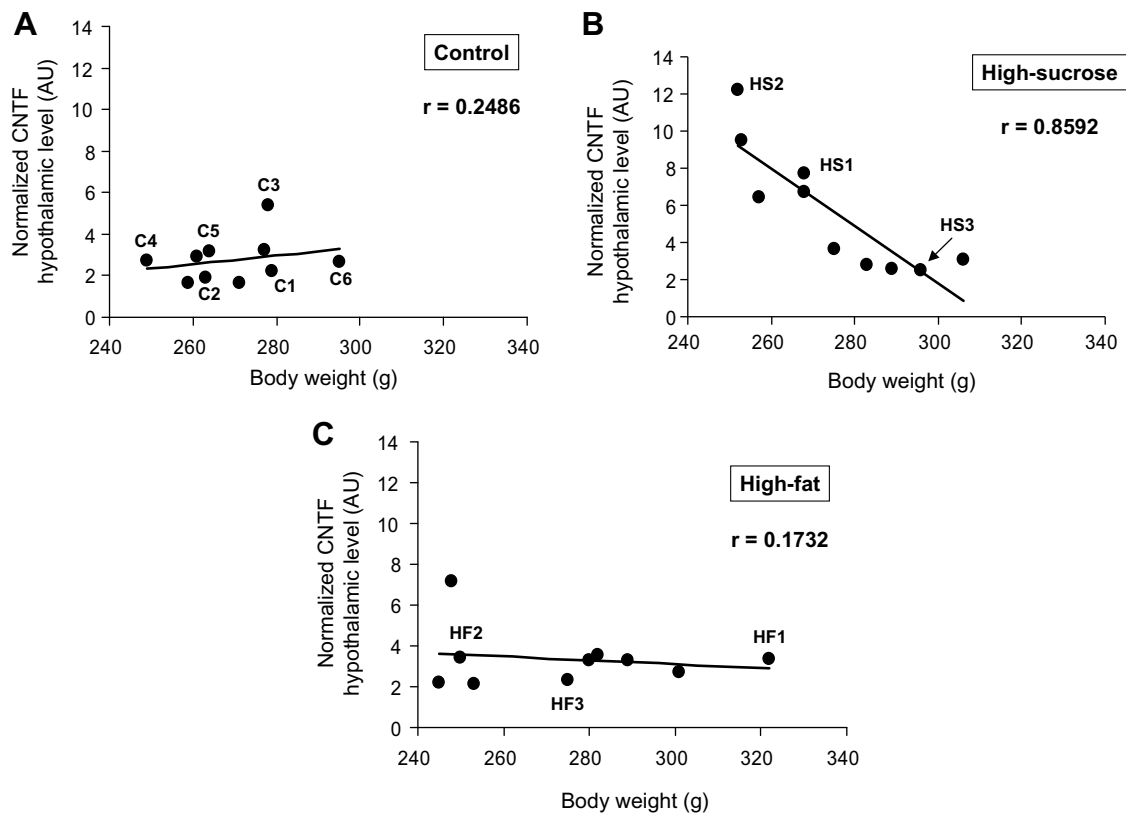


Fig. 4. CNTF hypothalamic levels determined by Western blot negatively correlates with body weight in HS diet fed (B) but neither in control (A) nor in HF diet fed rats.

tory mechanisms cannot be excluded. Indeed the permanent disruption of the orexigenic NPY gene does not affect body weight or feeding behaviour [32,33] although ablation of NPY-expressing neurons in adults causes rapid starvation [21].

To reconsider the possibility for CNTF to represent an endogenous anorexigenic factor, we have developed an alternative strategy aimed at evaluating the impact of two unbalanced hypercaloric diets (high-sucrose or high-fat) on the local production of CNTF in the rat ARC.

Here we first have demonstrated that neurons and astrocytes express both CNTF and functional CNTFR α , as evidenced by MAPK phosphorylation in response to exogenous CNTF. Furthermore, the hypothalamic CNTF expression was increased and inversely correlated with body weight in HS rats. This suggests that endogenous CNTF could protect a fraction of individuals against diet-induced weight gain and account, at least partially, for the individual variations toward susceptibility to develop high-carbohydrate-induced obesity. In the light of previous reports (i.e. [7,8]), we can assume that the curbing effect of CNTF on weight gain could be linked to its anorexigenic properties. The anorexigenic action of CNTF can be attributed to its expression not only in the ARC but also in the paraventricular nucleus and the lateral hypothalamic area, as observed in our laboratory. Nevertheless, the highest hypothalamic amounts of CNTF were found in the ARC and the increased expression of CNTF in obesity resistant rats was specific to the ARC, suggesting a crucial role of this nucleus in the endogenous effect of CNTF on the regulation of energy homeostasis.

Direct evidence for CNTF release has not been yet demonstrated *in vivo*. Nevertheless, evidence was presented for release of CNTF from cultured astrocytes [34]. Besides, a direct intracellular action may also constitute a plausible mechanism of CNTF action, as demonstrated *in vitro* [35]. This possibility deserves further investigation.

Interestingly, the increase in CNTF levels observed in a proportion of HS diet fed rats paralleled a retraction of astrocytic processes. Astrocytes are known to play a pivotal role in the regulation of food intake by monitoring circulating hormones/nutrients and communicating with neurons [36–38]. Moreover, they modulate synaptic number and activity in response to peripheral signals [39–42]. However, whether these modifications are beneficial or harmful in situations of unbalanced energy status needs further investigation. An intrinsic inhibition of CNTF on glial coverage is unlikely because previous studies have demonstrated that CNTF does not reduce but instead stimulate GFAP production and astrocytic network extent in the brain [43,44].

It is noteworthy that HS and HF diets similarly affect insulin, leptin and glucose circulating levels but only HS modifies CNTF expression and astrocytic coverage in the ARC. This clearly indicates that diet composition plays a key role in neuronal organisation of hypothalamic nuclei and may account for the individual variations of predisposition to develop obesity.

In conclusion, our data show that CNTF may be considered as an endogenous modulator of energy homeostasis in the

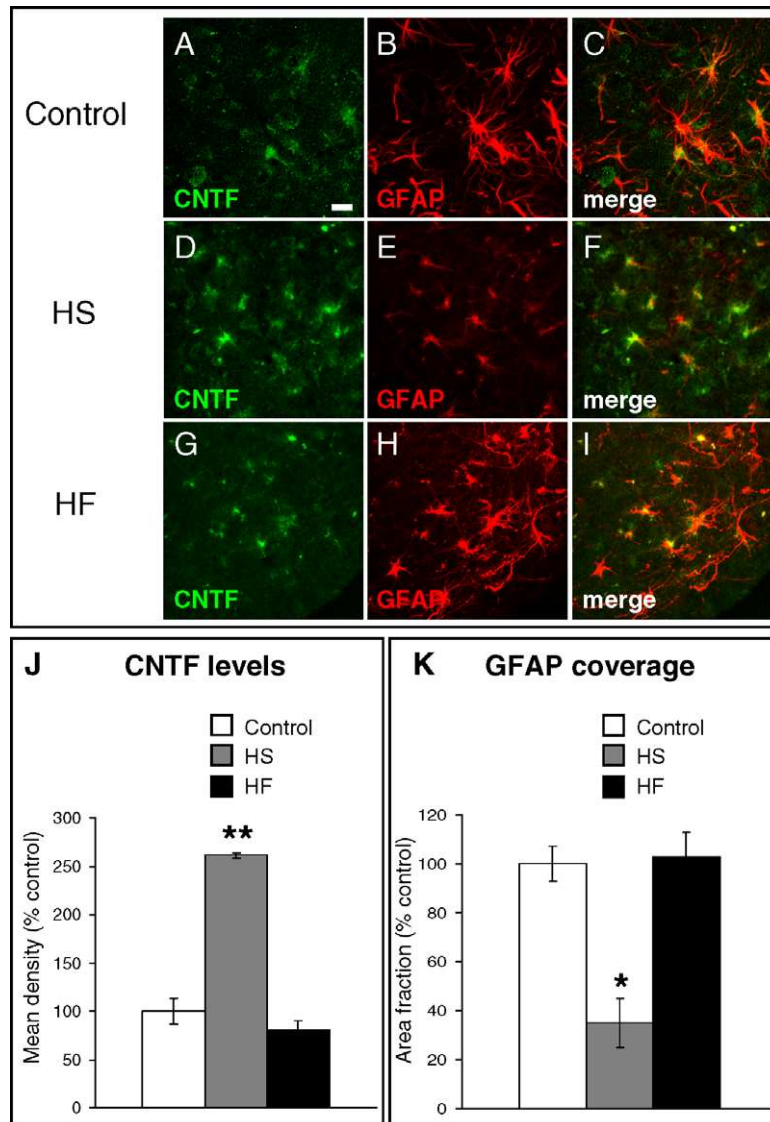


Fig. 5. Co-detection of CNTF and GFAP by immunofluorescence reveals that CNTF level increases while GFAP coverage decreases in a fraction of HS diet fed rats compared to control and HF groups (A–I). These alterations are estimated at +160% for CNTF (J) and –65% for GFAP (K). Scale bar = 10 μ m.

ARC that possibly protects some individuals against the onset of diet-induced obesity.

Acknowledgements: We thank Dr. Monique Laviolle for her helpful comments. This work was supported by the “Agence Nationale pour la Recherche” (ANR-06-JCJC-0107 to CMV).

References

- [1] Schwartz, M.W. (2000) Biomedicine. Staying slim with insulin in mind. *Science* 289, 2066–2067.
- [2] Friedman, J.M. (2000) Obesity in the new millennium. *Nature* 404, 632–634.
- [3] Abelson, P. and Kennedy, D. (2004) The obesity epidemic. *Science* 304, 1413.
- [4] Schwartz, M.W. and Porte Jr., D. (2005) Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307, 375–379.
- [5] Munzberg, H. and Myers Jr., M.G. (2005) Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat. Neurosci.* 8, 566–570.
- [6] Lin, L.F., Mismar, D., Lile, J.D., Armes, L.G., Butler 3rd, E.T., Vannice, J.L. and Collins, F. (1989) Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 246, 1023–1025.
- [7] Lambert, P.D. et al. (2001) Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4652–4657.
- [8] Gloaguen, I. et al. (1997) Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6456–6461.
- [9] Ettinger, M.P. et al. (2003) Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *JAMA* 289, 1826–1832.
- [10] Kokoeva, M.V., Yin, H. and Flier, J.S. (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310, 679–683.
- [11] Davis, S. et al. (1993) Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* 259, 1736–1739.
- [12] Davis, S., Aldrich, T.H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N.Y. and Yancopoulos, G.D. (1993) LIFR beta and gp130

- as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260, 1805–1808.
- [13] Stahl, N. and Yancopoulos, G.D. (1993) The alphas, betas, and kinases of cytokine receptor complexes. *Cell* 74, 587–590.
- [14] Steinberg, G.R., Watt, M.J., Fam, B.C., Proietto, J., Andrikopoulos, S., Allen, A.M., Febbraio, M.A. and Kemp, B.E. (2006) Ciliary neurotrophic factor suppresses hypothalamic AMP-kinase signaling in leptin-resistant obese mice. *Endocrinology* 147, 3906–3914.
- [15] Watt, M.J. et al. (2006) CNTF reverses obesity-induced insulin resistance by activating skeletal muscle AMPK. *Nat. Med.* 12, 541–548.
- [16] Masu, Y., Wolf, E., Holtmann, B., Sendtner, M., Brem, G. and Thoenen, H. (1993) Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365, 27–32.
- [17] Takahashi, R., Yokoji, H., Misawa, H., Hayashi, M., Hu, J. and Deguchi, T. (1994) A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat. Genet.* 7, 79–84.
- [18] DeChiara, T.M. et al. (1995) Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83, 313–322.
- [19] O'Dell, S.D. et al. (2002) Null mutation in human ciliary neurotrophic factor gene confers higher body mass index in males. *Eur. J. Hum. Genet.* 10, 749–752.
- [20] Jacob, A.C., Zmuda, J.M., Cauley, J.A., Metter, E.J., Hurley, B.F., Ferrell, R.E. and Roth, S.M. (2004) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) genotype and body composition. *Eur. J. Hum. Genet.* 12, 372–376.
- [21] Luquet, S., Perez, F.A., Hnasko, T.S. and Palmiter, R.D. (2005) NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310, 683–685.
- [22] Guo, F. and Jen, K.L. (1995) High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol. Behav.* 57, 681–686.
- [23] Pan, W., Kastin, A.J., Maness, L.M. and Brennan, J.M. (1999) Saturable entry of ciliary neurotrophic factor into brain. *Neurosci. Lett.* 263, 69–71.
- [24] Gertler, A., Simmons, J. and Keisler, D.H. (1998) Large-scale preparation of biologically active recombinant ovine obese protein (leptin). *FEBS Lett.* 422, 137–140.
- [25] Ferezou-Viala, J. et al. (2007) Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1056–R1062.
- [26] Dallner, C., Woods, A.G., Deller, T., Kirsch, M. and Hofmann, H.D. (2002) CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia* 37, 374–378.
- [27] Vacher, C.M. et al. (2006) Hyperdopaminergia and altered locomotor activity in GABAB1-deficient mice. *J. Neurochem.* 97, 979–991.
- [28] Vacher, C.M., Fretier, P., Creminon, C., Calas, A. and Hardin-Pouzet, H. (2002) Activation by serotonin and noradrenaline of vasopressin and oxytocin expression in the mouse paraventricular and supraoptic nuclei. *J. Neurosci.* 22, 1513–1522.
- [29] Beltran, W.A., Rohrer, H. and Aguirre, G.D. (2005) Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFR-alpha) in mammalian photoreceptor cells. *Mol. Vis.* 11, 232–244.
- [30] Haas, S.J., Ahrens, A., Petrov, S., Schmitt, O. and Wree, A. (2004) Quinolinic acid lesions of the caudate putamen in the rat lead to a local increase of ciliary neurotrophic factor. *J. Anat.* 204, 271–281.
- [31] Rickwood, D., Messent, C. and Patel, D. (1996) Isolation and characterization of nuclei and nuclear fraction. *Subcellular Fractionation*, Press, O.U., Oxford.
- [32] Erickson, J.C., Clegg, K.E. and Palmiter, R.D. (1996) Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* 381, 415–421.
- [33] Qian, S. et al. (2002) Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol. Cell Biol.* 22, 5027–5035.
- [34] Kamiguchi, H., Yoshida, K., Sagoh, M., Sasaki, H., Inaba, M., Wakamoto, H., Otani, M. and Toya, S. (1995) Release of ciliary neurotrophic factor from cultured astrocytes and its modulation by cytokines. *Neurochem. Res.* 20, 1187–1193.
- [35] Monville, C., Fages, C., Feyens, A.M., D'Hondt, V., Guillet, C., Vernallis, A., Gascan, H. and Peschanski, M. (2002) Astroglial expression of the P-glycoprotein is controlled by intracellular CNTF. *BMC Cell Biol.* 3, 20.
- [36] Young, J.K. (2002) Anatomical relationship between specialized astrocytes and leptin-sensitive neurones. *J. Anat.* 201, 85–90.
- [37] Cheunsuang, O. and Morris, R. (2005) Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia* 52, 228–233.
- [38] Gordon, G.R., Baimoukhametova, D.V., Hewitt, S.A., Rajapaksha, W.R., Fisher, T.E. and Bains, J.S. (2005) Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat. Neurosci.* 8, 1078–1086.
- [39] Ullian, E.M., Sapperstein, S.K., Christopherson, K.S. and Barres, B.A. (2001) Control of synapse number by glia. *Science* 291, 657–661.
- [40] Garcia-Segura, L.M. and McCarthy, M.M. (2004) Minireview: role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology* 145, 1082–1086.
- [41] Lechuga-Sancho, A.M., Arroba, A.I., Frago, L.M., Garcia-Caceres, C., de Celix, A.D., Argente, J. and Chowen, J.A. (2006) Reduction in the number of astrocytes and their projections is associated with increased synaptic protein density in the hypothalamus of poorly controlled diabetic rats. *Endocrinology* 147, 5314–5324.
- [42] Theodosis, D.T., Trailin, A. and Poulain, D.A. (2006) Remodeling of astrocytes, a prerequisite for synapse turnover in the adult brain? Insights from the oxytocin system of the hypothalamus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 290, R1175–R1182.
- [43] Clatterbuck, R.E., Price, D.L. and Koliatsos, V.E. (1996) Ciliary neurotrophic factor stimulates the expression of glial fibrillary acidic protein by brain astrocytes in vivo. *J. Comp. Neurol.* 369, 543–551.
- [44] Martin, A., Hofmann, H.D. and Kirsch, M. (2003) Glial reactivity in ciliary neurotrophic factor-deficient mice after optic nerve lesion. *J. Neurosci.* 23, 5416–5424.

Références bibliographiques

A

- Abbott, N.J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41-53.
- Acuna-Goycolea, C., and van den Pol, A. (2004). Glucagon-like peptide 1 excites hypocretin/orexin neurons by direct and indirect mechanisms: implications for viscera-mediated arousal. *J Neurosci* 24, 8141-8152.
- Adler, R. (1993). Ciliary neurotrophic factor as an injury factor. *Curr Opin Neurobiol* 3, 785-789.
- Adrian, T.E., Savage, A.P., Sagor, G.R., Allen, J.M., Bacarese-Hamilton, A.J., Tatemoto, K., Polak, J.M., and Bloom, S.R. (1985). Effect of peptide YY on gastric, pancreatic, and biliary function in humans. *Gastroenterology* 89, 494-499.
- Aebischer, P., Schluep, M., Deglon, N., Joseph, J.M., Hirt, L., Heyd, B., Goddard, M., Hammang, J.P., Zurn, A.D., Kato, A.C., *et al.* (1996). Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 2, 696-699.
- Ahima, R.S. (2000). Leptin and the neuroendocrinology of fasting. *Front Horm Res* 26, 42-56.
- Ahima, R.S., and Flier, J.S. (2000). Leptin. *Annu Rev Physiol* 62, 413-437.
- Ahima, R.S., Prabakaran, D., and Flier, J.S. (1998). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J Clin Invest* 101, 1020-1027.
- Ahn, S., and Phillips, A.G. (2002). Modulation by central and basolateral amygdalar nuclei of dopaminergic correlates of feeding to satiety in the rat nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. *J Neurosci* 22, 10958-10965.
- Allan, E.H., Hilton, D.J., Brown, M.A., Evely, R.S., Yumita, S., Metcalf, D., Gough, N.M., Ng, K.W., Nicola, N.A., and Martin, T.J. (1990). Osteoblasts display receptors for and responses to leukemia-inhibitory factor. *J Cell Physiol* 145, 110-119.
- Allen, J.M., Fitzpatrick, M.L., Yeats, J.C., Darcy, K., Adrian, T.E., and Bloom, S.R. (1984). Effects of peptide YY and neuropeptide Y on gastric emptying in man. *Digestion* 30, 255-262.
- Allen, T.L., Matthews, V.B., and Febbraio, M.A. (2011). Overcoming insulin resistance with ciliary neurotrophic factor. *Handb Exp Pharmacol*, 179-199.
- Allen, Y.S., Adrian, T.E., Allen, J.M., Tatemoto, K., Crow, T.J., Bloom, S.R., and Polak, J.M. (1983). Neuropeptide Y distribution in the rat brain. *Science* 221, 877-879.
- Alonzi, T., Middleton, G., Wyatt, S., Buchman, V., Betz, U.A., Muller, W., Musiani, P., Poli, V., and Davies, A.M. (2001). Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 18, 270-282.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1986). The development of the rat hypothalamus. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 100, 1-178.
- Ambati, S., Duan, J., Duff, E., Choi, Y.H., Hartzell, D.L., Della-Fera, M.A., and Baile, C.A. (2007). Gene expression in arcuate nucleus-median eminence of rats treated with leptin or ciliary neurotrophic factor. *Biofactors* 31, 133-144.
- Anand BK, Brobeck JR (1951) Localization of a "feeding center" in the hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 77: 323-4.
- Anand, B.K., Chhina, G.S., Sharma, K.N., Dua, S., and Singh, B. (1964). ACTIVITY OF SINGLE NEURONS IN THE HYPOTHALAMIC FEEDING CENTERS: EFFECT OF GLUCOSE. *Am J Physiol* 207, 1146-1154.
- Arase, K., York, D.A., Shimizu, H., Shargill, N., and Bray, G.A. (1988). Effects of corticotropin-releasing factor on food intake and brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Am J Physiol* 255, E255-259.
- Argandona, E.G., Bengoetxea, H., and Lafuente, J.V. (2005). Lack of experience-mediated differences in the immunohistochemical expression of blood-brain barrier markers (EBA and GluT-1) during the postnatal development of the rat visual cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 156, 158-166.

- Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui, K., Toyooka, S., *et al.* (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4753-4758.
- Armitage, J.A., Taylor, P.D., and Poston, L. (2005). Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol* 565, 3-8.
- Arner, P. (2003). The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* 14, 137-145.
- Arvat, E., Maccario, M., Di Vito, L., Broglio, F., Benso, A., Gottero, C., Papotti, M., Muccioli, G., Dieguez, C., Casanueva, F.F., *et al.* (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, 1169-1174.
- Asan, E., Langenhan, T., Holtmann, B., Bock, H., Sendtner, M., and Carroll, P. (2003). Ciliary neurotrophic factor in the olfactory bulb of rats and mice. *Neuroscience* 120, 99-112.
- Attig, L., Larcher, T., Gertler, A., Abdennebi-Najar, L., and Djiane, J. (2011). Postnatal leptin is necessary for maturation of numerous organs in newborn rats. *Organogenesis* 7, 88-94.
- Attig, L., Solomon, G., Ferezou, J., Abdennebi-Najar, L., Taouis, M., Gertler, A., and Djiane, J. (2008). Early postnatal leptin blockage leads to a long-term leptin resistance and susceptibility to diet-induced obesity in rats. *Int J Obes (Lond)* 32, 1153-1160.
- Azuma, Y., and Dasso, M. (2000). The role of Ran in nuclear function. *Curr Opin Cell Biol* 12, 302-307.

B

- Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., *et al.* (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature* 394, 790-793.
- Bagnasco, M., Kalra, P.S., and Kalra, S.P. (2002). Plasma leptin levels are pulsatile in adult rats: effects of gonadectomy. *Neuroendocrinology* 75, 257-263.
- Bahrenberg, G., Behrmann, I., Barthel, A., Hekerman, P., Heinrich, P.C., Joost, H.G., and Becker, W. (2002). Identification of the critical sequence elements in the cytoplasmic domain of leptin receptor isoforms required for Janus kinase/signal transducer and activator of transcription activation by receptor heterodimers. *Mol Endocrinol* 16, 859-872.
- Bailleul, B., Akerblom, I., and Strosberg, A.D. (1997). The leptin receptor promoter controls expression of a second distinct protein. *Nucleic Acids Res* 25, 2752-2758.
- Bajetto, A., Barbero, S., Bonavia, R., Chimini, G., and Schettini, G. (2000). Immunofluorescence and biochemical techniques to detect nuclear localization of ciliary neurotrophic factor in glial cells. *Brain Res Brain Res Protoc* 5, 273-281.
- Bajetto, A., Schettini, G., and Chimini, G. (1999). Nuclear localization of ciliary neurotrophic factor in glial cells. *Brain Res* 818, 565-569.
- Balci, H., Akgun-Dar, K., Gazioglu, N., Kapucu, A., Bolayirli, M., and Oz, B. (2009). The relationship between prolactin (PRL), leptin, nitric oxide (NO), and cytokines in patients with hyperprolactinemia. *Pituitary* 12, 170-176.
- Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16, 1-13.
- Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S.M., Lee, C.E., Tang, V., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Chua, S.C., Jr., Elmquist, J.K., *et al.* (2004). Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* 42, 983-991.
- Banks, W.A. (2004). The many lives of leptin. *Peptides* 25, 331-338.

- Banks, W.A., DiPalma, C.R., and Farrell, C.L. (1999). Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. *Peptides* 20, 1341-1345.
- Banks, W.A., Jaspan, J.B., Huang, W., and Kastin, A.J. (1997). Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides* 18, 1423-1429.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., and Maness, L.M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17, 305-311.
- Banks, W.A., and Lebel, C.R. (2002). Strategies for the delivery of leptin to the CNS. *J Drug Target* 10, 297-308.
- Banks, W.A., Tschop, M., Robinson, S.M., and Heiman, M.L. (2002). Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 822-827.
- Barbin, G., Manthorpe, M., and Varon, S. (1984). Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem* 43, 1468-1478.
- Baroncini, M., Jissendi, P., Balland, E., Besson, P., Pruvo, J.P., Francke, J.P., Dewailly, D., Blond, S., and Prevot, V. (2012). MRI atlas of the human hypothalamus. *Neuroimage* 59, 168-180.
- Baskin, D.G., Breininger, J.F., and Schwartz, M.W. (1999). Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* 48, 828-833.
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., *et al.* (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650-654.
- Batterham, R.L., ffytche, D.H., Rosenthal, J.M., Zelaya, F.O., Barker, G.J., Withers, D.J., and Williams, S.C. (2007). PYY modulation of cortical and hypothalamic brain areas predicts feeding behaviour in humans. *Nature* 450, 106-109.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8374-8378.
- Bautista, C.J., Boeck, L., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., and Zambrano, E. (2008). Effects of a maternal low protein isocaloric diet on milk leptin and progeny serum leptin concentration and appetitive behavior in the first 21 days of neonatal life in the rat. *Pediatr Res* 63, 358-363.
- Bayol, S.A., Simbi, B.H., and Stickland, N.C. (2005). A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *J Physiol* 567, 951-961.
- Bazan, J.F. (1991). Neurotrophic cytokines in the hematopoietic fold. *Neuron* 7, 197-208.
- Beck, B. (2000). Neuropeptides and obesity. *Nutrition* 16, 916-923.
- Beinfeld, M.C., Meyer, D.K., and Brownstein, M.J. (1981). Cholecystokinin in the central nervous system. *Peptides* 2 Suppl 2, 77-79.
- Belgardt, B.F., Husch, A., Rother, E., Ernst, M.B., Wunderlich, F.T., Hampel, B., Klockner, T., Alessi, D., Kloppenburg, P., and Bruning, J.C. (2008). PDK1 deficiency in POMC-expressing cells reveals FOXO1-dependent and -independent pathways in control of energy homeostasis and stress response. *Cell Metab* 7, 291-301.
- Belgareh-Touze, N., Avaro, S., Rouille, Y., Hoflack, B., and Haguenaer-Tsapis, R. (2002). Yeast Vps55p, a functional homolog of human obesity receptor gene-related protein, is involved in late endosome to vacuole trafficking. *Mol Biol Cell* 13, 1694-1708.
- Bellido, T., Stahl, N., Farruggella, T.J., Borba, V., Yancopoulos, G.D., and Manolagas, S.C. (1996). Detection of receptors for interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor in bone marrow stromal/osteoblastic cells. *J Clin Invest* 97, 431-437.
- Bellinger, L., Lilley, C., and Langley-Evans, S.C. (2004). Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. *Br J Nutr* 92, 513-520.
- Bellinger, L.L., and Bernardis, L.L. (2002). The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav* 76, 431-442.

- Beltran, W.A., Zhang, Q., Kijas, J.W., Gu, D., Rohrer, H., Jordan, J.A., and Aguirre, G.D. (2003). Cloning, mapping, and retinal expression of the canine ciliary neurotrophic factor receptor alpha (CNTFRalpha). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 3642-3649.
- Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 22, 9048-9052.
- Benomar, Y., Berthou, F., Vacher, C.M., Bailleux, V., Gertler, A., Djiane, J., and Taouis, M. (2009). Leptin But Not Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Induces Phosphotyrosine Phosphatase-1B Expression in Human Neuronal Cells (SH-SY5Y): Putative Explanation of CNTF Efficacy in Leptin-Resistant State. *Endocrinology* 150, 1182-1191.
- Benomar, Y., Roy, A.F., Aubourg, A., Djiane, J., and Taouis, M. (2005a). Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. *Biochem J* 388, 929-939.
- Benomar, Y., Wetzler, S., Larue-Achagiotis, C., Djiane, J., Tome, D., and Taouis, M. (2005b). In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol* 242, 59-66.
- Bensaid, A., Tome, D., L'Heureux-Bourdon, D., Even, P., Gietzen, D., Morens, C., Gaudichon, C., Larue-Achagiotis, C., and Fromentin, G. (2003). A high-protein diet enhances satiety without conditioned taste aversion in the rat. *Physiol Behav* 78, 311-320.
- Bernardis, L.L. (1970). Participation of the dorsomedial hypothalamic nucleus in the "feeding center" and water intake circuitry of the weanling rat. *J Neurovisc Relat* 31, 387-398.
- Berthou, F., Rouch, C., Gertler, A., Gerozissis, K., and Taouis, M. (2011). Chronic central leptin infusion differently modulates brain and liver insulin signaling. *Mol Cell Endocrinol* 337, 89-95.
- Berthoud, H.R. (2006). Homeostatic and non-homeostatic pathways involved in the control of food intake and energy balance. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5, 197S-200S.
- Beurrier, C., Faideau, M., Bennouar, K.E., Escartin, C., Kerkerian-Le Goff, L., Bonvento, G., and Gubellini, P. (2010). Ciliary neurotrophic factor protects striatal neurons against excitotoxicity by enhancing glial glutamate uptake. *PLoS One* 5, e8550.
- Beverly, J.L., Gietzen, D.W., and Rogers, Q.R. (1990). Effect of dietary limiting amino acid in prepyriform cortex on food intake. *Am J Physiol* 259, R709-715.
- Bewick, G.A., Gardiner, J.V., Dhillon, W.S., Kent, A.S., White, N.E., Webster, Z., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005). Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J* 19, 1680-1682.
- Bi, S., Ladenheim, E.E., Schwartz, G.J., and Moran, T.H. (2001). A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281, R254-260.
- Biener, E., Charlier, M., Ramanujan, V.K., Daniel, N., Eisenberg, A., Bjorbaek, C., Herman, B., Gertler, A., and Djiane, J. (2005). Quantitative FRET imaging of leptin receptor oligomerization kinetics in single cells. *Biol Cell* 97, 905-919.
- Bjorbaek, C., Elmquist, J.K., El-Haschimi, K., Kelly, J., Ahima, R.S., Hileman, S., and Flier, J.S. (1999). Activation of SOCS-3 messenger ribonucleic acid in the hypothalamus by ciliary neurotrophic factor. *Endocrinology* 140, 2035-2043.
- 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, 32686-32695.
- Blouet, C., Jo, Y.H., Li, X., and Schwartz, G.J. (2009). Mediobasal hypothalamic leucine sensing regulates food intake through activation of a hypothalamus-brainstem circuit. *J Neurosci* 29, 8302-8311.
- Bluher, S., Moschos, S., Bullen, J., Jr., Kokkotou, E., Maratos-Flier, E., Wiegand, S.J., Sleeman, M.W., and Mantzoros, C.S. (2004). Ciliary neurotrophic factorAx15 alters energy homeostasis, decreases body weight, and improves metabolic control in diet-induced obese and UCP1-DTA mice. *Diabetes* 53, 2787-2796.
- Bonnet, M., Delavaud, C., Laud, K., Gourdou, I., Leroux, C., Djiane, J., and Chilliard, Y. (2002). Mammary leptin synthesis, milk leptin and their putative physiological roles. *Reprod Nutr Dev* 42, 399-413.

- Bouret, S.G. (2008). Crossing the border: developmental regulation of leptin transport to the brain. *Endocrinology* 149, 875-876.
- Bouret, S.G. (2010). Development of hypothalamic neural networks controlling appetite. *Forum Nutr* 63, 84-93.
- Bouret, S.G., Draper, S.J., and Simerly, R.B. (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304, 108-110.
- Bouret, S.G., Gorski, J.N., Patterson, C.M., Chen, S., Levin, B.E., and Simerly, R.B. (2008). Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. *Cell Metab* 7, 179-185.
- Bouret, S.G., and Simerly, R.B. (2004). Minireview: Leptin and development of hypothalamic feeding circuits. *Endocrinology* 145, 2621-2626.
- Bouret, S.G., and Simerly, R.B. (2007). Development of leptin-sensitive circuits. *J Neuroendocrinol* 19, 575-582.
- Bray, G.A. (1977). The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* 36, 148-153.
- Bray, G.A. (1997). Amino acids, protein, and body weight. *Obes Res* 5, 373-376.
- Bray, G.A., and Gallagher, T.F., Jr. (1975). Manifestations of hypothalamic obesity in man: a comprehensive investigation of eight patients and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 54, 301-330.
- Breton, C., Lukaszewski, M.A., Risold, P.Y., Enache, M., Guillemot, J., Riviere, G., Delahaye, F., Lesage, J., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., *et al.* (2009). Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E462-472.
- Brightman, M.W., and Reese, T.S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40, 648-677.
- Broadwell, R.D., Balin, B.J., Salzman, M., and Kaplan, R.S. (1983). Brain-blood barrier? Yes and no. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 7352-7356.
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., and Hokfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15043-15048.
- Broberger, C., Landry, M., Wong, H., Walsh, J.N., and Hokfelt, T. (1997). Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 66, 393-408.
- Burdakov, D., Gerasimenko, O., and Verkhatsky, A. (2005). Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. *J Neurosci* 25, 2429-2433.
- Burgos-Ramos, E., Chowen, J.A., Argente, J., and Barrios, V. (2010). Regional and temporal differences in leptin signaling in rat brain. *Gen Comp Endocrinol* 167, 143-152.
- Burguera, B., Couce, M.E., Curran, G.L., Jensen, M.D., Lloyd, R.V., Cleary, M.P., and Poduslo, J.F. (2000). Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes* 49, 1219-1223.
- Butler, A.A., and Cone, R.D. (2002). The melanocortin receptors: lessons from knockout models. *Neuropeptides* 36, 77-84.

C

- Campbell, E.M., and Hope, T.J. (2003). Role of the cytoskeleton in nuclear import. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 761-771.
- Caro, J.F., Kolaczynski, J.W., Nycze, M.R., Ohannesian, J.P., Opentanova, I., Goldman, W.H., Lynn, R.B., Zhang, P.L., Sinha, M.K., and Considine, R.V. (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348, 159-161.

- Carroll, P., Sendtner, M., Meyer, M., and Thoenen, H. (1993). Rat ciliary neurotrophic factor (CNTF): gene structure and regulation of mRNA levels in glial cell cultures. *Glia* 9, 176-187.
- Carvalho, J.B., Torsoni, M.A., Ueno, M., Amaral, M.E., Araujo, E.P., Velloso, L.A., Gontijo, J.A., and Saad, M.J. (2005). Cross-talk between the insulin and leptin signaling systems in rat hypothalamus. *Obes Res* 13, 48-57.
- Casabiell, X., Pineiro, V., Tome, M.A., Peino, R., Dieguez, C., and Casanueva, F.F. (1997). Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4270-4273.
- Ceddia, R.B., William, W.N., Jr., Lima, F.B., Carpinelli, A.R., and Curi, R. (1998). Pivotal role of leptin in insulin effects. *Braz J Med Biol Res* 31, 715-722.
- Challis, B.G., Pinnock, S.B., Coll, A.P., Carter, R.N., Dickson, S.L., and O'Rahilly, S. (2003). Acute effects of PYY3-36 on food intake and hypothalamic neuropeptide expression in the mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 915-919.
- Challis, B.G., Pritchard, L.E., Creemers, J.W., Delplanque, J., Keogh, J.M., Luan, J., Wareham, N.J., Yeo, G.S., Bhattacharyya, S., Froguel, P., *et al.* (2002). A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum Mol Genet* 11, 1997-2004.
- Chambers, I., Cozens, A., Broadbent, J., Robertson, M., Lee, M., Li, M., and Smith, A. (1997). Structure of the mouse leukaemia inhibitory factor receptor gene: regulated expression of mRNA encoding a soluble receptor isoform from an alternative 5' untranslated region. *Biochem J* 328 (Pt 3), 879-888.
- Chaudhuri, J.D. (2000). Blood brain barrier and infection. *Med Sci Monit* 6, 1213-1222.
- Chau, E. (2003). Retinal neuroprotection by growth factors: a mechanistic perspective. *J Cell Biochem* 88, 57-75.
- Chen, C.H., and Rogers, R.C. (1995). Central inhibitory action of peptide YY on gastric motility in rats. *Am J Physiol* 269, R787-792.
- Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Weingarh, D.T., Adams, J.R., Frazier, E.G., Shen, Z., Marsh, D.J., Feighner, S.D., Guan, X.M., *et al.* (2004). Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145, 2607-2612.
- Cheung, C.C., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138, 4489-4492.
- Choi, J.S., Kim, S.Y., Park, H.J., Cha, J.H., Choi, Y.S., Chung, J.W., Chun, M.H., and Lee, M.Y. (2004). Differential regulation of ciliary neurotrophic factor and its receptor in the rat hippocampus in response to kainic acid-induced excitotoxicity. *Mol Cells* 17, 292-296.
- Chou, T.C., Scammell, T.E., Gooley, J.J., Gaus, S.E., Saper, C.B., and Lu, J. (2003). Critical role of dorsomedial hypothalamic nucleus in a wide range of behavioral circadian rhythms. *J Neurosci* 23, 10691-10702.
- Chronwall, B.M., DiMaggio, D.A., Massari, V.J., Pickel, V.M., Ruggiero, D.A., and O'Donohue, T.L. (1985). The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience* 15, 1159-1181.
- Cinti, S., Frederich, R.C., Zingaretti, M.C., De Matteis, R., Flier, J.S., and Lowell, B.B. (1997). Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology* 138, 797-804.
- Cioffi, J.A., Van Blerkom, J., Antczak, M., Shafer, A., Wittmer, S., and Snodgrass, H.R. (1997). The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 3, 467-472.
- Ciofi, P. (2011). The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. *Neurosci Lett* 487, 187-190.
- Ciofi, P., Garret, M., Lapirot, O., Lafon, P., Loyens, A., Prevot, V., and Levine, J.E. (2009). Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 150, 5509-5519.
- Ciofi, P., and Tramu, G. (1990). Distribution of cholecystokinin-like-immunoreactive neurons in the guinea pig forebrain. *J Comp Neurol* 300, 82-112.
- Clark, J.T., Kalra, P.S., Crowley, W.R., and Kalra, S.P. (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* 115, 427-429.

- Clatterbuck, R.E., Price, D.L., and Koliatsos, V.E. (1993). Ciliary neurotrophic factor prevents retrograde neuronal death in the adult central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2222-2226.
- Clement, L., Cruciani-Guglielmacci, C., Magnan, C., Vincent, M., Douared, L., Orosco, M., Assimacopoulos-Jeannet, F., Penicaud, L., and Ktorza, A. (2002). Intracerebroventricular infusion of a triglyceride emulsion leads to both altered insulin secretion and hepatic glucose production in rats. *Pflugers Arch* 445, 375-380.
- Codo, W., and Carlini, E.A. (1979). Postnatal undernutrition in rats: attempts to develop alternative methods to food deprive pups without maternal behavioral alteration. *Dev Psychobiol* 12, 475-484.
- Coleman, D.L. (1978). Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14, 141-148.
- Collin, M., Backberg, M., Ovesjo, M.L., Fisone, G., Edwards, R.H., Fujiyama, F., and Meister, B. (2003). Plasma membrane and vesicular glutamate transporter mRNAs/proteins in hypothalamic neurons that regulate body weight. *Eur J Neurosci* 18, 1265-1278.
- Conlon, J.M. (2002). The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides* 23, 269-278.
- Cottrell, E.C., Cripps, R.L., Duncan, J.S., Barrett, P., Mercer, J.G., Herwig, A., and Ozanne, S.E. (2009). Developmental changes in hypothalamic leptin receptor: relationship with the postnatal leptin surge and energy balance neuropeptides in the postnatal rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296, R631-639.
- Couce, M.E., Burguera, B., Parisi, J.E., Jensen, M.D., and Lloyd, R.V. (1997). Localization of leptin receptor in the human brain. *Neuroendocrinology* 66, 145-150.
- Couturier, C., and Jockers, R. (2003). Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers. *J Biol Chem* 278, 26604-26611.
- Couturier, C., Sarkis, C., Seron, K., Belouzard, S., Chen, P., Lenain, A., Corset, L., Dam, J., Vauthier, V., Dubart, A., *et al.* (2007). Silencing of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19476-19481.
- Couvreur, O., Ferezou, J., Gripois, D., Serougne, C., Crepin, D., Aubourg, A., Gertler, A., Vacher, C.M., and Taouis, M. (2011). Unexpected Long-Term Protection of Adult Offspring Born to High-Fat Fed

D

- Dams against Obesity Induced by a Sucrose-Rich Diet. *Plos One* 6.
- 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, 480-484.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., *et al.* (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37, 649-661.
- Cripps, R.L., Archer, Z.A., Mercer, J.G., and Ozanne, S.E. (2007). Early life programming of energy balance. *Biochem Soc Trans* 35, 1203-1204.
- Csiffary, A., Gorcs, T.J., and Palkovits, M. (1990). Neuropeptide Y innervation of ACTH-immunoreactive neurons in the arcuate nucleus of rats: a correlated light and electron microscopic double immunolabeling study. *Brain Res* 506, 215-222.
- Cummings, D.E., Foster-Schubert, K.E., and Overduin, J. (2005). Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. *Curr Drug Targets* 6, 153-169.
- Cummings, D.E., and Overduin, J. (2007). Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117, 13-23.

- Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., and Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714-1719.
- Curtis, B.M., Widmer, M.B., deRoos, P., and Qvarnstrom, E.E. (1990). IL-1 and its receptor are translocated to the nucleus. *J Immunol* 144, 1295-1303.
- Dakin, C.L., Small, C.J., Batterham, R.L., Neary, N.M., Cohen, M.A., Patterson, M., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2004). Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology* 145, 2687-2695.
- Dallner, C., Woods, A.G., Deller, T., Kirsch, M., and Hofmann, H.D. (2002). CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia* 37, 374-378.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M.S., Suganuma, T., Matsukura, S., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2000). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology* 141, 4255-4261.
- Date, Y., Nakazato, M., Hashiguchi, S., Dezaki, K., Mondal, M.S., Hosoda, H., Kojima, M., Kangawa, K., Arima, T., Matsuo, H., *et al.* (2002). Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 51, 124-129.
- Davidson, T.L., Chan, K., Jarrard, L.E., Kanoski, S.E., Clegg, D.J., and Benoit, S.C. (2009). Contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to energy and body weight regulation. *Hippocampus* 19, 235-252.
- Davis, S., Aldrich, T.H., Ip, N.Y., Stahl, N., Scherer, S., Farruggella, T., DiStefano, P.S., Curtis, R., Panayotatos, N., Gascan, H., *et al.* (1993a). Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* 259, 1736-1739.
- Davis, S., Aldrich, T.H., Stahl, N., Pan, L., Taga, T., Kishimoto, T., Ip, N.Y., and Yancopoulos, G.D. (1993b). LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* 260, 1805-1808.
- Dawson, R., Pelleymounter, M.A., Millard, W.J., Liu, S., and Eppler, B. (1997). Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. *Am J Physiol* 273, E202-206.
- de Moura, E.G., Lisboa, P.C., Custodio, C.M., Nunes, M.T., de Picoli Souza, K., and Passos, M.C. (2007). Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *J Nutr Biochem* 18, 134-139.
- de Quidt, M.E., and Emson, P.C. (1986). Distribution of neuropeptide Y-like immunoreactivity in the rat central nervous system--II. Immunohistochemical analysis. *Neuroscience* 18, 545-618.
- DeChiara, T.M., Vejsada, R., Poueymirou, W.T., Acheson, A., Suri, C., Conover, J.C., Friedman, B., McClain, J., Pan, L., Stahl, N., *et al.* (1995). Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83, 313-322.
- Del Prado, M., Delgado, G., and Villalpando, S. (1997). Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. *J Nutr* 127, 458-462.
- Delahaye, F., Breton, C., Risold, P.Y., Enache, M., Dutriez-Casteloot, I., Laborie, C., Lesage, J., and Vieau, D. (2008). Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. *Endocrinology* 149, 470-475.
- Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., *et al.* (2004). Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4827-4832.
- Devaskar, S.U., Ollesch, C., Rajakumar, R.A., and Rajakumar, P.A. (1997). Developmental changes in ob gene expression and circulating leptin peptide concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 44-47.
- 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, 18304-18310.

- Devos, R., Richards, J.G., Campfield, L.A., Tartaglia, L.A., Guisez, Y., van der Heyden, J., Tavernier, J., Plaetinck, G., and Burn, P. (1996). OB protein binds specifically to the choroid plexus of mice and rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5668-5673.
- 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, 771-777.
- Dietrich, M.O., Spuch, C., Antequera, D., Rodal, I., de Yebenes, J.G., Molina, J.A., Bermejo, F., and Carro, E. (2008). Megalin mediates the transport of leptin across the blood-CSF barrier. *Neurobiol Aging* 29, 902-912.
- Dolcet, X., Soler, R.M., Gould, T.W., Egea, J., Oppenheim, R.W., and Comella, J.X. (2001). Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol Cell Neurosci* 18, 619-631.
- Dore-Duffy, P. (2008). Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des* 14, 1581-1593.
- Draper, S., Kirigiti, M., Glavas, M., Grayson, B., Chong, C.N., Jiang, B., Smith, M.S., Zeltser, L.M., and Grove, K.L. (2010). Differential gene expression between neuropeptide Y expressing neurons of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus and the arcuate nucleus: microarray analysis study. *Brain Res* 1350, 139-150.
- Duvernoy, H.M., and Risold, P.Y. (2007). The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev* 56, 119-147.

E

- Eckel, R.H. (2005). Obesity. *Circulation* 111, e257-259.
- Eddleston, M., and Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54, 15-36.
- Ehrlich, Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus: Eine Farbenanalytische Studie. (Thèse de doctorat), Berlin, August Hirschwald, 1885
- Egawa, M., Yoshimatsu, H., and Bray, G.A. (1989). Lateral hypothalamic injection of 2-deoxy-D-glucose suppresses sympathetic activity. *Am J Physiol* 257, R1386-1392.
- Egawa, M., Yoshimatsu, H., and Bray, G.A. (1990). Effect of corticotropin releasing hormone and neuropeptide Y on electrophysiological activity of sympathetic nerves to interscapular brown adipose tissue. *Neuroscience* 34, 771-775.
- Eidelman, A.I., and Samueloff, A. (2002). The pathophysiology of the fetus of the diabetic mother. *Semin Perinatol* 26, 232-236.
- Eizayaga, F., Scorticati, C., Prestifilippo, J.P., Romay, S., Fernandez, M.A., Castro, J.L., Lemberg, A., and Perazzo, J.C. (2006). Altered blood-brain barrier permeability in rats with prehepatic portal hypertension turns to normal when portal pressure is lowered. *World J Gastroenterol* 12, 1367-1372.
- Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21, 1375-1385.
- Elias, C.F., Lee, C.E., Kelly, J.F., Ahima, R.S., Kuhar, M., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (2001). Characterization of CART neurons in the rat and human hypothalamus. *J Comp Neurol* 432, 1-19.
- Elmquist, J.K., Ahima, R.S., Elias, C.F., Flier, J.S., and Saper, C.B. (1998a). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 741-746.
- Elmquist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., and Saper, C.B. (1998b). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol* 395, 535-547.

- Elmqvist, J.K., Elias, C.F., and Saper, C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 22, 221-232.
- Elson, G.C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A.B., Delneste, Y., Bonnefoy, J.Y., *et al.* (2000). CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* 3, 867-872.
- Emond, M., Schwartz, G.J., and Moran, T.H. (2001). Meal-related stimuli differentially induce c-Fos activation in the nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280, R1315-1321.
- Epelbaum, J., Bedjaoui, N., Dardennes, R., Feng, D.D., Gardette, R., Grouselle, D., Loudes, C., Simon, A., Tolle, V., Yang, S.K., *et al.* (2010). Role of the ghrelin/obestatin balance in the regulation of neuroendocrine circuits controlling body composition and energy homeostasis. *Mol Cell Endocrinol* 314, 244-247.
- Eriksson, J.G., Forsen, T.J., Osmond, C., and Barker, D.J. (2003). Pathways of infant and childhood growth that lead to type 2 diabetes. *Diabetes Care* 26, 3006-3010.
- Ettinger, M.P., Littlejohn, T.W., Schwartz, S.L., Weiss, S.R., McIlwain, H.H., Heymsfield, S.B., Bray, G.A., Roberts, W.G., Heyman, E.R., Stambler, N., *et al.* (2003). Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *JAMA* 289, 1826-1832.

F

- Fagundes, A.T., Moura, E.G., Passos, M.C., Oliveira, E., Toste, F.P., Bonomo, I.T., Trevenzoli, I.H., Garcia, R.M., and Lisboa, P.C. (2007). Maternal low-protein diet during lactation programmes body composition and glucose homeostasis in the adult rat offspring. *Br J Nutr* 98, 922-928.
- Fan, W., Boston, B.A., Kesterson, R.A., Hruby, V.J., and Cone, R.D. (1997). Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385, 165-168.
- Fei, H., Okano, H.J., Li, C., Lee, G.H., Zhao, C., Darnell, R., and Friedman, J.M. (1997). Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7001-7005.
- Ferezou-Viala, J., Roy, A.F., Serougne, C., Gripois, D., Parquet, M., Bailleux, V., Gertler, A., Delplanque, B., Djiane, J., Riottot, M., *et al.* (2007a). Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 293, R1056-R1062.
- Ferezou-Viala, J., Roy, A.F., Serougne, C., Gripois, D., Parquet, M., Bailleux, V., Gertler, A., Delplanque, B., Djiane, J., Riottot, M., *et al.* (2007b). Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293, R1056-1062.
- Fernstrom, J.D. (1985). Dietary effects on brain serotonin synthesis: relationship to appetite regulation. *Am J Clin Nutr* 42, 1072-1082.
- Fernstrom, J.D., and Fernstrom, M.H. (2001). Diet, monoamine neurotransmitters and appetite control. *Nestle Nutr Workshop Ser Clin Perform Programme* 5, 117-131; discussion 131-113.
- Fernstrom, J.D., and Wurtman, R.J. (1972). Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science* 178, 414-416.
- Figlewicz, D.P., Stein, L.J., West, D., Porte, D., Jr., and Woods, S.C. (1986). Intracisternal insulin alters sensitivity to CCK-induced meal suppression in baboons. *Am J Physiol* 250, R856-860.
- Florkiewicz, R.Z., Majack, R.A., Buechler, R.D., and Florkiewicz, E. (1995). Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J Cell Physiol* 162, 388-399.
- Fong, T.M., Huang, R.R., Tota, M.R., Mao, C., Smith, T., Varnerin, J., Karpitskiy, V.V., Krause, J.E., and Van der Ploeg, L.H. (1998). Localization of leptin binding domain in the leptin receptor. *Mol Pharmacol* 53, 234-240.

- Fowden, A.L., Giussani, D.A., and Forhead, A.J. (2005). Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. *Early Hum Dev* 81, 723-734.
- Friedman, B., Scherer, S.S., Rudge, J.S., Helgren, M., Morrisey, D., McClain, J., Wang, D.Y., Wiegand, S.J., Furth, M.E., Lindsay, R.M., *et al.* (1992). Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron* 9, 295-305.
- Fujita, N., Sakamaki, H., Uotani, S., Takahashi, R., Kuwahara, H., Kita, A., Oshima, K., Yamasaki, H., Yamaguchi, Y., and Eguchi, K. (2003). Intracerebroventricular administration of insulin and glucose inhibits the anorectic action of leptin in rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 228, 1156-1161.
- Funahashi, H., Hori, T., Shimoda, Y., Mizushima, H., Ryushi, T., Katoh, S., and Shioda, S. (2000). Morphological evidence for neural interactions between leptin and orexin in the hypothalamus. *Regul Pept* 92, 31-35.
- Funahashi, H., Yada, T., Muroya, S., Takigawa, M., Ryushi, T., Horie, S., Nakai, Y., and Shioda, S. (1999). The effect of leptin on feeding-regulating neurons in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 264, 117-120.

G

- Gallou-Kabani, C., Vige, A., Gross, M.S., Boileau, C., Rabes, J.P., Fruchart-Najib, J., Jais, J.P., and Junien, C. (2007). Resistance to high-fat diet in the female progeny of obese mice fed a control diet during the periconceptual, gestation, and lactation periods. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292, E1095-1100.
- Garbers, C., Thaiss, W., Jones, G.W., Waetzig, G.H., Lorenzen, I., Guilhot, F., Lissilaa, R., Ferlin, W.G., Grotzinger, J., Jones, S.A., *et al.* (2011). Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble GP130 which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *J Biol Chem*.
- Garcia-Caceres, C., Fuente-Martin, E., Burgos-Ramos, E., Granado, M., Frago, L.M., Barrios, V., Horvath, T., Argente, J., and Chowen, J.A. (2011). Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology* 152, 1809-1818.
- Garcia-Segura, L.M., and McCarthy, M.M. (2004). Minireview: Role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology* 145, 1082-1086.
- Garcia, M.A., Carrasco, M., Godoy, A., Reinicke, K., Montecinos, V.P., Aguayo, L.G., Tapia, J.C., Vera, J.C., and Nualart, F. (2001). Elevated expression of glucose transporter-1 in hypothalamic ependymal cells not involved in the formation of the brain-cerebrospinal fluid barrier. *J Cell Biochem* 80, 491-503.
- Garcia, M.D., Casanueva, F.F., Dieguez, C., and Senaris, R.M. (2000). Gestational profile of leptin messenger ribonucleic acid (mRNA) content in the placenta and adipose tissue in the rat, and regulation of the mRNA levels of the leptin receptor subtypes in the hypothalamus during pregnancy and lactation. *Biol Reprod* 62, 698-703.
- Gautron, L., and Elmquist, J.K. (2011). Sixteen years and counting: an update on leptin in energy balance. *J Clin Invest* 121, 2087-2093.
- Gearing, D.P., Ziegler, S.F., Comeau, M.R., Friend, D., Thoma, B., Cosman, D., Park, L., and Mosley, B. (1994). Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1119-1123.
- Gehlert, D.R., Chronwall, B.M., Schafer, M.P., and O'Donohue, T.L. (1987). Localization of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in rat and mouse brain by in situ hybridization. *Synapse* 1, 25-31.
- Giannakakou, P., Sackett, D.L., Ward, Y., Webster, K.R., Blagosklonny, M.V., and Fojo, T. (2000). p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat Cell Biol* 2, 709-717.

- Giaume, C., and McCarthy, K.D. (1996). Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci* 19, 319-325.
- Gibson, E.L., Wainwright, C.J., and Booth, D.A. (1995). Disguised protein in lunch after low-protein breakfast conditions food-flavor preferences dependent on recent lack of protein intake. *Physiol Behav* 58, 363-371.
- Gietzen, D.W. (1993). Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J Nutr* 123, 610-625.
- Gietzen, D.W., and Magrum, L.J. (2001). Molecular mechanisms in the brain involved in the anorexia of branched-chain amino acid deficiency. *J Nutr* 131, 851S-855S.
- Glasow, A., Kiess, W., Anderegg, U., Berthold, A., Bottner, A., and Kratzsch, J. (2001). Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 4472-4479.
- Glatzle, J., Raybould, H.E., Kueper, M.A., Reeve, J.R., Jr., and Zittel, T.T. (2008). Cholecystokinin-58 is more potent in inhibiting food intake than cholecystokinin-8 in rats. *Nutr Neurosci* 11, 69-74.
- Glavas, M.M., Grayson, B.E., Allen, S.E., Copp, D.R., Smith, M.S., Cowley, M.A., and Grove, K.L. (2008). Characterization of brainstem peptide YY (PYY) neurons. *J Comp Neurol* 506, 194-210.
- Gloaguen, I., Costa, P., Demartis, A., Lazzaro, D., Di Marco, A., Graziani, R., Paonessa, G., Chen, F., Rosenblum, C.I., Van der Ploeg, L.H., *et al.* (1997). Ciliary neurotrophic factor corrects obesity and diabetes associated with leptin deficiency and resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 6456-6461.
- Gluckman, P.D., and Hanson, M.A. (2004). Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 305, 1733-1736.
- Gluckman, P.D., Hanson, M.A., and Spencer, H.G. (2005). Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends Ecol Evol* 20, 527-533.
- Gold, R.M. (1973). Hypothalamic obesity: the myth of the ventromedial nucleus. *Science* 182, 488-490.
- Goldfarb, D.S., Corbett, A.H., Mason, D.A., Harreman, M.T., and Adam, S.A. (2004). Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol* 14, 505-514.
- Goldmann, « Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbung. », dans *Beitr. Klin. Chirurg.*, vol. 64, 1909, p. 192-265
- Goldmann, « Vitalfärbung am Zentralnervensystem. », dans *Abh. K. Preuss. Akad. Wiss. Phys. Med.*, vol. 1, 1913, p. 1-60
- Gong, L., Yao, F., Hockman, K., Heng, H.H., Morton, G.J., Takeda, K., Akira, S., Low, M.J., Rubinstein, M., and MacKenzie, R.G. (2008). Signal transducer and activator of transcription-3 is required in hypothalamic agouti-related protein/neuropeptide Y neurons for normal energy homeostasis. *Endocrinology* 149, 3346-3354.
- Gooley, J.J., Schomer, A., and Saper, C.B. (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nat Neurosci* 9, 398-407.
- Gouin, F., Couillaud, S., Cottrel, M., Godard, A., Passuti, N., and Heymann, D. (1999). Presence of leukaemia inhibitory factor (LIF) and LIF-receptor chain (gp190) in osteoclast-like cells cultured from human giant cell tumour of bone. Ultrastructural distribution. *Cytokine* 11, 282-289.
- Grattan, D.R., Ladyman, S.R., and Augustine, R.A. (2007). Hormonal induction of leptin resistance during pregnancy. *Physiol Behav* 91, 366-374.
- Grayson, B.E., Kievit, P., Smith, M.S., and Grove, K.L. (2010). Critical determinants of hypothalamic appetitive neuropeptide development and expression: species considerations. *Front Neuroendocrinol* 31, 16-31.
- Green, E.D., Maffei, M., Braden, V.V., Proenca, R., DeSilva, U., Zhang, Y., Chua, S.C., Jr., Leibel, R.L., Weissenbach, J., and Friedman, J.M. (1995). The human obese (OB) gene: RNA expression pattern and mapping on the physical, cytogenetic, and genetic maps of chromosome 7. *Genome Res* 5, 5-12.
- Greenman, Y., Golani, N., Gilad, S., Yaron, M., Limor, R., and Stern, N. (2004). Ghrelin secretion is modulated in a nutrient- and gender-specific manner. *Clin Endocrinol (Oxf)* 60, 382-388.
- Grill, H.J., Schwartz, M.W., Kaplan, J.M., Foxhall, J.S., Breining, J., and Baskin, D.G. (2002). Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* 143, 239-246.

- Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A.W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., *et al.* (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci* 8, 1289-1291.
- Grove, K.L., Allen, S., Grayson, B.E., and Smith, M.S. (2003). Postnatal development of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Neuroscience* 116, 393-406.
- Grove, K.L., and Smith, M.S. (2003). Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav* 79, 47-63.
- Gualillo, O., Lago, F., Garcia, M., Menendez, C., Senaris, R., Casanueva, F.F., and Dieguez, C. (1999). Prolactin stimulates leptin secretion by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 140, 5149-5153.
- Guo, F., and Jen, K.L. (1995). High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* 57, 681-686.
- Gupta, S.K., Altares, M., Benoit, R., Riopelle, R.J., Dunn, R.J., and Richardson, P.M. (1992). Preparation and biological properties of native and recombinant ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* 23, 481-490.
- Guran, T., Turan, S., Bereket, A., Akcay, T., Unluguzel, G., Bas, F., Gunoz, H., Saka, N., Bundak, R., Darendeliler, F., *et al.* (2009). The role of leptin, soluble leptin receptor, resistin, and insulin secretory dynamics in the pathogenesis of hypothalamic obesity in children. *Eur J Pediatr* 168, 1043-1048.

H

- Haas, S.J., Ahrens, A., Petrov, S., Schmitt, O., and Wree, A. (2004). Quinolinic acid lesions of the caudate putamen in the rat lead to a local increase of ciliary neurotrophic factor. *J Anat* 204, 271-281.
- Hagg, T., and Varon, S. (1993). Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of adult rat substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6315-6319.
- Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1998). Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1, 271-272.
- Hajnal, A., Norgren, R., and Kovacs, P. (2009). Parabrachial coding of sapid sucrose: relevance to reward and obesity. *Ann N Y Acad Sci* 1170, 347-364.
- 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, 559-572.
- Hales, C.N. (2000). Early programming of glucose metabolism, insulin action and longevity. *Adv Exp Med Biol* 478, 57-64.
- Hales, C.N., and Barker, D.J. (1992). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35, 595-601.
- Hales, C.N., Desai, M., Ozanne, S.E., and Crowther, N.J. (1996). Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans* 24, 341-350.
- Hanson, M.A., and Gluckman, P.D. (2005). Developmental processes and the induction of cardiovascular function: conceptual aspects. *J Physiol* 565, 27-34.
- Harding, A.H., Williams, D.E., Hennings, S.H., Mitchell, J., and Wareham, N.J. (2001). Is the association between dietary fat intake and insulin resistance modified by physical activity? *Metabolism* 50, 1186-1192.
- Harvey, J. (2007). Leptin regulation of neuronal excitability and cognitive function. *Curr Opin Pharmacol* 7, 643-647.
- Hatton, G.I. (1997). Function-related plasticity in hypothalamus. *Annu Rev Neurosci* 20, 375-397.
- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J., and Yamamoto, H. (1997). Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19, 13-26.
- Haydon, P.G., and Carmignoto, G. (2006). Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86, 1009-1031.

- Heidema, A.G., Wang, P., van Rossum, C.T., Feskens, E.J., Boer, J.M., Bouwman, F.G., Van't Veer, P., and Mariman, E.C. (2010). Sex-specific effects of CNTF, IL6 and UCP2 polymorphisms on weight gain. *Physiol Behav* 99, 1-7.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H.M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20.
- Heinrich, P.C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998). Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 (Pt 2), 297-314.
- Helfand, S.L., Smith, G.A., and Wessells, N.K. (1976). Survival and development in culture of dissociated parasympathetic neurons from ciliary ganglia. *Dev Biol* 50, 541-547.
- Helgren, M.E., Squinto, S.P., Davis, H.L., Parry, D.J., Boulton, T.G., Heck, C.S., Zhu, Y., Yancopoulos, G.D., Lindsay, R.M., and DiStefano, P.S. (1994). Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle. *Cell* 76, 493-504.
- Hendry, I.A., Murphy, M., Hilton, D.J., Nicola, N.A., and Bartlett, P.F. (1992). Binding and retrograde transport of leukemia inhibitory factor by the sensory nervous system. *J Neurosci* 12, 3427-3434.
- Henson, M.C., and Castracane, V.D. (2000). Leptin in pregnancy. *Biol Reprod* 63, 1219-1228.
- Hentges, S.T., Nishiyama, M., Overstreet, L.S., Stenzel-Poore, M., Williams, J.T., and Low, M.J. (2004). GABA release from proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci* 24, 1578-1583.
- Herrera, E., Lasuncion, M.A., Huerta, L., and Martin-Hidalgo, A. (2000). Plasma leptin levels in rat mother and offspring during pregnancy and lactation. *Biol Neonate* 78, 315-320.
- Hervey, G.R. (1959). The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol* 145, 336-352.
- Hetherington AW, Ranson SW (1940) Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anatomical Record*. 78: 149.
- Hileman, S.M., Pierroz, D.D., Masuzaki, H., Bjorbaek, 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, 775-783.
- Hill, J.W., Williams, K.W., Ye, C., Luo, J., Balthasar, N., Coppari, R., Cowley, M.A., Cantley, L.C., Lowell, B.B., and Elmquist, J.K. (2008). Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J Clin Invest* 118, 1796-1805.
- Hilton, D.J., Nicola, N.A., and Metcalf, D. (1991). Distribution and comparison of receptors for leukemia inhibitory factor on murine hemopoietic and hepatic cells. *J Cell Physiol* 146, 207-215.
- Hochmeister, S., Grundtner, R., Bauer, J., Engelhardt, B., Lyck, R., Gordon, G., Korosec, T., Kutzelnigg, A., Berger, J.J., Bradl, M., *et al.* (2006). Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 65, 855-865.
- Hoentjen, F., Hopman, W.P., and Jansen, J.B. (2001). Effect of circulating peptide YY on gallbladder emptying in humans. *Scand J Gastroenterol* 36, 1086-1091.
- Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J.S., Williams, L.M., Trayhurn, P., and Mercer, J.G. (1997). Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11073-11078.
- Holemans, K., Caluwaerts, S., Poston, L., and Van Assche, F.A. (2004). Diet-induced obesity in the rat: A model for gestational diabetes mellitus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 190, 858-865.
- Hommel, J.D., Trinko, R., Sears, R.M., Georgescu, D., Liu, Z.W., Gao, X.B., Thurmon, J.J., Marinelli, M., and DiLeone, R.J. (2006). Leptin receptor signaling in midbrain dopamine neurons regulates feeding. *Neuron* 51, 801-810.
- Horvath, T.L., Diano, S., and van den Pol, A.N. (1999). Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *J Neurosci* 19, 1072-1087.
- Hoyt, E.C., Lund, P.K., Winesett, D.E., Fuller, C.R., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., and Ulshen, M.H. (1996). Effects of fasting, refeeding, and intraluminal triglyceride on proglucagon expression in jejunum and ileum. *Diabetes* 45, 434-439.
- Hsuchou, H., He, Y., Kastin, A.J., Tu, H., Markadakis, E.N., Rogers, R.C., Fossier, P.B., and Pan, W. (2009a). Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain* 132, 889-902.

- Hsuchou, H., Pan, W., Barnes, M.J., and Kastin, A.J. (2009b). Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes. *Peptides* 30, 2275-2280.
- Hu, X., Zhao, Y., He, X., Li, J., Wang, T., Zhou, W., Wan, D., Wang, H., and Gu, J. (2008). Ciliary neurotrophic factor receptor alpha subunit-modulated multiple downstream signaling pathways in hepatic cancer cell lines and their biological implications. *Hepatology* 47, 1298-1308.
- Hu, Y., Bloomquist, B.T., Cornfield, L.J., DeCarr, L.B., Flores-Riveros, J.R., Friedman, L., Jiang, P., Lewis-Higgins, L., Sadlowski, Y., Schaefer, J., *et al.* (1996). Identification of a novel hypothalamic neuropeptide Y receptor associated with feeding behavior. *J Biol Chem* 271, 26315-26319.
- Huang, X.F., Koutcherov, I., Lin, S., Wang, H.Q., and Storlien, L. (1996). Localization of leptin receptor mRNA expression in mouse brain. *Neuroreport* 7, 2635-2638.
- Huang, Y., Ying, K., Xie, Y., Zhou, Z., Wang, W., Tang, R., Zhao, W., Zhao, S., Wu, H., Gu, S., *et al.* (2001). Cloning and characterization of a novel human leptin receptor overlapping transcript-like 1 gene (LEPROTL1). *Biochim Biophys Acta* 1517, 327-331.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B.G., and Kemler, R. (1996). Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev* 59, 3-10.
- Huff, R.L., Trautman, R., and Van Dyke, D.C. (1950). Nature of exchanges in parabiotic rats. *Am J Physiol* 161, 56-74.
- Huo, L., Maeng, L., Bjorbaek, C., and Grill, H.J. (2007). Leptin and the control of food intake: neurons in the nucleus of the solitary tract are activated by both gastric distension and leptin. *Endocrinology* 148, 2189-2197.

I

- Ifft, J.D. (1972). An autoradiographic study of the time of final division of neurons in rat hypothalamic nuclei. *J Comp Neurol* 144, 193-204.
- Ihle, J.N., and Kerr, I.M. (1995). Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11, 69-74.
- Ip, F.C., Fu, A.K., Tsim, K.W., and Ip, N.Y. (1996). Differential expression of ciliary neurotrophic factor receptor in skeletal muscle of chick and rat after nerve injury. *J Neurochem* 67, 1607-1612.
- Ip, N.Y., McClain, J., Barrezueta, N.X., Aldrich, T.H., Pan, L., Li, Y., Wiegand, S.J., Friedman, B., Davis, S., and Yancopoulos, G.D. (1993a). The alpha component of the CNTF receptor is required for signaling and defines potential CNTF targets in the adult and during development. *Neuron* 10, 89-102.
- Ip, N.Y., Wiegand, S.J., Morse, J., and Rudge, J.S. (1993b). Injury-induced regulation of ciliary neurotrophic factor mRNA in the adult rat brain. *Eur J Neurosci* 5, 25-33.
- Ip, N.Y., and Yancopoulos, G.D. (1992). Ciliary neurotrophic factor and its receptor complex. *Prog Growth Factor Res* 4, 139-155.
- Irving, A.J., Wallace, L., Durakoglugil, D., and Harvey, J. (2006). Leptin enhances NR2B-mediated N-methyl-D-aspartate responses via a mitogen-activated protein kinase-dependent process in cerebellar granule cells. *Neuroscience* 138, 1137-1148.
- Iskandar, K., Cao, Y., Hayashi, Y., Nakata, M., Takano, E., Yada, T., Zhang, C., Ogawa, W., Oki, M., Chua, S., Jr., *et al.* (2010). PDK-1/FoxO1 pathway in POMC neurons regulates Pomc expression and food intake. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E787-798.
- Isse, N., Ogawa, Y., Tamura, N., Masuzaki, H., Mori, K., Okazaki, T., Satoh, N., Shigemoto, M., Yoshimasa, Y., Nishi, S., *et al.* (1995). Structural organization and chromosomal assignment of the human obese gene. *J Biol Chem* 270, 27728-27733.
- Izaurrealde, E., Kann, M., Pante, N., Sodeik, B., and Hohn, T. (1999). Viruses, microorganisms and scientists meet the nuclear pore. *Leysin, VD, Switzerland, February 26-March 1, 1998. EMBO J* 18, 289-296.

J

- Janoschek, R., Plum, L., Koch, L., Munzberg, H., Diano, S., Shanabrough, M., Muller, W., Horvath, T.L., and Bruning, J.C. (2006). gp130 signaling in proopiomelanocortin neurons mediates the acute anorectic response to centrally applied ciliary neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 10707-10712.
- Jobst, E.E., Enriori, P.J., and Cowley, M.A. (2004). The electrophysiology of feeding circuits. *Trends Endocrinol Metab* *15*, 488-499.
- Johnson, A.K., and Gross, P.M. (1993). Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J* *7*, 678-686.
- Joly, J.S., Osorio, J., Alunni, A., Auger, H., Kano, S., and Retaux, S. (2007). Windows of the brain: towards a developmental biology of circumventricular and other neurohemal organs. *Semin Cell Dev Biol* *18*, 512-524.
- Jones, A.P., Simson, E.L., and Friedman, M.I. (1984). Gestational undernutrition and the development of obesity in rats. *J Nutr* *114*, 1484-1492.
- Jostock, T., Mullberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M.F., and Rose-John, S. (2001). Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem* *268*, 160-167.
- Junien, C., Gallou-Kabani, C., Vige, A., and Gross, M.S. (2005). [Nutritional epigenomics of metabolic syndrome]. *Med Sci (Paris)* *21*, 396-404.

K

- Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J., and Bonvento, G. (1998). Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* *23*, 1-10.
- Kadowaki, T., and Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* *26*, 439-451.
- Kallen, K.J., Galle, P.R., and Rose-John, S. (1999). New developments in IL-6 dependent biology and therapy: where do we stand and what are the options? *Expert Opin Investig Drugs* *8*, 1327-1349.
- Kalman M (2004) Glial reaction and reactive glia. In: *Non neuronal cells of the nervous system: function and dysfunction* (Hertz L, ed), pp 787-835. Amsterdam: Elsevier.
- 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. *Regul Pept* *111*, 1-11.
- Kalra, S.P., Dube, M.G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T.L., and Kalra, P.S. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* *20*, 68-100.
- Kalsbeek, A., and Buijs, R.M. (2002). Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell Tissue Res* *309*, 109-118.
- Kastin, A.J., and Pan, W. (2000). Dynamic regulation of leptin entry into brain by the blood-brain barrier. *Regul Pept* *92*, 37-43.
- Kastin, A.J., Pan, W., Maness, L.M., Koletsky, R.J., and Ernsberger, P. (1999). Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides* *20*, 1449-1453.
- Keller AD, Noble WM. Further observations on enhanced appetite with resultant adiposity following removal of the posterior lobe of the hypophysis. *Am J Physiol* 1936;116:90- 1.

- Kelly, J.F., Elias, C.F., Lee, C.E., Ahima, R.S., Seeley, R.J., Bjorbaek, C., Oka, T., Saper, C.B., Flier, J.S., and Elmquist, J.K. (2004). Ciliary neurotrophic factor and leptin induce distinct patterns of immediate early gene expression in the brain. *Diabetes* 53, 911-920.
- Khan, I.Y., Dekou, V., Douglas, G., Jensen, R., Hanson, M.A., Poston, L., and Taylor, P.D. (2005). A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R127-133.
- Khan, I.Y., Taylor, P.D., Dekou, V., Seed, P.T., Lakasing, L., Graham, D., Dominiczak, A.F., Hanson, M.A., and Poston, L. (2003). Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension* 41, 168-175.
- Kim, K., and Hay, E.D. (2001). New evidence that nuclear import of endogenous beta-catenin is LEF-1 dependent, while LEF-1 independent import of exogenous beta-catenin leads to nuclear abnormalities. *Cell Biol Int* 25, 1149-1161.
- King, B.M. (2006). The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav* 87, 221-244.
- Kinzig, K.P., D'Alessio, D.A., and Seeley, R.J. (2002). The diverse roles of specific GLP-1 receptors in the control of food intake and the response to visceral illness. *J Neurosci* 22, 10470-10476.
- Kirwin, S.M., Bhandari, V., Dimatteo, D., Barone, C., Johnson, L., Paul, S., Spitzer, A.R., Chander, A., Hassink, S.G., and Funanage, V.L. (2006). Leptin enhances lung maturity in the fetal rat. *Pediatr Res* 60, 200-204.
- Kissileff, H.R., Carretta, J.C., Geliebter, A., and Pi-Sunyer, F.X. (2003). Cholecystokinin and stomach distension combine to reduce food intake in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R992-998.
- 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, 41547-41555.
- Koblar, S.A., Turnley, A.M., Classon, B.J., Reid, K.L., Ware, C.B., Cheema, S.S., Murphy, M., and Bartlett, P.F. (1998). Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3178-3181.
- 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, 656-660.
- Kokoeva, M.V., Yin, H., and Flier, J.S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310, 679-683.
- Konturek, S.J., Pepera, J., Zabielski, K., Konturek, P.C., Pawlik, T., Szlachcic, A., and Hahn, E.G. (2003). Brain-gut axis in pancreatic secretion and appetite control. *J Physiol Pharmacol* 54, 293-317.
- Korner, J., and Leibel, R.L. (2003). To eat or not to eat - how the gut talks to the brain. *N Engl J Med* 349, 926-928.
- Kow, L.M., and Pfaff, D.W. (1991). The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacol Biochem Behav* 38, 359-364.
- Kozak, R., Burlet, A., Burlet, C., and Beck, B. (2000). Dietary composition during fetal and neonatal life affects neuropeptide Y functioning in adult offspring. *Brain Res Dev Brain Res* 125, 75-82.
- Kozak, R., Richy, S., and Beck, B. (2005). Persistent alterations in neuropeptide Y release in the paraventricular nucleus of rats subjected to dietary manipulation during early life. *Eur J Neurosci* 21, 2887-2892.
- Krisch, B., and Leonhardt, H. (1978). The functional and structural border of the neurohemal region of the median eminence. *Cell Tissue Res* 192, 327-339.
- 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., *et al.* (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72-76.
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Gruters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19, 155-157.
- Krum, J.M., Kenyon, K.L., and Rosenstein, J.M. (1997). Expression of blood-brain barrier characteristics following neuronal loss and astroglial damage after administration of anti-Thy-1 immunotoxin. *Exp Neurol* 146, 33-45.

- Kruttgen, A., Grotzinger, J., Kurapkat, G., Weis, J., Simon, R., Thier, M., Schroder, M., Heinrich, P., Wollmer, A., Comeau, M., *et al.* (1995). Human ciliary neurotrophic factor: a structure-function analysis. *Biochem J* 309 (Pt 1), 215-220.
- Kurtz, T.W., Morris, R.C., and Pershadsingh, H.A. (1989). The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension* 13, 896-901.
- la Fleur, S.E., Kalsbeek, A., Wortel, J., and Buijs, R.M. (2000). Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. *Brain Res* 871, 50-56.

L

- Ladyman, S.R. (2008). Leptin resistance during pregnancy in the rat. *J Neuroendocrinol* 20, 269-277.
- Lam, M.H., Thomas, R.J., Loveland, K.L., Schilders, S., Gu, M., Martin, T.J., Gillespie, M.T., and Jans, D.A. (2002). Nuclear transport of parathyroid hormone (PTH)-related protein is dependent on microtubules. *Mol Endocrinol* 16, 390-401.
- Lambert, P.D., Anderson, K.D., Sleeman, M.W., Wong, V., Tan, J., Hjarunguru, A., Corcoran, T.L., Murray, J.D., Thabet, K.E., Yancopoulos, G.D., *et al.* (2001). Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4652-4657.
- Lammert, A., Kiess, W., Bottner, A., Glasow, A., and Kratzsch, J. (2001). Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood. *Biochem Biophys Res Commun* 283, 982-988.
- Langenhan, T., Sendtner, M., Holtmann, B., Carroll, P., and Asan, E. (2005). Ciliary neurotrophic factor-immunoreactivity in olfactory sensory neurons. *Neuroscience* 134, 1179-1194.
- Langley-Evans, S.C. (1996). Intrauterine programming of hypertension in the rat: nutrient interactions. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 114, 327-333.
- Langley-Evans, S.C., Welham, S.J., and Jackson, A.A. (1999). Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci* 64, 965-974.
- Larhammar, D. (1996). Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept* 65, 165-174.
- Laud, K., Gourdou, I., Belair, L., Keisler, D.H., and Djiane, J. (1999). Detection and regulation of leptin receptor mRNA in ovine mammary epithelial cells during pregnancy and lactation. *FEBS Lett* 463, 194-198.
- Le Feuvre, R.A., Woods, A.J., Stock, M.J., and Rothwell, N.J. (1991). Effects of central injection of glucose on thermogenesis in normal, VMH-lesioned and genetically obese rats. *Brain Res* 547, 110-114.
- Lee, M.Y., Deller, T., Kirsch, M., Frotscher, M., and Hofmann, H.D. (1997). Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha expression in astrocytes and neurons of the fascia dentata after entorhinal cortex lesion. *J Neurosci* 17, 1137-1146.
- Leibowitz, S.F. (1991). Brain neuropeptide Y: an integrator of endocrine, metabolic and behavioral processes. *Brain Res Bull* 27, 333-337.
- Leininger, G.M., Jo, Y.H., Leshan, R.L., Louis, G.W., Yang, H., Barrera, J.G., Wilson, H., Opland, D.M., Faouzi, M.A., Gong, Y., *et al.* (2009). Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. *Cell Metab* 10, 89-98.
- Leloup, C., Orosco, M., Serradas, P., Nicolaidis, S., and Penicaud, L. (1998). Specific inhibition of GLUT2 in arcuate nucleus by antisense oligonucleotides suppresses nervous control of insulin secretion. *Brain Res Mol Brain Res* 57, 275-280.
- Lemaire, J.J., Frew, A.J., McArthur, D., Gorgulho, A.A., Alger, J.R., Salomon, N., Chen, C., Behnke, E.J., and De Salles, A.A. (2011). White matter connectivity of human hypothalamus. *Brain Res* 1371, 43-64.

- Leonhardt, H., Krisch, B., and Erhardt, H. (1987). Organization of the neuroglia in the midsagittal plane of the central nervous system: A speculative report. In ‘Functional Morphology of Neuroendocrine Systems’ (B. Scharrer, H. W. Korf, and H. G. Hartwig, Eds.), pp. 175–187. SpringerVerlag, Berlin
- Leonard, W.J. (2001). Role of Jak kinases and STATs in cytokine signal transduction. *Int J Hematol* 73, 271-277.
- Lepercq, J., Challier, J.C., Guerre-Millo, M., Cauzac, M., Vidal, H., and Hauguel-de Mouzon, S. (2001). Prenatal leptin production: evidence that fetal adipose tissue produces leptin. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2409-2413.
- Leung, P.M., and Rogers, Q.R. (1971). Importance of prepyriform cortex in food-intake response of rats to amino acids. *Am J Physiol* 221, 929-935.
- Levin, B.E. (2006). Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1107-1121.
- Levin, B.E., Triscari, J., Marquet, E., and Sullivan, A.C. (1984). Dietary obesity and neonatal sympathectomy. I. Effects on body composition and brown adipose. *Am J Physiol* 247, R979-987.
- Levine, A.S., and Morley, J.E. (1984). Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides* 5, 1025-1029.
- Li, C., Chen, P., and Smith, M.S. (1998a). The acute suckling stimulus induces expression of neuropeptide Y (NPY) in cells in the dorsomedial hypothalamus and increases NPY expression in the arcuate nucleus. *Endocrinology* 139, 1645-1652.
- Li, C., Chen, P., and Smith, M.S. (1998b). Neuropeptide Y (NPY) neurons in the arcuate nucleus (ARH) and dorsomedial nucleus (DMH), areas activated during lactation, project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVH). *Regul Pept* 75-76, 93-100.
- Li, M., Sendtner, M., and Smith, A. (1995). Essential function of LIF receptor in motor neurons. *Nature* 378, 724-727.
- Li, M., Sloboda, D.M., and Vickers, M.H. (2011). Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. *Exp Diabetes Res* 2011, 592408.
- Li, X.L., Aou, S., Oomura, Y., Hori, N., Fukunaga, K., and Hori, T. (2002). Impairment of long-term potentiation and spatial memory in leptin receptor-deficient rodents. *Neuroscience* 113, 607-615.
- Licinio, J., Mantzoros, C., Negrao, A.B., Cizza, G., Wong, M.L., Bongiorno, P.B., Chrousos, G.P., Karp, B., Allen, C., Flier, J.S., *et al.* (1997). Human leptin levels are pulsatile and inversely related to pituitary-adrenal function. *Nat Med* 3, 575-579.
- Lin, H.C., and Chey, W.Y. (2003). Cholecystokinin and peptide YY are released by fat in either proximal or distal small intestine in dogs. *Regul Pept* 114, 131-135.
- Lin, L.F., Armes, L.G., Sommer, A., Smith, D.J., and Collins, F. (1990). Isolation and characterization of ciliary neurotrophic factor from rabbit sciatic nerves. *J Biol Chem* 265, 8942-8947.
- Lin, L.F., Mismar, D., Lile, J.D., Armes, L.G., Butler, E.T., 3rd, Vannice, J.L., and Collins, F. (1989). Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 246, 1023-1025.
- Lollmann, B., Gruninger, S., Stricker-Krongrad, A., and Chiesi, M. (1997). Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 648-652.
- Lostao, M.P., Urdaneta, E., Martinez-Anso, E., Barber, A., and Martinez, J.A. (1998). Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Lett* 423, 302-306.
- Lou, P.H., Yang, G., Huang, L., Cui, Y., Pourbahrami, T., Radda, G.K., Li, C., and Han, W. (2010). Reduced body weight and increased energy expenditure in transgenic mice over-expressing soluble leptin receptor. *PLoS One* 5, e11669.
- Lu, S., Guan, J.L., Wang, Q.P., Uehara, K., Yamada, S., Goto, N., Date, Y., Nakazato, M., Kojima, M., Kangawa, K., *et al.* (2002). Immunocytochemical observation of ghrelin-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 321, 157-160.
- Lucas, A. (1991). Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 156, 38-50; discussion 50-35.
- Lund, I.K., Hansen, J.A., Andersen, H.S., Moller, N.P., and Billestrup, N. (2005). Mechanism of protein tyrosine phosphatase 1B-mediated inhibition of leptin signalling. *J Mol Endocrinol* 34, 339-351.

- Luquet, S., and Magnan, C. (2009). The central nervous system at the core of the regulation of energy homeostasis. *Front Biosci (Schol Ed) 1*, 448-465.
- Luquet, S., Perez, F.A., Hnasko, T.S., and Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science 310*, 683-685.

M

- Maamra, M., Bidlingmaier, M., Postel-Vinay, M.C., Wu, Z., Strasburger, C.J., and Ross, R.J. (2001). Generation of human soluble leptin receptor by proteolytic cleavage of membrane-anchored receptors. *Endocrinology 142*, 4389-4393.
- MacLennan, A.J., Vinson, E.N., Marks, L., McLaurin, D.L., Pfeifer, M., and Lee, N. (1996). Immunohistochemical localization of ciliary neurotrophic factor receptor alpha expression in the rat nervous system. *J Neurosci 16*, 621-630.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., *et al.* (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med 1*, 1155-1161.
- Magistretti, P.J. (2006). Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol 209*, 2304-2311.
- Maresh, G.A., Maness, L.M., Zadina, J.E., and Kastin, A.J. (2001). In vitro demonstration of a saturable transport system for leptin across the blood-brain barrier. *Life Sci 69*, 67-73.
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G.G., and Hill, R.A. (2002). Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J Obes Relat Metab Disord 26*, 1407-1433.
- Markakis, E.A. (2002). Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Neuroendocrinol 23*, 257-291.
- Marks, J.L., Porte, D., Jr., Stahl, W.L., and Baskin, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology 127*, 3234-3236.
- Martin, R.L., Perez, E., He, Y.J., Dawson, R., Jr., and Millard, W.J. (2000). Leptin resistance is associated with hypothalamic leptin receptor mRNA and protein downregulation. *Metabolism 49*, 1479-1484.
- Masu, Y., Wolf, E., Holtmann, B., Sendtner, M., Brem, G., and Thoenen, H. (1993). Disruption of the CNTF gene results in motor neuron degeneration. *Nature 365*, 27-32.
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., *et al.* (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med 3*, 1029-1033.
- Mayer, J. (1996). Glucostatic mechanism of regulation of food intake. 1953. *Obes Res 4*, 493-496.
- McCance, D.R., Pettitt, D.J., Hanson, R.L., Jacobsson, L.T., Knowler, W.C., and Bennett, P.H. (1994). Birth weight and non-insulin dependent diabetes: thrifty genotype, thrifty phenotype, or surviving small baby genotype? *BMJ 308*, 942-945.
- McGregor, N.E., Poulton, I.J., Walker, E.C., Pompolo, S., Quinn, J.M., Martin, T.J., and Sims, N.A. (2010). Ciliary neurotrophic factor inhibits bone formation and plays a sex-specific role in bone growth and remodeling. *Calcif Tissue Int 86*, 261-270.
- McMahon, L.R., and Wellman, P.J. (1997). Decreased intake of a liquid diet in nonfood-deprived rats following intra-PVN injections of GLP-1 (7-36) amide. *Pharmacol Biochem Behav 58*, 673-677.
- McMillen, I.C., Adam, C.L., and Muhlhauser, B.S. (2005). Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *J Physiol 565*, 9-17.
- McMillen, I.C., and Robinson, J.S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev 85*, 571-633.
- Meister, B. (2007). Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiol Behav 92*, 263-271.

- Meister, B., Ceccatelli, S., Hokfelt, T., Anden, N.E., Anden, M., and Theodorsson, E. (1989). Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Exp Brain Res* 76, 343-368.
- Meister, B., Gomuc, B., Suarez, E., Ishii, Y., Durr, K., and Gillberg, L. (2006). Hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) neurons have a cholinergic phenotype. *Eur J Neurosci* 24, 2731-2740.
- Mellinkoff, S.M., Frankland, M., Boyle, D., and Greipel, M. (1997). Relationship between serum amino acid concentration and fluctuations in appetite. *Obes Res* 5, 381-384.
- Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., and Trayhurn, P. (1996). Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387, 113-116.
- Mercer, J.G., Moar, K.M., Hoggard, N., Strosberg, A.D., Froguel, P., and Bailleul, B. (2000). B219/OB-R 5'-UTR and leptin receptor gene-related protein gene expression in mouse brain and placenta: tissue-specific leptin receptor promoter activity. *J Neuroendocrinol* 12, 649-655.
- Merchenthaler, I., Lane, M., and Shughrue, P. (1999). Distribution of pre-pro-glucagon and glucagon-like peptide-1 receptor messenger RNAs in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 403, 261-280.
- Mieda, M., Williams, S.C., Richardson, J.A., Tanaka, K., and Yanagisawa, M. (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12150-12155.
- Miki, T., Liss, B., Minami, K., Shiuchi, T., Saraya, A., Kashima, Y., Horiuchi, M., Ashcroft, F., Minokoshi, Y., Roeper, J., *et al.* (2001). ATP-sensitive K⁺ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. *Nat Neurosci* 4, 507-512.
- Miller, R.G., Bryan, W.W., Dietz, M.A., Munsat, T.L., Petajan, J.H., Smith, S.A., and Goodpasture, J.C. (1996a). Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47, 1329-1331.
- Miller, R.G., Petajan, J.H., Bryan, W.W., Armon, C., Barohn, R.J., Goodpasture, J.C., Hoagland, R.J., Parry, G.J., Ross, M.A., and Stromatt, S.C. (1996b). A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol* 39, 256-260.
- Miotke, J.A., MacLennan, A.J., and Meyer, R.L. (2007). Immunohistochemical localization of CNTFRalpha in adult mouse retina and optic nerve following intraorbital nerve crush: evidence for the axonal loss of a trophic factor receptor after injury. *J Comp Neurol* 500, 384-400.
- Miralles, O., Sanchez, J., Palou, A., and Pico, C. (2006). A physiological role of breast milk leptin in body weight control in developing infants. *Obesity (Silver Spring)* 14, 1371-1377.
- Mistry, A.M., Swick, A., and Romsos, D.R. (1999). Leptin alters metabolic rates before acquisition of its anorectic effect in developing neonatal mice. *Am J Physiol* 277, R742-747.
- Mohr B. Hypertrophie der Hypophyse cerebri und dadurch bedingter Druck auf die Hoehengrundflaeche insbesondere auf die Schnerven, das Chiasma delseiben, und dem laengseitigen oehenschenkel. *Wschr Heilkd* 1840;6:565 – 74
- Monda, M., Sullo, A., De Luca, V., Pellicano, M.P., and Viggiano, A. (1997). L-threonine injection into PPC modifies food intake, lateral hypothalamic activity, and sympathetic discharge. *Am J Physiol* 273, R554-559.
- Mondal, M.S., Toshinai, K., Ueno, H., Koshinaka, K., and Nakazato, M. (2008). Characterization of obestatin in rat and human stomach and plasma, and its lack of acute effect on feeding behavior in rodents. *J Endocrinol* 198, 339-346.
- Mong, J.A., and McCarthy, M.M. (2002). Ontogeny of sexually dimorphic astrocytes in the neonatal rat arcuate. *Brain Res Dev Brain Res* 139, 151-158.
- Monville, C., Couplier, M., Conti, L., De-Fraja, C., Dreyfus, P., Fages, C., Riche, D., Tardy, M., Cattaneo, E., and Peschanski, M. (2001). Ciliary neurotrophic factor may activate mature astrocytes via binding with the leukemia inhibitory factor receptor. *Mol Cell Neurosci* 17, 373-384.
- Monville, C., Fages, C., Feyens, A.M., D'Hondt, V., Guillet, C., Vernallis, A., Gascan, H., and Peschanski, M. (2002). Astroglial expression of the P-glycoprotein is controlled by intracellular CNTF. *BMC Cell Biol* 3, 20.
- Moran, T.H. (2000). Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition* 16, 858-865.

- Moran, T.H. (2004). Gut peptides in the control of food intake: 30 years of ideas. *Physiol Behav* 82, 175-180.
- Moran, T.H., Ladenheim, E.E., and Schwartz, G.J. (2001). Within-meal gut feedback signaling. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 *Suppl* 5, S39-41.
- Moran, T.H., and Schwartz, G.J. (1994). Neurobiology of cholecystokinin. *Crit Rev Neurobiol* 9, 1-28.
- Morash, B., Li, A., Murphy, P.R., Wilkinson, M., and Ur, E. (1999). Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* 140, 5995-5998.
- Morita Y. Ontogenetic and differential expression of the preproenkephalin and preprodynorphin genes in the rat brain. In: Bjorklund A, Hokfelt T, Tohyama M, editors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy* vol. 10: Ontogeny of Transmitters and Peptides in the CNS. The Netherlands: Elsevier Science Publishers B.V.; 1992. p. 257-94.
- Morley, J.E. (1982). Minireview. The ascent of cholecystokinin (CCK) - from gut to brain. *Life Sci* 30, 479-493.
- 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, E1051-1057.
- Morton, G.J., Niswender, K.D., Rhodes, C.J., Myers, M.G., Jr., Blevins, J.E., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2003). Arcuate nucleus-specific leptin receptor gene therapy attenuates the obesity phenotype of Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats. *Endocrinology* 144, 2016-2024.
- Mountjoy, K.G. (2010). Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. *Biochem J* 428, 305-324.
- Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., and Dehouck, B. (2010). Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 518, 943-962.
- Munzberg, H., Flier, J.S., and Bjorbaek, C. (2004). Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* 145, 4880-4889.
- Munzberg, H., Huo, L., Nilni, E.A., Hollenberg, A.N., and Bjorbaek, C. (2003). Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. *Endocrinology* 144, 2121-2131.
- Murphy, G.M., Jr., Song, Y., Ong, E., Lee, Y.L., Schmidt, K.G., Bocchini, V., and Eng, L.F. (1995). Leukemia inhibitory factor mRNA is expressed in cortical astrocyte cultures but not in an immortalized microglial cell line. *Neurosci Lett* 184, 48-51.
- Murphy, K.G., and Bloom, S.R. (2006). Gut hormones and the regulation of energy homeostasis. *Nature* 444, 854-859.
- Myers, M.G., Cowley, M.A., and Munzberg, H. (2008). Mechanisms of leptin action and leptin resistance. *Annu Rev Physiol* 70, 537-556.
- Myers, M.G., Jr., and Simerly, R.B. (2010). The neuroendocrinology and neuroscience of energy balance. *Front Neuroendocrinol* 31, 1-3.

N

- Nagy, Z.M., Porada, K.J., and Anderson, J.A. (1977). Undernutrition by rearing in large litters delays the development of reflexive, locomotor, and memory processes in mice. *J Comp Physiol Psychol* 91, 682-696.
- Nakashima, K., Wiese, S., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., Sendtner, M., and Taga, T. (1999). Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J Neurosci* 19, 5429-5434.
- Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., and Goto, K. (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res* 827, 243-260.

- Nauck, M.A., Niedereichholz, U., Ettlér, R., Holst, J.J., Orskov, C., Ritzel, R., and Schmiegel, W.H. (1997). Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol* 273, E981-988.
- Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci* 26, 523-530.
- Neel, J.V. (1962). Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14, 353-362.
- Negro, A., Tolosano, E., Skaper, S.D., Martini, I., Callegaro, L., Silengo, L., Fiorini, F., and Altruda, F. (1991). Cloning and expression of human ciliary neurotrophic factor. *Eur J Biochem* 201, 289-294.
- Nicholson, S.E., De Souza, D., Fabri, L.J., Corbin, J., Willson, T.A., Zhang, J.G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A.D., *et al.* (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6493-6498.
- Niswender, K.D., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2004). Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 15, 362-369.
- Niswender, K.D., Morton, G.J., Stearns, W.H., Rhodes, C.J., Myers, M.G., Jr., and Schwartz, M.W. (2001). Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 413, 794-795.
- Niv-Spector, L., Gonen-Berger, D., Gourdou, I., Biener, E., Gussakovsky, E.E., Benomar, Y., Ramanujan, K.V., Taouis, M., Herman, B., Callebaut, I., *et al.* (2005). Identification of the hydrophobic strand in the A-B loop of leptin as major binding site III: implications for large-scale preparation of potent recombinant human and ovine leptin antagonists. *Biochem J* 391, 221-230.
- Nohr, E.A., Vaeth, M., Baker, J.L., Sorensen, T.I., Olsen, J., and Rasmussen, K.M. (2009). Pregnancy outcomes related to gestational weight gain in women defined by their body mass index, parity, height, and smoking status. *Am J Clin Nutr* 90, 1288-1294.
- Norsted, E., Gomuc, B., and Meister, B. (2008). Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J Chem Neuroanat* 36, 107-121.

O

- O'Dell, S.D., Syddall, H.E., Sayer, A.A., Cooper, C., Fall, C.H., Dennison, E.M., Phillips, D.I., Gaunt, T.R., Briggs, P.J., and Day, I.N. (2002). Null mutation in human ciliary neurotrophic factor gene confers higher body mass index in males. *Eur J Hum Genet* 10, 749-752.
- Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51, 271-275.
- Ogawa, T., Hirose, H., Yamamoto, Y., Nishikai, K., Miyashita, K., Nakamura, H., Saito, I., and Saruta, T. (2004). Relationships between serum soluble leptin receptor level and serum leptin and adiponectin levels, insulin resistance index, lipid profile, and leptin receptor gene polymorphisms in the Japanese population. *Metabolism* 53, 879-885.
- Ogawa, Y., Masuzaki, H., Isse, N., Okazaki, T., Mori, K., Shigemoto, M., Satoh, N., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y., *et al.* (1995). Molecular cloning of rat obese cDNA and augmented gene expression in genetically obese Zucker fatty (fa/fa) rats. *J Clin Invest* 96, 1647-1652.
- Ohta, R., Shigemura, N., Sasamoto, K., Koyano, K., and Ninomiya, Y. (2003). Conditioned taste aversion learning in leptin-receptor-deficient db/db mice. *Neurobiol Learn Mem* 80, 105-112.
- Ojeda, S.R., Lomniczi, A., Mastronardi, C., Heger, S., Roth, C., Parent, A.S., Matagne, V., and Mungenast, A.E. (2006). Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* 147, 1166-1174.
- Oldreive, C.E., Harvey, J., and Doherty, G.H. (2008). Neurotrophic effects of leptin on cerebellar Purkinje but not granule neurons in vitro. *Neurosci Lett* 438, 17-21.
- Oliet, S.H. (2002). Functional consequences of morphological neuroglial changes in the magnocellular nuclei of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 14, 241-246.

- Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278, 135-138.
- Olney, J.W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164, 719-721.
- Ong, Z.Y., and Muhlhausler, B.S. (2011). Maternal "junk-food" feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J* 25, 2167-2179.
- Oomura, Y., Hori, N., Shiraishi, T., Fukunaga, K., Takeda, H., Tsuji, M., Matsumiya, T., Ishibashi, M., Aou, S., Li, X.L., *et al.* (2006). Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides* 27, 2738-2749.
- Oomura, Y., Ono, T., Ooyama, H., and Wayner, M.J. (1969). Glucose and osmosensitive neurones of the rat hypothalamus. *Nature* 222, 282-284.
- Orte, C., Lawrenson, J.G., Finn, T.M., Reid, A.R., and Allt, G. (1999). A comparison of blood-brain barrier and blood-nerve barrier endothelial cell markers. *Anat Embryol (Berl)* 199, 509-517.
- Ovesjo, M.L., Gamstedt, M., Collin, M., and Meister, B. (2001). GABAergic nature of hypothalamic leptin target neurones in the ventromedial arcuate nucleus. *J Neuroendocrinol* 13, 505-516.
- Owczarek, C.M., Layton, M.J., Robb, L.G., Nicola, N.A., and Begley, C.G. (1996). Molecular basis of the soluble and membrane-bound forms of the murine leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain. Expression in normal, gestating, and leukemia inhibitory factor nullizygous mice. *J Biol Chem* 271, 5495-5504.
- Ozanne, S.E., and Hales, C.N. (2004). Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 427, 411-412.
- Ozanne, S.E., Lewis, R., Jennings, B.J., and Hales, C.N. (2004). Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. *Clin Sci (Lond)* 106, 141-145.
- Ozanne, S.E., and Nicholas Hales, C. (2005). Poor fetal growth followed by rapid postnatal catch-up growth leads to premature death. *Mech Ageing Dev* 126, 852-854.

P

- Painter, R.C., Roseboom, T.J., and Bleker, O.P. (2005). Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reprod Toxicol* 20, 345-352.
- Pan, W., Hsueh, H., He, Y., Sakharkar, A., Cain, C., Yu, C., and Kastin, A.J. (2008a). Astrocyte leptin receptor (ObR) and leptin transport in adult-onset obese mice. *Endocrinology* 149, 2798-2806.
- Pan, W., Hsueh, H., Tu, H., and Kastin, A.J. (2008b). Developmental changes of leptin receptors in cerebral microvessels: unexpected relation to leptin transport. *Endocrinology* 149, 877-885.
- Pan, W., Hsueh, H., Xu, C., Wu, X., Bouret, S.G., and Kastin, A.J. (2011). Astrocytes modulate distribution and neuronal signaling of leptin in the hypothalamus of obese A^{vy} mice. *J Mol Neurosci* 43, 478-484.
- Pardini, A.W., Nguyen, H.T., Figlewicz, D.P., Baskin, D.G., Williams, D.L., Kim, F., and Schwartz, M.W. (2006). Distribution of insulin receptor substrate-2 in brain areas involved in energy homeostasis. *Brain Res* 1112, 169-178.
- Pardridge, W.M. (2005). Molecular biology of the blood-brain barrier. *Mol Biotechnol* 30, 57-70.
- Pardridge, W.M., Golden, P.L., Kang, Y.S., and Bickel, U. (1997). Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. *J Neurochem* 68, 1278-1285.
- Park, C.K., Ju, W.K., Hofmann, H.D., Kirsch, M., Ki Kang, J., Chun, M.H., and Lee, M.Y. (2000). Differential regulation of ciliary neurotrophic factor and its receptor in the rat hippocampus following transient global ischemia. *Brain Res* 861, 345-353.

- Park, K., Luo, J.M., Hisheh, S., Harvey, A.R., and Cui, Q. (2004). Cellular mechanisms associated with spontaneous and ciliary neurotrophic factor-cAMP-induced survival and axonal regeneration of adult retinal ganglion cells. *J Neurosci* 24, 10806-10815.
- Parton, L.E., Ye, C.P., Coppari, R., Enriori, P.J., Choi, B., Zhang, C.Y., Xu, C., Vianna, C.R., Balthasar, N., Lee, C.E., *et al.* (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449, 228-232.
- Patel, M.S., and Srinivasan, M. (2002). Metabolic programming: causes and consequences. *J Biol Chem* 277, 1629-1632.
- Patel, M.S., Srinivasan, M., and Laychock, S.G. (2009). Metabolic programming: Role of nutrition in the immediate postnatal life. *J Inherit Metab Dis* 32, 218-228.
- Patel, M.S., Vadlamudi, S., and Johannings, G.L. (1994). Artificial rearing of rat pups: implications for nutrition research. *Annu Rev Nutr* 14, 21-40.
- Patterson, C.M., Bouret, S.G., Park, S., Irani, B.G., Dunn-Meynell, A.A., and Levin, B.E. (2010). Large litter rearing enhances leptin sensitivity and protects selectively bred diet-induced obese rats from becoming obese. *Endocrinology* 151, 4270-4279.
- Penicaud, L., Leloup, C., Lorsignol, A., Alquier, T., and Guillod, E. (2002). Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5, 539-543.
- Penn, R.D., Kroin, J.S., York, M.M., and Cedarbaum, J.M. (1997). Intrathecal ciliary neurotrophic factor delivery for treatment of amyotrophic lateral sclerosis (phase I trial). *Neurosurgery* 40, 94-99; discussion 99-100.
- Picardi, P.K., Calegari, V.C., Prada Pde, O., Moraes, J.C., Araujo, E., Marcondes, M.C., Ueno, M., Carnevalheira, J.B., Velloso, L.A., and Saad, M.J. (2008). Reduction of hypothalamic protein tyrosine phosphatase improves insulin and leptin resistance in diet-induced obese rats. *Endocrinology* 149, 3870-3880.
- Pinto, S., Roseberry, A.G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J.M., and Horvath, T.L. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304, 110-115.
- Pitard, V., Lorgeot, V., Taupin, J.L., Aubard, Y., Praloran, V., and Moreau, J.F. (1998). The presence in human serum of a circulating soluble leukemia inhibitory factor receptor (sgp190) and its evolution during pregnancy. *Eur Cytokine Netw* 9, 599-605.
- Plagemann, A. (2005). Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. *Physiol Behav* 86, 661-668.
- Plagemann, A. (2006). Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Horm Res* 65 Suppl 3, 83-89.
- Plagemann, A., Heidrich, I., Gotz, F., Rohde, W., and Dorner, G. (1992). Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol* 99, 154-158.
- Polak, J.M., Bloom, S.R., Rayford, P.L., Pearse, A.G., Buchan, A.M., and Thompson, J.C. (1975). Identification of cholecystokinin-secreting cells. *Lancet* 2, 1016-1018.
- Poon, I.K., and Jans, D.A. (2005). Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic* 6, 173-186.
- Porrini, M., Santangelo, A., Crovetti, R., Riso, P., Testolin, G., and Blundell, J.E. (1997). Weight, protein, fat, and timing of preloads affect food intake. *Physiol Behav* 62, 563-570.
- Porte, D., Jr., Seeley, R.J., Woods, S.C., Baskin, D.G., Figlewicz, D.P., and Schwartz, M.W. (1998). Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia* 41, 863-881.
- Primeaux, S.D., York, D.A., and Bray, G.A. (2006). Neuropeptide Y administration into the amygdala alters high fat food intake. *Peptides* 27, 1644-1651.
- Proulx, K., Richard, D., and Walker, C.D. (2002). Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology* 143, 4683-4692.
- Pu, S., Dhillon, H., Moldawer, L.L., Kalra, P.S., and Kalra, S.P. (2000). Neuropeptide Y counteracts the anorectic and weight reducing effects of ciliary neurotrophic factor. *J Neuroendocrinol* 12, 827-832.

Q

- Qian, C.J., Yao, J., and Si, J.M. (2011). Nuclear JAK2: Form and Function in Cancer. *Anat Rec (Hoboken)*.
- Qian, S., Chen, H., Weingarth, D., Trumbauer, M.E., Novi, D.E., Guan, X., Yu, H., Shen, Z., Feng, Y., Frazier, E., *et al.* (2002). Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol Cell Biol* 22, 5027-5035.
- Qiu, L., Bernd, P., and Fukada, K. (1994). Cholinergic neuronal differentiation factor (CDF)/leukemia inhibitory factor (LIF) binds to specific regions of the developing nervous system in vivo. *Dev Biol* 163, 516-520.

R

- Rahmouni, K., Sigmund, C.D., Haynes, W.G., and Mark, A.L. (2009). Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes* 58, 536-542.
- Ravelli, G.P., Stein, Z.A., and Susser, M.W. (1976). Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med* 295, 349-353.
- Re, R.N., and Cook, J.L. (2006). The intracrine hypothesis: an update. *Regul Pept* 133, 1-9.
- Reeve, J.R., Jr., Eysselein, V.E., Ho, F.J., Chew, P., Vigna, S.R., Liddle, R.A., and Evans, C. (1994). Natural and synthetic CCK-58. Novel reagents for studying cholecystokinin physiology. *Ann N Y Acad Sci* 713, 11-21.
- Reeve, J.R., Jr., Green, G.M., Chew, P., Eysselein, V.E., and Keire, D.A. (2003). CCK-58 is the only detectable endocrine form of cholecystokinin in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285, G255-265.
- Rende, M., Muir, D., Ruoslahti, E., Hagg, T., Varon, S., and Manthorpe, M. (1992). Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor in adult rat sciatic nerve. *Glia* 5, 25-32.
- Rethelyi, M. (1984). Diffusional barrier around the hypothalamic arcuate nucleus in the rat. *Brain Res* 307, 355-358.
- Reynolds, D.S., and Morton, A.J. (1998). Changes in blood-brain barrier permeability following neurotoxic lesions of rat brain can be visualised with trypan blue. *J Neurosci Methods* 79, 115-121.
- Rodriguez, E.M., Blazquez, J.L., and Guerra, M. (2010). The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* 31, 757-776.
- Rodriguez, E.M., Blazquez, J.L., Pastor, F.E., Pelaez, B., Pena, P., Peruzzo, B., and Amat, P. (2005). Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* 247, 89-164.
- Rodriguez, E.M., Gonzalez, C.B., and Delannoy, L. (1979). Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res* 201, 377-408.
- Rogers, P.J., and Blundell, J.E. (1994). Reanalysis of the effects of phenylalanine, alanine, and aspartame on food intake in human subjects. *Physiol Behav* 56, 247-250.
- Rousseau, F., Chevalier, S., Guillet, C., Ravon, E., Diveu, C., Froger, J., Barbier, F., Grimaud, L., and Gascan, H. (2008). Ciliary neurotrophic factor, cardiotrophin-like cytokine, and neuropoietin share a conserved binding site on the ciliary neurotrophic factor receptor alpha chain. *J Biol Chem* 283, 30341-30350.
- Routh, V.H. (2010). Glucose Sensing Neurons in the Ventromedial Hypothalamus. *Sensors (Basel)* 10, 9002-9025.
- Rubartelli, A., Cozzolino, F., Talio, M., and Sitia, R. (1990). A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *EMBO J* 9, 1503-1510.

Ryan, N.K., Woodhouse, C.M., Van der Hoek, K.H., Gilchrist, R.B., Armstrong, D.T., and Norman, R.J. (2002). Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation of oocyte maturation. *Biol Reprod* 66, 1548-1554.

S

Sahu, A., Kalra, P.S., and Kalra, S.P. (1988). Food deprivation and ingestion induce reciprocal changes in neuropeptide Y concentrations in the paraventricular nucleus. *Peptides* 9, 83-86.

Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millo, 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, 527-529.

Saper, C.B. (2000). Hypothalamic connections with the cerebral cortex. *Prog Brain Res* 126, 39-48.

Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J.A., and Yoshimura, A. (1999). Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* 4, 339-351.

Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Hayase, M., Tsuji, T., Imagawa, K., Yoshimasa, Y., Nishi, S., Hosoda, K., and Nakao, K. (1997a). The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci Lett* 224, 149-152.

Satoh, N., Ogawa, Y., Katsuura, G., Tsuji, T., Masuzaki, H., Hiraoka, J., Okazaki, T., Tamaki, M., Hayase, M., Yoshimasa, Y., *et al.* (1997b). Pathophysiological significance of the obese gene product, leptin, in ventromedial hypothalamus (VMH)-lesioned rats: evidence for loss of its satiety effect in VMH-lesioned rats. *Endocrinology* 138, 947-954.

Schick, R.R., Schusdziarra, V., Yaksh, T.L., and Go, V.L. (1994). Brain regions where cholecystokinin exerts its effect on satiety. *Ann N Y Acad Sci* 713, 242-254.

Schmidt, P.T., Naslund, E., Gryback, P., Jacobsson, H., Hartmann, B., Holst, J.J., and Hellstrom, P.M. (2003). Peripheral administration of GLP-2 to humans has no effect on gastric emptying or satiety. *Regul Pept* 116, 21-25.

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, 1882-1887.

Schuster, B., Kovaleva, M., Sun, Y., Regenhard, P., Matthews, V., Grotzinger, J., Rose-John, S., and Kallen, K.J. (2003). Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CNTF. *J Biol Chem* 278, 9528-9535.

Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Campfield, L.A., Burn, P., and Baskin, D.G. (1996). Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 98, 1101-1106.

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, 2119-2123.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Seeley, R.J., and Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671.

Scott, M.M., Lachey, J.L., Sternson, S.M., Lee, C.E., Elias, C.F., Friedman, J.M., and Elmquist, J.K. (2009). Leptin targets in the mouse brain. *J Comp Neurol* 514, 518-532.

Sendtner, M., Carroll, P., Holtmann, B., Hughes, R.A., and Thoenen, H. (1994). Ciliary neurotrophic factor. *Journal of Neurobiology* 25, 1436-1453.

Sendtner, M., Gotz, R., Holtmann, B., and Thoenen, H. (1997). Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci* 17, 6999-7006.

Sendtner, M., Kreutzberg, G.W., and Thoenen, H. (1990). Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature* 345, 440-441.

Shanley, L.J., Irving, A.J., and Harvey, J. (2001). Leptin enhances NMDA receptor function and modulates hippocampal synaptic plasticity. *J Neurosci* 21, RC186.

- Shimizu, H., Oh, I.S., Okada, S., and Mori, M. (2007). Leptin resistance and obesity. *Endocr J* 54, 17-26.
- Shin, H.I., Divieti, P., Sims, N.A., Kobayashi, T., Miao, D., Karaplis, A.C., Baron, R., Bringhurst, R., and Kronenberg, H.M. (2004). Gp130-mediated signaling is necessary for normal osteoblastic function in vivo and in vitro. *Endocrinology* 145, 1376-1385.
- Shintani, M., Ogawa, Y., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Miyanaga, F., Takaya, K., Hayashi, T., Inoue, G., Hosoda, K., Kojima, M., *et al.* (2001). Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50, 227-232.
- Signore, A.P., Zhang, F., Weng, Z., Gao, Y., and Chen, J. (2008). Leptin neuroprotection in the CNS: mechanisms and therapeutic potentials. *J Neurochem* 106, 1977-1990.
- Simerly, R.B. (2005). Wired on hormones: endocrine regulation of hypothalamic development. *Curr Opin Neurobiol* 15, 81-85.
- Simerly, R.B. (2008). Hypothalamic substrates of metabolic imprinting. *Physiol Behav* 94, 79-89.
- Sims, J.S., and Lorden, J.F. (1986). Effect of paraventricular nucleus lesions on body weight, food intake and insulin levels. *Behav Brain Res* 22, 265-281.
- Sims, N.A. (2009). gp130 signaling in bone cell biology: multiple roles revealed by analysis of genetically altered mice. *Mol Cell Endocrinol* 310, 30-39.
- Sitaraman, S., Liu, X., Charrier, L., Gu, L.H., Ziegler, T.R., Gewirtz, A., and Merlin, D. (2004). Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD. *FASEB J* 18, 696-698.
- Skipor, J., and Thiery, J.C. (2008). The choroid plexus--cerebrospinal fluid system: undervalued pathway of neuroendocrine signaling into the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68, 414-428.
- Sleeman, M.W., Anderson, K.D., Lambert, P.D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (2000). The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* 74, 265-272.
- Sleeman, M.W., Garcia, K., Liu, R., Murray, J.D., Malinova, L., Moncrieffe, M., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (2003). Ciliary neurotrophic factor improves diabetic parameters and hepatic steatosis and increases basal metabolic rate in db/db mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14297-14302.
- Smart, J.L., Tolle, V., and Low, M.J. (2006). Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *J Clin Invest* 116, 495-505.
- Smith-Kirwin, S.M., O'Connor, D.M., De Johnston, J., Lancey, E.D., Hassink, S.G., and Funanage, V.L. (1998). Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 1810-1813.
- Smith, G.P., and Epstein, A.N. (1969). Increased feeding in response to decreased glucose utilization in the rat and monkey. *Am J Physiol* 217, 1083-1087.
- Smith, J.T., and Waddell, B.J. (2003). Leptin distribution and metabolism in the pregnant rat: transplacental leptin passage increases in late gestation but is reduced by excess glucocorticoids. *Endocrinology* 144, 3024-3030.
- Smith, P.M., and Ferguson, A.V. (2008). Neurophysiology of hunger and satiety. *Dev Disabil Res Rev* 14, 96-104.
- Sobhani, I., Bado, A., Vissuzaine, C., Buyse, M., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Attoub, S., Lehy, T., Henin, D., Mignon, M., *et al.* (2000). Leptin secretion and leptin receptor in the human stomach. *Gut* 47, 178-183.
- Sodoyez-Goffaux, F.R., Sodoyez, J.C., and De Vos, C.J. (1979). Insulin secretion and metabolism during the perinatal period in the rat. Evidence for a placental role in fetal hyperinsulinemia. *J Clin Invest* 63, 1095-1102.
- Solomon, G., Niv-Spector, L., Gonen-Berger, D., Callebaut, I., Djiane, J., and Gertler, A. (2006). Preparation of leptin antagonists by site-directed mutagenesis of human, ovine, rat, and mouse leptin's site III: implications on blocking undesired leptin action in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 1091, 531-539.
- Somjen, G.G. (1988). Nervenkit: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia* 1, 2-9.
- Spanswick, D., Smith, M.A., Groppi, V.E., Logan, S.D., and Ashford, M.L. (1997). Leptin inhibits hypothalamic neurons by activation of ATP-sensitive potassium channels. *Nature* 390, 521-525.

- 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, 1349-1353.
- Stahl, N., and Yancopoulos, G.D. (1994). The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines. *J Neurobiol* 25, 1454-1466.
- Stanley, B.G., Chin, A.S., and Leibowitz, S.F. (1985). Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Res Bull* 14, 521-524.
- Stanley, B.G., and Leibowitz, S.F. (1985). Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 3940-3943.
- Stanner, S.A., Bulmer, K., Andres, C., Lantseva, O.E., Borodina, V., Poteen, V.V., and Yudkin, J.S. (1997). Does malnutrition in utero determine diabetes and coronary heart disease in adulthood? Results from the Leningrad siege study, a cross sectional study. *BMJ* 315, 1342-1348.
- Ste Marie, L., Luquet, S., Cole, T.B., and Palmiter, R.D. (2005). Modulation of neuropeptide Y expression in adult mice does not affect feeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18632-18637.
- Steculorum, S.M., and Bouret, S.G. (2011). Developmental effects of ghrelin. *Peptides*.
- Steinberg, G.R., Watt, M.J., Fam, B.C., Proietto, J., Andrikopoulos, S., Allen, A.M., Febbraio, M.A., and Kemp, B.E. (2006). Ciliary neurotrophic factor suppresses hypothalamic AMP-kinase signaling in leptin-resistant obese mice. *Endocrinology* 147, 3906-3914.
- 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., *et al.* (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 377, 530-532.
- Stocker, C.J., Arch, J.R., and Cawthorne, M.A. (2005). Fetal origins of insulin resistance and obesity. *Proc Nutr Soc* 64, 143-151.
- Stockli, K.A., Lillien, L.E., Naher-Noe, M., Breitfeld, G., Hughes, R.A., Raff, M.C., Thoenen, H., and Sendtner, M. (1991). Regional distribution, developmental changes, and cellular localization of CNTF-mRNA and protein in the rat brain. *J Cell Biol* 115, 447-459.
- Stockli, K.A., Lottspeich, F., Sendtner, M., Masiakowski, P., Carroll, P., Gotz, R., Lindholm, D., and Thoenen, H. (1989). Molecular cloning, expression and regional distribution of rat ciliary neurotrophic factor. *Nature* 342, 920-923.
- Stopa, B., Rybarska, J., Drozd, A., Konieczny, L., Krol, M., Lisowski, M., Piekarska, B., Roterman, I., Spolnik, P., and Zemanek, G. (2006). Albumin binds self-assembling dyes as specific polymolecular ligands. *Int J Biol Macromol* 40, 1-8.
- Strazielle, N., and Ghersi-Egea, J.F. (2000). Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 561-574.
- Sun, X., Tang, M., Zhang, J., and Chen, J.D. (2006). Excitatory effects of gastric electrical stimulation on gastric distension responsive neurons in ventromedial hypothalamus (VMH) in rats. *Neurosci Res* 55, 451-457.
- Sutton, G.M., Patterson, L.M., and Berthoud, H.R. (2004). Extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway in solitary nucleus mediates cholecystokinin-induced suppression of food intake in rats. *J Neurosci* 24, 10240-10247.
- Swanson, L.W., and Sawchenko, P.E. (1983). Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci* 6, 269-324.
- Szentirmai, E., Kapas, L., and Krueger, J.M. (2007). Ghrelin microinjection into forebrain sites induces wakefulness and feeding in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, R575-585.

T

- Takahashi, R., Yokoji, H., Misawa, H., Hayashi, M., Hu, J., and Deguchi, T. (1994). A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases. *Nat Genet* 7, 79-84.

- Takaya, K., Ogawa, Y., Isse, N., Okazaki, T., Satoh, N., Masuzaki, H., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K., and Nakao, K. (1996). Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs--identification of a missense mutation in Zucker fatty (*fa/fa*) rats. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 75-83.
- Tang-Christensen, M., Vrang, N., and Larsen, P.J. (2001). Glucagon-like peptide containing pathways in the regulation of feeding behaviour. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5, S42-47.
- Taouis, M., Chen, J.W., Daviaud, C., Dupont, J., Derouet, M., and Simon, J. (1998). Cloning the chicken leptin gene. *Gene* 208, 239-242.
- Tartaglia, L.A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G.J., Campfield, L.A., Clark, F.T., Deeds, J., *et al.* (1995). Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263-1271.
- Taylor, P.D., Khan, I.Y., Lakasing, L., Dekou, V., O'Brien-Coker, I., Mallet, A.I., Hanson, M.A., and Poston, L. (2003). Uterine artery function in pregnant rats fed a diet supplemented with animal lard. *Exp Physiol* 88, 389-398.
- Taylor, P.D., McConnell, J., Khan, I.Y., Holemans, K., Lawrence, K.M., Asare-Anane, H., Persaud, S.J., Jones, P.M., Petrie, L., Hanson, M.A., *et al.* (2005). Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288, R134-139.
- Taylor, P.D., and Poston, L. (2007). Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol* 92, 287-298.
- Theis, M., Sohl, G., Eiberger, J., and Willecke, K. (2005). Emerging complexities in identity and function of glial connexins. *Trends Neurosci* 28, 188-195.
- Theodosios, D.T. (2002). Oxytocin-secreting neurons: A physiological model of morphological neuronal and glial plasticity in the adult hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* 23, 101-135.
- Thoenen, H. (1991). The changing scene of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 14, 165-170.
- Thompson, D.A., and Campbell, R.G. (1977). Hunger in humans induced by 2-deoxy-D-glucose: glucoprivic control of taste preference and food intake. *Science* 198, 1065-1068.
- Thornton, J.E., Cheung, C.C., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (1997). Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in *ob/ob* mice. *Endocrinology* 138, 5063-5066.
- Toste, F.P., de Moura, E.G., Lisboa, P.C., Fagundes, A.T., de Oliveira, E., and Passos, M.C. (2006). Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr* 95, 830-837.
- Trujillo, M.L., Spuch, C., Carro, E., and Senaris, R. (2011). Hyperphagia and central mechanisms for leptin resistance during pregnancy. *Endocrinology* 152, 1355-1365.
- Truong, B.G., Magrum, L.J., and Gietzen, D.W. (2002). GABA(A) and GABA(B) receptors in the anterior piriform cortex modulate feeding in rats. *Brain Res* 924, 1-9.
- Tschop, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407, 908-913.
- Tu, H., Kastin, A.J., Hsueh, H., and Pan, W. (2008). Soluble receptor inhibits leptin transport. *J Cell Physiol* 214, 301-305.
- Turton, M.D., O'Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Heath, M.M., Lambert, P.D., *et al.* (1996). A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379, 69-72.

V

- Udagawa, J., Hashimoto, R., Suzuki, H., Hatta, T., Sotomaru, Y., Hioki, K., Kagohashi, Y., Nomura, T., Minami, Y., and Otani, H. (2006). The role of leptin in the development of the cerebral cortex in mouse embryos. *Endocrinology* 147, 647-658.

- Udagawa, J., Hatta, T., Hashimoto, R., and Otani, H. (2007). Roles of leptin in prenatal and perinatal brain development. *Congenit Anom (Kyoto)* 47, 77-83.
- Ueta, Y., Kannan, H., Higuchi, T., Negoro, H., and Yamashita, H. (1993). CCK-8 excites oxytocin-secreting neurons in the paraventricular nucleus in rats--possible involvement of noradrenergic pathway. *Brain Res Bull* 32, 453-459.
- 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, 279-286.
- Vacher, C.M., Crepin, D., Aubourg, A., Couvreur, O., Bailleux, V., Nicolas, V., Ferezou, J., Grippois, D., Gertler, A., and Taouis, M. (2008). A putative physiological role of hypothalamic CNTF in the control of energy homeostasis. *FEBS Lett* 582, 3832-3838.
- Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E., Jr., 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, 95-97.
- Valerio, A., Ghisi, V., Dossena, M., Tonello, C., Giordano, A., Frontini, A., Ferrario, M., Pizzi, M., Spano, P., Carruba, M.O., *et al.* (2006). Leptin increases axonal growth cone size in developing mouse cortical neurons by convergent signals inactivating glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem* 281, 12950-12958.
- van den Top, M., Lee, K., Whyment, A.D., Blanks, A.M., and Spanswick, D. (2004). Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci* 7, 493-494.
- van Dielen, F.M., van 't Veer, C., Buurman, W.A., and Greve, J.W. (2002). Leptin and soluble leptin receptor levels in obese and weight-losing individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1708-1716.
- van Houten, M., Posner, B.I., Kopriwa, B.M., and Brawer, J.R. (1980). Insulin binding sites localized to nerve terminals in rat median eminence and arcuate nucleus. *Science* 207, 1081-1083.
- Vergara, C., and Ramirez, B. (2004). CNTF, a pleiotropic cytokine: emphasis on its myotrophic role. *Brain Res Brain Res Rev* 47, 161-173.
- Vickers, M.H., Breier, B.H., Cutfield, W.S., Hofman, P.L., and Gluckman, P.D. (2000). Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279, E83-87.
- Vickers, M.H., Breier, B.H., McCarthy, D., and Gluckman, P.D. (2003). Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285, R271-273.
- Vickers, M.H., Krechowec, S.O., and Breier, B.H. (2007). Is later obesity programmed in utero? *Curr Drug Targets* 8, 923-934.

W

- Wang, C., 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, 3251-3255.
- Wang, J., Liu, R., Hawkins, M., Barzilai, N., and Rossetti, L. (1998). A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393, 684-688.
- Wang, Q.P., Guan, J.L., Pan, W., Kastin, A.J., and Shioda, S. (2008). A diffusion barrier between the area postrema and nucleus tractus solitarius. *Neurochem Res* 33, 2035-2043.
- Wang, R., and Brattain, M.G. (2006). AKT can be activated in the nucleus. *Cell Signal* 18, 1722-1731.
- Ware, C.B., Kariagina, A., Zonis, S., Alon, D., and Chesnokova, V. (2005). Leukemia inhibitory factor signaling is implicated in embryonic development of the HPA axis. *FEBS Lett* 579, 4465-4469.
- Wang Y, Li J, Li H, Tohyama M. Ontogeny of pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptides in the brain and pituitary. In: Bjorklund A, Hokfelt T, Tohyama M, editors. *Handbook of Chemical*

- Neuroanatomy vol. 10: Ontogeny of Transmitters and Peptides in the CNS. The Netherlands: Elsevier Science Publishers B.V.; 1992. p. 297–323.
- Watt, J.A., Lo, D., Cranston, H.J., and Paden, C.M. (2009). CNTF receptor alpha is expressed by magnocellular neurons and expression is upregulated in the rat supraoptic nucleus during axonal sprouting. *Exp Neurol* 215, 135-141.
- Weng, Z., Signore, A.P., Gao, Y., Wang, S., Zhang, F., Hastings, T., Yin, X.M., and Chen, J. (2007). Leptin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death via mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 282, 34479-34491.
- Werther, G.A., Hogg, A., Oldfield, B.J., McKinley, M.J., Figdor, R., Allen, A.M., and Mendelsohn, F.A. (1987). Localization and characterization of insulin receptors in rat brain and pituitary gland using in vitro autoradiography and computerized densitometry. *Endocrinology* 121, 1562-1570.
- Will, M.J., Franzblau, E.B., and Kelley, A.E. (2003). Nucleus accumbens mu-opioids regulate intake of a high-fat diet via activation of a distributed brain network. *J Neurosci* 23, 2882-2888.
- Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J.A., King, P.J., and Liu, X.H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74, 683-701.
- Winocur, G., Greenwood, C.E., Piroli, G.G., Grillo, C.A., Reznikov, L.R., Reagan, L.P., and McEwen, B.S. (2005). Memory impairment in obese Zucker rats: an investigation of cognitive function in an animal model of insulin resistance and obesity. *Behav Neurosci* 119, 1389-1395.
- Wirth, M.M., Olszewski, P.K., Yu, C., Levine, A.S., and Giraud, S.Q. (2001). Paraventricular hypothalamic alpha-melanocyte-stimulating hormone and MTII reduce feeding without causing aversive effects. *Peptides* 22, 129-134.
- Wren, A.M., Small, C.J., Abbott, C.R., Dhillo, W.S., Seal, L.J., Cohen, M.A., Batterham, R.L., Taheri, S., Stanley, S.A., Ghatei, M.A., *et al.* (2001). Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50, 2540-2547.
- 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, 2931-2939.
- Wynne, K., Stanley, S., and Bloom, S. (2004). The gut and regulation of body weight. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 2576-2582.

X

- Xu, A.W., Ste-Marie, L., Kaelin, C.B., and Barsh, G.S. (2007). Inactivation of signal transducer and activator of transcription 3 in proopiomelanocortin (Pomc) neurons causes decreased pomc expression, mild obesity, and defects in compensatory refeeding. *Endocrinology* 148, 72-80.
- Xu, B., Dube, M.G., Kalra, P.S., Farmerie, W.G., Kaibara, A., Moldawer, L.L., Martin, D., and Kalra, S.P. (1998). Anorectic effects of the cytokine, ciliary neurotropic factor, are mediated by hypothalamic neuropeptide Y: comparison with leptin. *Endocrinology* 139, 466-473.
- Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M., and Ide, C. (2005). Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol* 192, 251-264.

Y

- Yamakuni, H., Minami, M., and Satoh, M. (1996). Localization of mRNA for leukemia inhibitory factor receptor in the adult rat brain. *J Neuroimmunol* 70, 45-53.

- Yamashita, T., Murakami, T., Otani, S., Kuwajima, M., and Shima, K. (1998). Leptin receptor signal transduction: OBRa and OBRb of fa type. *Biochem Biophys Res Commun* 246, 752-759.
- Yang, C.W., Lim, S.W., Han, K.W., Ahn, H.J., Park, J.H., Kim, Y.H., Kirsh, M., Cha, J.H., Kim, Y.S., Kim, J., *et al.* (2001). Upregulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha in rat kidney with ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* 12, 749-757.
- Yang, G., Lim, C.Y., Li, C., Xiao, X., Radda, G.K., Cao, X., and Han, W. (2009). FoxO1 inhibits leptin regulation of pro-opiomelanocortin promoter activity by blocking STAT3 interaction with specificity protein 1. *J Biol Chem* 284, 3719-3727.
- Yang, M.J., Wang, F., Wang, J.H., Wu, W.N., Hu, Z.L., Cheng, J., Yu, D.F., Long, L.H., Fu, H., Xie, N., *et al.* (2010). PI3K integrates the effects of insulin and leptin on large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in neuropeptide Y neurons of the hypothalamic arcuate nucleus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E193-201.
- Yang, X.J., Kow, L.M., Funabashi, T., and Mobbs, C.V. (1999). Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 48, 1763-1772.
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., and Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5, 1066-1070.
- Yi, C.X., van der Vliet, J., Dai, J., Yin, G., Ru, L., and Buijs, R.M. (2006). Ventromedial arcuate nucleus communicates peripheral metabolic information to the suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 147, 283-294.
- Yokota, H., Yoshikawa, M., Hirabayashi, H., Nakase, H., Uranishi, R., Nishimura, F., Sugie, Y., Ishizaka, S., and Sakaki, T. (2005). Expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF), CNTF receptor alpha (CNTFR-alpha) following experimental intracerebral hemorrhage in rats. *Neurosci Lett* 377, 170-175.
- Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., *et al.* (1996). Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 407-411.

Z

- Zabeau, L., Defeau, D., Van der Heyden, J., Iserentant, H., Vandekerckhove, J., and Tavernier, J. (2004). Functional analysis of leptin receptor activation using a Janus kinase/signal transducer and activator of transcription complementation assay. *Mol Endocrinol* 18, 150-161.
- Zambrano, E., Bautista, C.J., Deas, M., Martinez-Samayoa, P.M., Gonzalez-Zamorano, M., Ledesma, H., Morales, J., Larrea, F., and Nathanielsz, P.W. (2006). A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* 571, 221-230.
- Zhang, F., Basinski, M.B., Beals, J.M., Briggs, S.L., Churgay, L.M., Clawson, D.K., DiMarchi, R.D., Furman, T.C., Hale, J.E., Hsiung, H.M., *et al.* (1997). Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387, 206-209.
- Zhang, J.V., Ren, P.G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C.W., Rauch, R., Klein, C., and Hsueh, A.J. (2005). Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 310, 996-999.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.
- Zhao, Z.Y., Fu, Y.R., Li, X.H., Li, Y.Y., Bogdan, A., and Touitou, Y. (2002). Age-related modifications of circadian rhythm of serum leptin in healthy men. *Gerontology* 48, 309-314.
- Ziotopoulou, M., Erani, D.M., Hileman, S.M., Bjorbaek, C., and Mantzoros, C.S. (2000). Unlike leptin, ciliary neurotrophic factor does not reverse the starvation-induced changes of serum

Références bibliographiques

- corticosterone and hypothalamic neuropeptide levels but induces expression of hypothalamic inhibitors of leptin signaling. *Diabetes* 49, 1890-1896.
- Zlokovic, B.V., Jovanovic, S., Miao, W., Samara, S., Verma, S., and Farrell, C.L. (2000). Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology* 141, 1434-1441.
- Zouein, F.A., Duhe, R.J., and Booz, G.W. (2011). JAKs go nuclear: Emerging role of nuclear JAK1 and JAK2 in gene expression and cell growth. *Growth Factors* 29, 245-252.
- Zvonic, S., Cornelius, P., Stewart, W.C., Mynatt, R.L., and Stephens, J.M. (2003). The regulation and activation of ciliary neurotrophic factor signaling proteins in adipocytes. *J Biol Chem* 278, 2228-2235.