



HAL
open science

Implication de la plasticité cérébrale hypothalamique dans la régulation de l'homéostasie énergétique chez la souris : effet d'un régime gras

Alexandra Cornu Gouazé

► To cite this version:

Alexandra Cornu Gouazé. Implication de la plasticité cérébrale hypothalamique dans la régulation de l'homéostasie énergétique chez la souris : effet d'un régime gras. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2012. Français. NNT : 2012DIJOS043 . tel-00841824

HAL Id: tel-00841824

<https://theses.hal.science/tel-00841824>

Submitted on 5 Jul 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.



ÉCOLE DOCTORALE
PRES | Bourgogne | Franche-Comté
Environnements - Santé

Université de Bourgogne

UFR Sciences de la Vie et de la Terre

Thèse

Dans le but d'obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Science de l'alimentation (Neurobiologie)

par

Alexandra Gouazé (Cornu)

le 29/10/2012

**Implication de la plasticité cérébrale hypothalamique
dans la régulation de l'homéostasie énergétique chez la souris :
effet d'un régime gras.**

Thèse dirigée par **Luc Pénicaud**

Co-dirigée par **Alexandre Benani**

Jury :

Isabelle Niot, Professeur – Présidente
Emmanuel Moyse, Professeur – Rapporteur
Claude Knauf, Maître de conférences – Rapporteur
Francisco Bolaños-Jiménez, CR1 - Examineur
Luc Pénicaud
Alexandre Benani

D'abord pour mon Papa et ensuite pour Thomas,

les deux hommes de ma vie...

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci pour votre disponibilité.

Je remercie ensuite Luc Pénicaud, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et ce malgré mon classement au M2R... J'espère avoir été à la hauteur de la tâche. Merci également à Alexandre Benani pour m'avoir guidé pendant ces années.

Merci à Corinne Leloup, pour son amitié et son écoute dans les coups durs, j'espère que tout se passera bien pour toi et que tu reviendras des States avec des millions de nouvelles idées. Merci aussi à Xavier F., malgré ton caractère de cochon, tu es là quand il faut, et je n'oublierai pas que c'est grâce à toi si j'ai pu faire ce congrès à Washington. Je sais que tu garderas cette bonne humeur et qu'avec Stéphanie vous ferez bientôt une petite sœur à Clément...

Un merci particulier à mes compagnons de route, ceux qui sont venus de Toulouse avec moi : Lionel, t'es le meilleur!! Merci pour tout et surtout pour être venu regarder Bear Grylls le dimanche avec moi à Marcilly sur Tille. Sans toi, je n'aurai jamais su que l'on peut être piqué par des abeilles, être perdu dans le désert et boire sa propre urine marinée dans une peau de serpent retournée (tout ça en même temps), et faire ça pour le plaisir. Je ne me fais pas de soucis pour toi, je sais que tu vas être un grand chercheur. Camille : que dire ! Tu es à la fois la plus agaçante et la plus gentille des collègues ! Toujours aux petits soins pour les autres et toujours à dire ce qui te passe par la tête ! Malgré toutes les vanes qu'on a pu te faire, ne change pas, et j'espère qu'avec David vous allez trouver votre voie, ici ou ailleurs, ça n'a pas d'importance. Merci aussi à Xavier B., merci pour les rigolades et pour avoir joué si souvent avec des souris fixées et décapitées... J'espère que tu termineras cette thèse sans encombre et que tout ira bien pour toi et Chloé. Si jamais tu arrêtes la recherche, reconvertis toi dans l'imitation, celle de Luc était épique !

Merci à Camille Rauche, une étudiante utile et compétente que j'ai encadré avec un grand plaisir! Tu m'as retiré une belle épine du pied en cette d'année où j'occupais le poste d'ATER. Merci ! Fais ce que tu veux de ta vie et ne laisse personne te dire que tu n'es pas capable de faire les choses !!

Merci aussi à Lucie et David-John, qui m'ont bien aidé, de toutes les manières possibles, en cette fin de thèse difficile. Profitez bien de votre nouveau chez vous !!!

Je n'oublie pas également tous mes collègues et amis thésards, ingés, techs, chercheurs et maîtres de conf de Toulouse: Alice, Tristan, Anne-Laure, Christophe, Anne, Cécile (au nom imprononçable), Géraldine, Dédé et Claude ; ou de Dijon : Anne Lefranc, Coralie, Syrina, Carole, Rachel, Aude-Reine, Amélie, Christophe, Sébastien, Michel, Aude...

Un merci particulier à Cédric et les Bac +8, groupe plus connu sous le nom de PurpleSnail... Cédric, Toum et Xavier, j'espère que vous allez retrouver une chanteuse, même si elle ne m'arrivera jamais à la cheville... Je suis triste de partir, je pense qu'on aurait pu être célèbre et acheter plein de drogue, mais ça sera sans moi...

Je remercie également toutes ces souris qui ont sacrifiées leurs vies pour faire vivre la science...

Un grand grand merci à mon papa, qui m'a tout appris, et à qui je dois ce caractère bien trempé. Je n'aurai pas survécu à une thèse sans ton éducation et sans ton soutien !! On dit souvent qu'on récolte ce qu'on a semé, et je pense que tu as fait une bien belle récolte avec cette jolie famille. Profites de la vie maintenant, c'est tout ce que tu mérites !!

Enfin, merci à toi mon piti mari... Merci pour m'avoir supporté, pour m'avoir consolé, pour m'avoir fait rire, pour m'aimer sans condition... La thèse c'est finit mais nous deux c'est pour la vie... Maintenant, on devient riches et beaux et on se tire à Las Vegas !!!!

Résumé

L'hypothalamus joue un rôle crucial dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Chez l'adulte, cette zone est plastique afin de s'adapter rapidement aux pressions environnementales. Ces remodelages hypothalamiques sont perturbés lors de pathologies métaboliques comme l'obésité. Nous nous sommes demandé si un régime gras provoquant des pathologies de surcharges à long terme, provoquait des modifications rapides du réseau hypothalamique chez l'individu adulte. Pour répondre à cette question, nous avons mis en place un modèle de souris présentant une réponse homéostatique rapide à un régime gras, et nous avons évalué deux types de plasticités hypothalamiques: la plasticité synaptique et la neurogenèse. Nos résultats montrent une stimulation des neurones anorexigènes dès les 3 premiers jours sous régime. Ce phénomène implique la polysialisation de la protéine d'adhésion NCAM. Nous avons également démontré que le remaniement de ces connexions synaptiques s'accompagne d'une augmentation de la prolifération cellulaire. Le blocage de cette prolifération avec l'anti-mitotique araC empêche la réponse homéostatique et accélère de manière drastique l'apparition de l'obésité. Ceci suggère que les nouvelles cellules produites sont essentielles pour le maintien de l'équilibre énergétique. Ces nouvelles cellules se différencient majoritairement en neurones quelque soit le régime, mais le régime gras va diriger la maturation des nouveaux neurones vers un phénotype anorexigène. Nos expériences montrent que suite à un déséquilibre énergétique, l'hypothalamus subit une succession de modifications plastiques conduisant à un rapide rétablissement de l'homéostasie énergétique.

Mots-clés :

Hypothalamus, Plasticité, Neurogenèse, Régime gras, Homéostasie énergétique

Abstract

The hypothalamus plays a crucial role in the control of energy balance. In adult brain, this area remain plastic and the cellular network can be rapidly modified under environmental pressures. Studies show than hypothalamic remodeling are disturbed when metabolic diseases such as obesity or type II diabetes are declared. In this study we hypothesized that a high fat diet (HFD) inducing obesity could rapidly causes cell modifications in the adult hypothalamus network. To answer this question, we have established a one week HFD mouse model, and evaluated to type of hypothalamic plasticity which are synaptic plasticity and neurogenesis. Our results show that HFD leads to an increase of the excitatory pre-synaptic tonus on the POMC neurons. This phenomenon implies polysialisation of the adhesion protein NCAM. We also demonstated than this rapid rewiring is reinforced by the increase of cell renewal, and more specifically by an increase of cell proliferation. Blockade of proliferation with the anti-mitotic araC prevent food intake regulation observed in control mice and accelerate the onset of obesity. These results suggest that neoformed cells are crucial for the maintenance of energy balance. In fact, new cells mainly differentiate into neurons, and the proportion of new POMC neurones of the arcuate nucleus (ARC) is twice the one of mice under standard diet (STD). HFD directs maturation of new neurons toward anorexigenic phenotype. Our experiments demonstrate than the hypothalamus rapidly remodels after an energy imbalance, and establish a succession of changes leading to a rapid reestablishment of energy homeostasis.

Keywords :

Hypothalamus, Plasticity, Neurogenesis, High fat diet, Energy homeostasis

Table des matières

Remerciements	4
Résumé	10
Abstract	14
Liste des figures	24
Abbréviations	27
Introduction	30
1- Homéostasie énergétique	32
2- Hypothalamus	34
3- Populations neuronales hypothalamiques impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique	38
<i>3-1 Le noyau arqué</i>	<i>38</i>
<i>3-2 Les autres noyaux hypothalamiques</i>	<i>46</i>
4- Plasticité hypothalamique et régulation de l'homéostasie énergétique	52
<i>4-1 Définition de la plasticité cérébrale</i>	<i>52</i>
<i>4-2 Plasticité hypothalamique</i>	<i>54</i>
4-2- α Le système magnocellulaire hypothalamo-hypophysaire	56
4-2- β Aires pré-optique et médiobasale	58
4-2- γ Hypothalamus ventro-médian	60
4-2- δ Rôle de PSA-NCAM dans la plasticité hypothalamique	60
<i>4-3 Plasticité hypothalamique et régulation de l'homéostasie énergétique</i>	<i>64</i>
5- Neurogenèse et régulation de l'homéostasie énergétique	70
<i>5-1 Définition</i>	<i>70</i>
<i>5-2 Neurogenèse dans différentes structures cérébrales</i>	<i>72</i>
5-2- α La zone sous-ventriculaire	72
5-2- β L'hippocampe	74
<i>5-3 Neurogenèse hypothalamique</i>	<i>76</i>
<i>5-4 Neurogenèse hypothalamique et homéostasie énergétique</i>	<i>80</i>
Problématique	88
Objectif	92
Stratégie	96
Chapitre 1: Mise en place du modèle expérimental	102
1- Méthodologie	104

1-1 Effets du régime HFD à long terme	104
1-2 Effets du régime à court terme	106
2- Résultats	108
2-1 Le régime HFD provoque des défauts métaboliques importants à long terme	108
2-2 Le régime HFD provoque des défauts métaboliques rapides et transitoires à court terme	108
3- Conclusions	110
Chapitre 2: Effet d'un régime gras sur la plasticité synaptique hypothalamique	114
1- Méthodologie	116
1-1 Marqueurs de plasticité	116
1-2 Expression de PSA-NCAM	116
1-3 Implication de l'effet de nouveauté	118
1-4 Remodelage synaptique des neurones POMC sous régime HFD	118
1-5 Implication de PSA-NCAM dans le remodelage synaptique hypothalamique	120
2- Résultats	122
2-1 Signature moléculaire de plasticité suite au régime HFD	122
2-2 Le régime gras provoque une rapide surexpression de PSA-NCAM dans l'ARC	122
2-3 La nouveauté n'est pas suffisante pour induire PSA dans l'ARC	124
2-4 Trois jours de régime HFD provoque un recablage des neurones POMC de l'ARC	126
2-5 PSA est requis pour le remodelage synaptique et la réponse homéostatique au régime HFD	128
3- Conclusions	130
Article 1 – Accepté dans Journal of Neuroscience	134
Chapitre 3: Effet précoce d'un régime gras sur la neurogenèse hypothalamique adulte	144
1- Méthodologie	146
1-1 Quantification du renouvellement cellulaire	146

<i>1-2 Quantification de la prolifération cellulaire</i>	148
<i>1-3 Origine des cellules néoformées</i>	148
<i>1-4 Sélection, différenciation et maturation des cellules néoformées</i>	150
<i>1-5 Rôle des cellules néoformées</i>	150
2- Résultats	152
<i>2-1 Environ 2000 cellules se renouvellent en condition basale dans l'hypothalamus adulte</i>	152
<i>2-2 Le renouvellement cellulaire hypothalamique est rapidement modifié par le régime gras</i>	154
<i>2-3 Le régime gras stimule rapidement et transitoirement la prolifération cellulaire dans tout l'hypothalamus</i>	154
<i>2-4 Le régime gras favorise la prolifération des précurseurs neuraux et des cellules astrogliales</i>	156
<i>2-5 Le régime gras provoque une sélection rapide des nouvelles cellules mais n'a pas d'impact sur leur survie à long terme</i>	158
<i>2-6 Le régime HFD n'a pas d'effet sur la différenciation des nouvelles cellules</i>	158
<i>2-7 Le régime HFD va promouvoir la maturation des neurones anorexigènes</i>	160
<i>2-8 Les cellules néoformées permettent le maintien de l'homéostasie énergétique</i>	160
3- Conclusions	162
Article 2 – Soumis dans Journal of Neuroscience	166
Conclusion générale et Perspectives	200
Conclusions générales	202
Perspectives	198
Annexes	220
Protocoles	222
Bibliographie	242

Liste des figures

Figure 1: Balance énergétique et régulation de l'homéostasie énergétique	31
Figure 2: Schéma d'un cerveau de rongeur montrant les principales régions hypothalamiques impliquées dans la régulation nerveuse du métabolisme énergétique.....	33
Figure 3: Représentation schématisée en trois dimensions des différents noyaux hypothalamiques.....	35
Tableau 1: Principaux neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique.....	37
Figure 4: Représentation schématisée de la détection et de l'intégration des paramètres métaboliques et endocriniens périphériques par les neurones de l'Arc.	39
Figure 5: Contrôle de l'homéostasie énergétique par les neurones de l'ARC hypothalamique.	41
Figure 7: Circuits neuronaux activés lors de la détection hypothalamique de nutriments.....	47
Figure 8: Illustration du phénomène de LTP (selon Hebb)	53
Figure 9: Illustration du retrait d'une projection astrocytaire permettant l'activation de la synapse.	55
Figure 10: Enroulement des projections gliales autour du soma des neurones à GnRH en période d'anoestrus et d'oestrus.	57
Figure 11: Molécule d'adhésion NCAM et mécanisme d'action de PSA.	59
Figure 12: Modifications des afférences synaptiques chez les souris ob/ob et effet de la leptine.	63
Figure 13: Projections de l'ARC vers le PVN chez des souris wt et chez les souris ob/ob à P10, P16 et P60.	65
Figure 14: Organisation des afférences synaptiques chez les rats DR et les rats DIO.	67
Figure 15: Illustration des étapes successives du phénomène de neurogenèse	69
Figure 16: Première mise en évidence de la neurogenèse dans le cerveau.	69
Figure 17: Localisation anatomique des deux niches neurogéniques les plus étudiées dans le cerveau: la SVZ et la SGZ.....	71
Figure 18: Flux rostral migratoire avec les cellules BrdU+ en rouge et PSA- NCAM en vert.	73
Figure 20: Effet de l'exposition à un mâle dans l'hypothalamus des femelles campagnol.	77
Figure 22: Expression de marqueurs neuronaux précoces ou tardifs dans les cellules néoformées, dans l'hypothalamus adulte.	81
Figure 23: Effet d'un régime gras donné à une mère gestante sur la neurogenèse hypothalamique de la progéniture.....	83
Figure 24: Effet d'un régime gras à long terme sur la neurogenèse dans l'ARC.	85
Figure 25: Objectif.....	93
Figure 26: Composition de la nourriture STD et de la nourriture HFD utilisé pour les expérimentations.	103
Figure 27: Effet du régime gras à long terme.....	105
Figure 28: Effets du régime gras à court terme.....	107
Figure 29: Types de régimes utilisés pour cette étude.	117
Figure 30: Protocole d'infusion de l'enzyme endoN.	119
Figure 31: Le régime HFD provoque des changements d'expression de marqueurs de plasticité.	121
Figure 32: Expression de PSA-NCAM.....	123
Figure 33: Effet de la nouveauté sur l'expression de PSA.	123
Figure 34: Effet du régime gras sur les connexions synaptiques des neurones POMC de l'ARC.	125
Figure 35: Effets de l'endoN sur la régulation de l'homéostasie énergétique.	127
Figure 36: Effet du régime HFD sur la prise alimentaire des souris PST-1 ^{-/-}	127
Figure 37: Effet rapide du régime HFD sur la plasticité synaptique hypothalamique chez la souris adulte.....	131
Figure 38: Protocole d'injection du BrdU et immunohistochimie anti-BrdU.....	145
Figure 39: Image représentative d'une immunohistochimie contre Ki67.	147

<i>Figure 40: Détermination de l'origine des cellules néoformées.</i>	147
<i>Figure 41: Protocole d'injection BrdU pour évaluation de la survie et différenciation des cellules néoformées.</i>	149
<i>Figure 42: Protocole d'injection BrdU dans le but de connaître le rôle des cellules néoformées.</i>	149
<i>Figure 43: Renouvellement cellulaire basal dans l'hypothalamus adulte.</i>	151
<i>Figure 44: Effets du régime gras sur le renouvellement cellulaire hypothalamique adulte.</i>	151
<i>Figure 45: Effet du régime HFD sur la prolifération cellulaire hypothalamique.</i>	153
<i>Figure 46: Origines des cellules néoformées.</i>	155
<i>Figure 47: Survie des cellules néoformées.</i>	157
<i>Figure 48: Différenciation neuronale des cellules néoformées.</i>	157
<i>Figure 49: Maturation d'une partie des nouveaux neurones dans le noyau arqué.</i>	159
<i>Figure 50: Rôle des cellules néoformées dans le maintien de l'homéostasie énergétique.</i>	159
<i>Figure 51: Effets d'un régime HFD sur les différentes étapes de la neurogenèse hypothalamique adulte.</i>	161
<i>Figure 52: Bilan de l'étude</i>	201

Abréviations

AgRP = Agouti related peptide	LH = Hypothalamus latéral
ARC = Noyau arqué	NCAM = Neural cell adhesion molecule
BDNF = Brain derived neurotrophic factor	NPY = Neuropeptide Y
BO = Bulbes olfactifs	NTS = Noyau du tractus solitaire
CART = Cocaïne and amphétamine regulated peptide	PFLH = Hypothalamus latéral périfornical
CDNF = Cerebral dopamine neurotrophic factor	POMC = Pro-opiomélanocortine
CNTF = Ciliary neurotrophic factor	PSA = Polysialic acid
CVD = Complexe vagal dorsal	p-STAT3 = Phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3
DCX = Doublecortine	PVN = Noyau paraventriculaire
DG = Gyrus denté	RMS = Flux rostral migratoire
DIO = Diet induced obesity	SGZ = Zone sous ventriculaire
DMN = Noyau dorsomédian	SNA = Système nerveux autonome
DR = Diet resistant	SNC = Système nerveux central
GDNF = Glia cell line-derived neurotrophic factor	SON = Noyau supraoptique
GFAP = Glial fibrillary acidic protein	SVZ = Zone sous ventriculaire
GnRH = Gonadotrophin-releasing hormone	TC = Tronc cérébral
GFR α 1 = GDNF family receptor alpha 1	UCP-1 = Uncoupling protein 1
HCRT/ORX = Neurones à hypocréatine/oréxine	VMN = Noyau ventromédian
HO-1 = Hemeoxygenase-1	WT = Wild type
HT = Hypothalamus	
ICV= Intracérébroventriculaire	
Ip = Intrapéritonéal	
KO = Knock-out	

Introduction

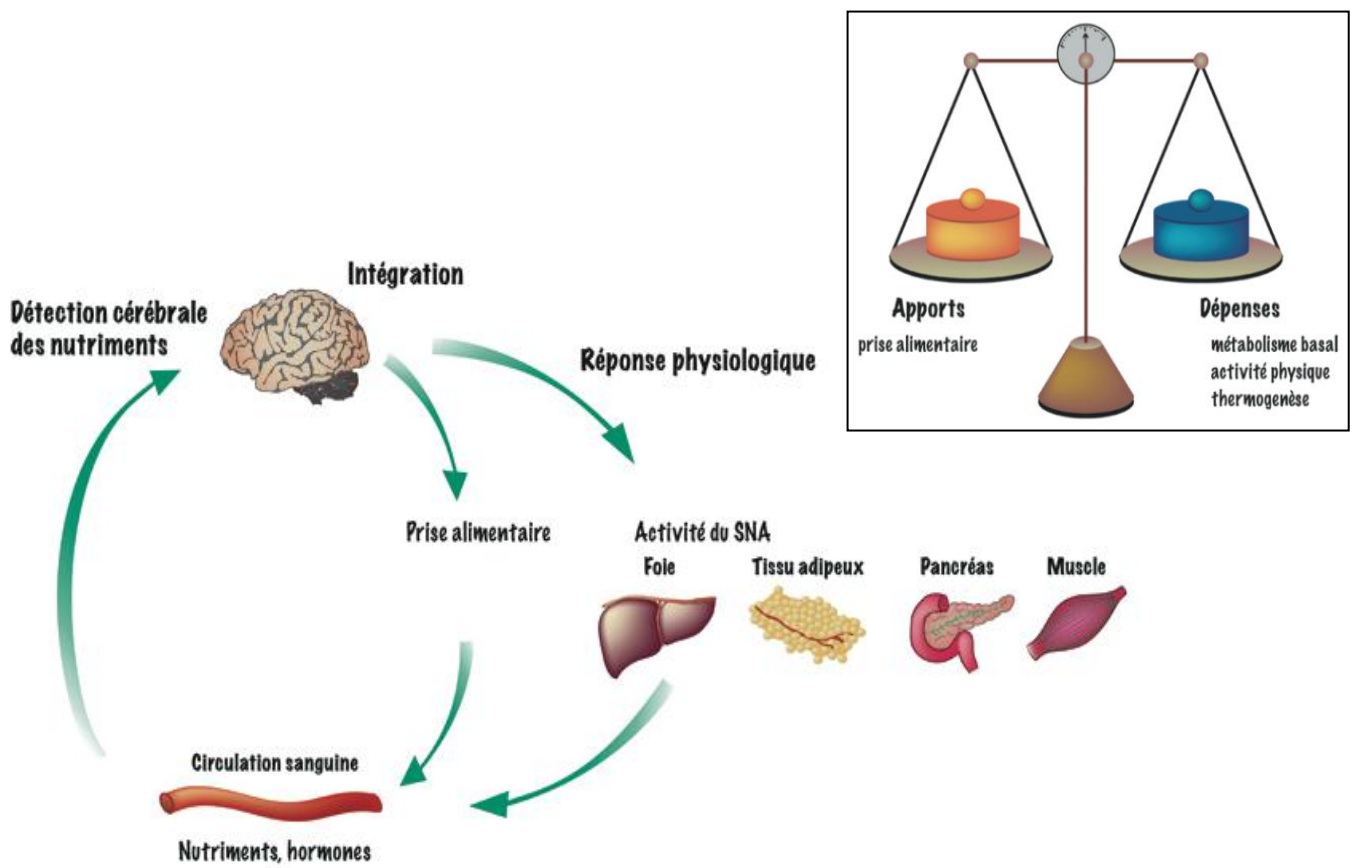


Figure 1: Balance énergétique et régulation de l'homéostasie énergétique

1- Homéostasie énergétique

Malgré la variabilité des apports alimentaires et des dépenses énergétiques au cours d'une journée, ou même au cours de la vie d'un individu, l'organisme maintient un statut énergétique stable qui se traduit par une remarquable stabilité du poids corporel chez l'individu adulte. On parle d'homéostasie énergétique. Cet équilibre dynamique inclut le maintien autour d'une valeur physiologique de référence de paramètres biologiques tels que la glycémie (maintenue strictement autour de 1g/L de sang), et à un degré moindre la lipidémie (6g/L de sang en moyenne). En cas d'éloignement au-dessous ou en-dessus de cette valeur, un système de régulation est activé afin de restaurer l'équilibre. En situation de déficit énergétique (période pré-prandiale, jeûne), la prise alimentaire est stimulée et les réserves de substrats énergétiques sont mobilisées pour favoriser les futurs apports d'énergie, alors que les dépenses énergétiques (thermogenèse, utilisation ou stockage du glucose et des acides gras) elles, sont freinées. La situation inverse (excès d'énergie qui peut correspondre à une période post-prandiale par exemple) déclenche un contrôle négatif limitant les apports et favorise les dépenses d'énergie.

Le maintien de l'homéostasie énergétique repose en grande partie sur la capacité du système nerveux central (SNC) à évaluer le statut énergétique de l'organisme *via* la perception de nombreux signaux métaboliques (**Figure 1**). Le système nerveux central (SNC) est donc informé en permanence des moindres modifications de ce statut grâce à des afférences nerveuses provenant de différents organes ou tissus mais également par des signaux circulants, hormonaux ou métaboliques. Une fois ces informations intégrées, le SNC déclenche alors des réponses centrales et périphériques adaptées à la fois comportementale (adaptation de la prise alimentaire), endocrine (sécrétion ou inhibition d'hormones comme la leptine et l'insuline) et végétative (modification de l'activité de certains organes par l'intermédiaire du système nerveux autonome, SNA).

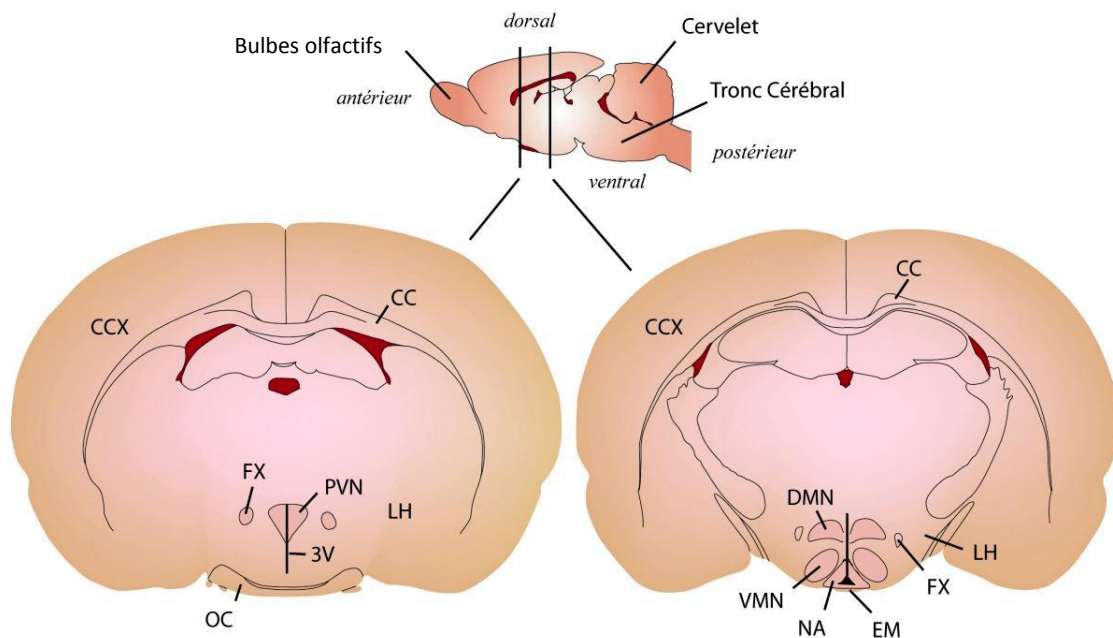


Figure 2: Schéma d'un cerveau de rongeur montrant les principales régions hypothalamiques impliquées dans la régulation nerveuse du métabolisme énergétique

L'insert du haut représente une coupe longitudinale du cerveau. Les deux traits verticaux localisent le niveau des deux coupes frontales représentées en dessous. Abréviations : CC (corps calleux), CCX (cortex cérébral), FX (fornix), PVN (noyau paraventriculaire), DMN (noyau dorsomédian), LH (hypothalamus latéral), VMN (noyau ventromédian), 3V (3ème ventricule), NA (noyau arqué), EM (éminence médiane), OC (chiasma optique).

2- Hypothalamus

Parmi les structures cérébrales impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique on trouve l'hypothalamus (HT) (**Figure 2**). C'est une structure diencephalique constituée d'une quarantaine de noyaux (correspondant à des regroupements spécifiques de populations neuronales) parmi lesquels les noyaux arqué (ARC), ventromédian (VMN), dorsomédian (DMN), paraventriculaire (PVN) et l'hypothalamus latéral (LH), qui jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie énergétique (**Figure 3**). D'une manière très générale, la région périventriculaire de l'HT (comprenant l'ARC par exemple) est impliquée dans la détection de signaux circulants (dans le sang et le liquide céphalorachidien) et l'organisation des réponses endocriniennes (via les projections sur l'éminence médiane et l'hypophyse). La région médiane, composée de gros noyaux tels que le DMN et le VMN, reçoit de nombreuses afférences sensorielles et est impliquée dans les comportements adaptatifs. Enfin, la région latérale, qui ne comprend pas de noyaux clairement identifiés et qui est traversée par le faisceau médian du télencéphale et le fornix, est considérée comme étant l'interface entre, d'une part, l'HT et les zones corticolimbiques, et d'autre part, l'HT et les systèmes moteurs autonome et somatique. Le PVN, quant à lui, est impliqué dans le contrôle des sécrétions hypophysaires (neurones magnocellulaires), du SNA et de nombreux comportements (Berthoud, 2002).

La connaissance de l'implication de l'HT dans la régulation de l'homéostasie énergétique remonte au début du 20^{ème} siècle avec, d'une part la description du « syndrome de Fröhlich » (obésité sévère associée à des désordres localisés au niveau de l'hypothalamus ventral), et d'autre part les expériences de lésion ou de stimulation. En effet, la lésion de l'hypothalamus ventromédian (ARC + VMN) aboutit systématiquement

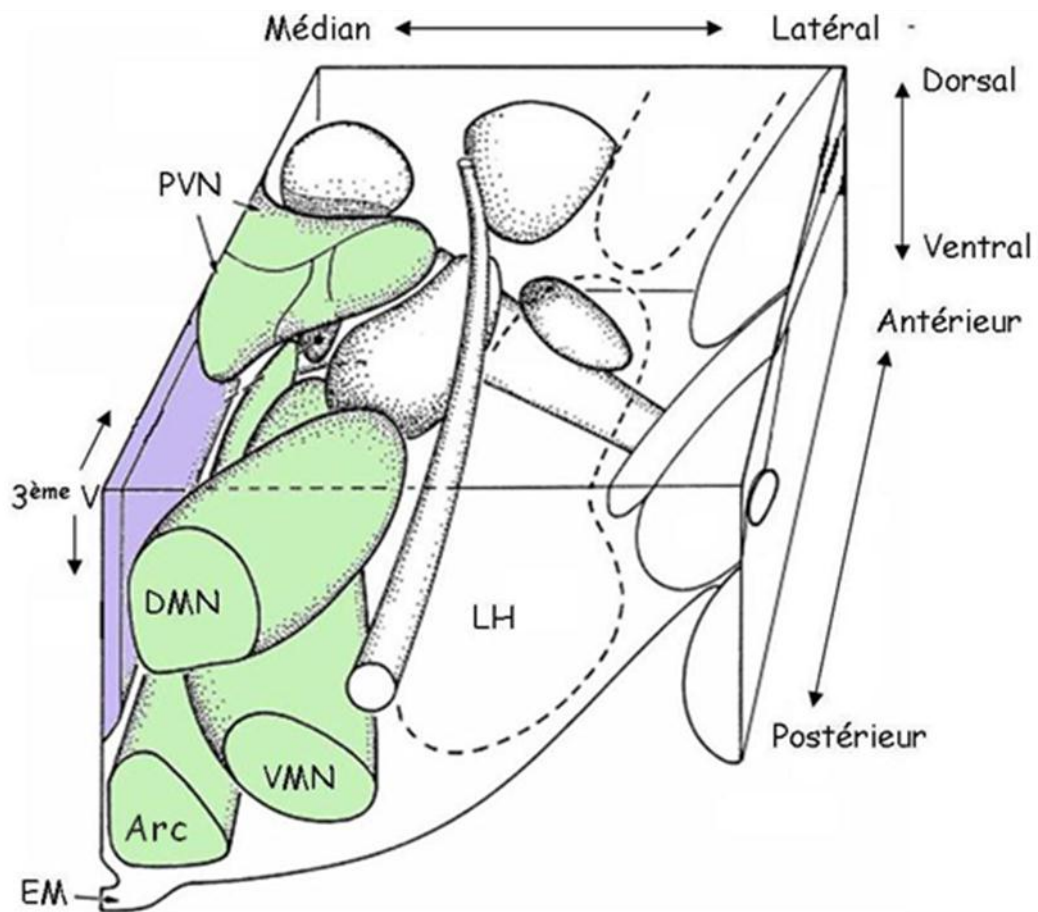


Figure 3: Représentation schématique en trois dimensions des différents noyaux hypothalamiques

ARC = Noyau arqué; DMN = Noyau dorsomédian; EM = Eminence médiane; LH = Hypothalamus latéral; PVN = Noyau paraventriculaire; VMN = Noyau ventromédian; 3^{ème} V = 3^{ème} ventricule.

D'après Berthoud, 2002.

à une obésité résultant d'une augmentation de la prise alimentaire (Hetherington and Ranson, 1940; Brobeck et al., 1943) alors que sa stimulation entraîne une hypophagie (Anand and Dua, 1955). Cela conduira la communauté scientifique, à qualifier cette région de « centre cérébral de la satiété » (Kennedy, 1950). Parallèlement à cela, d'autres travaux montreront que la lésion du LH entraîne l'arrêt de la prise alimentaire spontanée associée à un amaigrissement rapide des animaux et que sa stimulation, au contraire, induit une hyperphagie associée à une augmentation du poids corporel (Anand and Brobeck, 1951). Ces travaux ont abouti à la définition du LH comme « centre cérébral de la faim ». L'ensemble de ces données, ont depuis été largement renforcées et complétées par diverses approches (stimulation électrique précise d'un noyau, lésion sélective d'un noyau ou d'une population neuronale, enregistrements de l'activité électrique de noyaux *in vivo*, identification de populations neuronales spécifiques, ...).

L'hypothalamus est ainsi le lieu d'intégration de signaux circulants de nature métabolique (glucose, acide gras,...) ou hormonale (leptine, insuline, ghreline,...) et de signaux nerveux en provenance de la périphérie (informations viscérales relayées notamment par le CVD) ou émanant d'autres régions cérébrales (informations olfactives, limbiques...) (Berthoud, 2002). Une fois cette intégration réalisée, l'hypothalamus agit sur les tissus périphériques *via* des efférences nerveuses modulant l'activité du SNA grâce à des projections sur le tronc cérébral (TC) et la moelle épinière (Luiten et al., 1987). Ces connexions (hypothalamus vers tronc cérébral) sont de nature peptidique, alors que les projections du tronc cérébral vers l'hypothalamus sont catécholaminergiques (majoritairement) et/ou peptidiques (Palkovits, 1999).

	Orexigènes	Anorexigènes
Neuropeptides synthétisés dans l'Arc	NPY/AgRP	α -MSH/Cart
Neuropeptides synthétisés essentiellement dans le PVN et le LH	Orexines MCH Ghréline	TSH CRH Ocytocine

Tableau 1: Principaux neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique

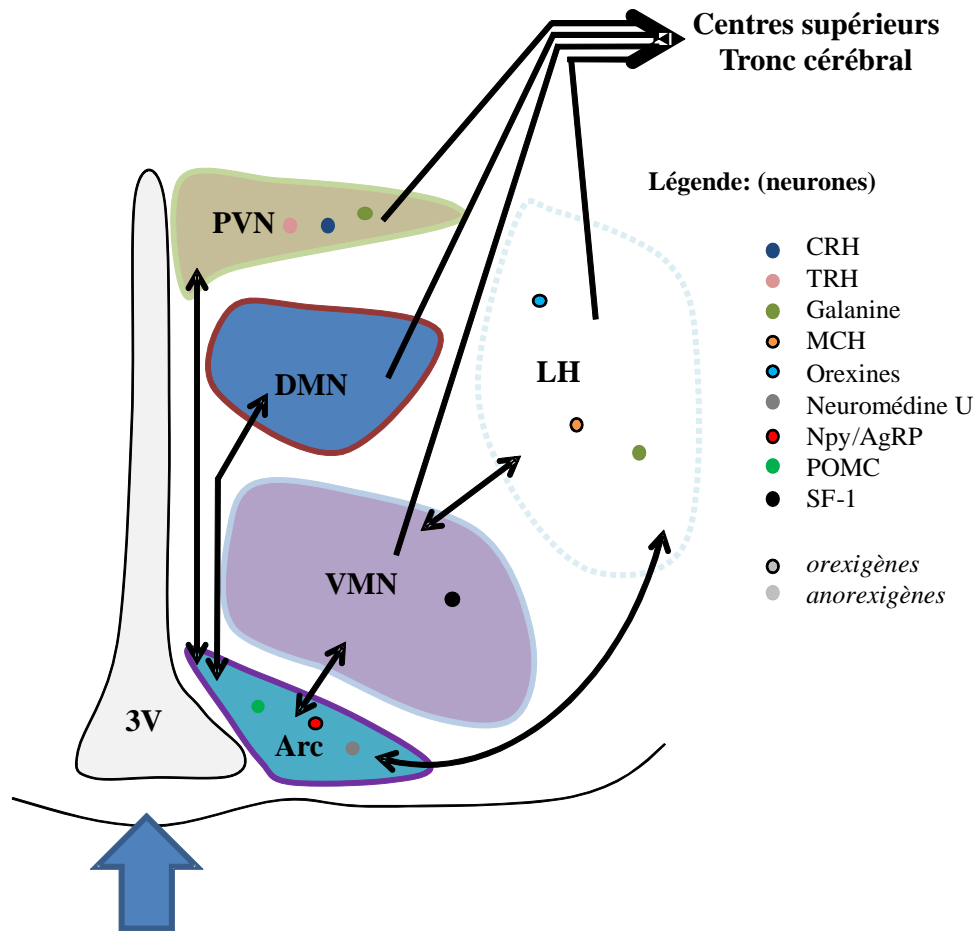
NPY (Neuropeptide Y), AgRP (Agouti Related peptide), α -MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormone), CART (Cocaine & Amphetamine-Related Transcript), MCH (Melanin-Concentrating Hormone), TSH (Thyroid Stimulating Hormone), CRH (Corticotropin-Releasing Hormone).

3- Populations neuronales hypothalamiques impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique

Plusieurs populations neuronales sont localisées au niveau de l'hypothalamus. Ces neurones sont classés en fonction de leur sensibilité aux hormones et de leur fonction. Ainsi, on distingue des neurones de premier ou de second ordre selon qu'ils détectent directement ou secondairement les signaux humoraux directement ou par l'intermédiaire des premiers. Dans chacune des deux catégories on distingue les neurones orexigènes ou anorexigènes. Les neurones de premier ordre sont localisés dans l'ARC, et les neurones de second ordre sont principalement localisés dans le PVN et le LH et reçoivent des projections des neurones NPY et POMC (**Tableau 1**). On trouve aussi des neurones de second ordre dans le DMN et le VMN mais leur identité en termes de neuropeptides reste mal connue. Cette classification n'est pas absolue car les neurones à POMC de l'ARC sont également sous l'influence de neurones présynaptiques gabaergiques sensibles à la leptine (Vong et al., 2011).

3-1 Le noyau arqué

Au même titre que la lésion globale de l'hypothalamus ventral, la destruction spécifique de l'ARC conduit au développement d'une obésité associée à une hyperphagie (Meister et al., 1989; Bergen et al., 1998). Ces travaux, associés à d'autres, ont permis d'attribuer à ce noyau un rôle fondamental dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Ce rôle est lié d'une part à sa localisation, et d'autre part à son organisation. L'ARC est localisé à proximité du troisième ventricule et de l'éminence médiane au niveau de



Paramètres métaboliques et endocriniens

Figure 4: Représentation schématique de la détection et de l'intégration des paramètres métaboliques et endocriniens périphériques par les neurones de l'Arc.

Les informations sont alors relayées aux neurones présents dans les autres noyaux hypothalamiques avant d'être acheminées vers des centres supérieurs et le tronc cérébral. Arc= noyau arqué, VMN = noyau ventromédian, LH = hypothalamus latéral, DMN = noyau dorsomédian, PVN = noyau paraventriculaire, 3V = 3^{ème} ventricule, CRH = corticotropin releasing hormone, TRH = thyrotropin releasing hormone, MCH = melanin concentrating hormone, POMC = proopiomelacortin, NPY = neuropeptide Y, AgRp = agouti related peptide, SF-1 = stéroïdnergic factor 1.

laquelle il n'y a pas de véritable barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, dans les organes circumventriculaires, les capillaires sanguins sont fenêtrés (percées de mini-pores) ce qui permet le passage de molécules de petites et moyennes tailles (Ganong, 2000). L'entrée de facteurs circulants, métaboliques ou hormonaux, dans le parenchyme nerveux, y est donc facilitée. L'ARC serait le premier noyau hypothalamique à détecter les signaux humoraux périphériques (Cone et al., 2001; Berthoud, 2002). Une autre particularité de l'ARC réside dans la complexité de ses projections. En effet, l'ARC projette vers beaucoup d'autres noyaux hypothalamiques (Cowley et al., 2001; Roseberry et al., 2004) (**Figure 4**). Enfin, celui-ci reçoit de nombreuses afférences en provenance des autres noyaux hypothalamiques (PVN, VMN et LH), de zones corticolimbiques et du TC (Li et al., 1999; Palkovits, 1999; DeFalco et al., 2001). L'ARC a donc une position stratégique, d'autant plus qu'il renferme deux populations neuronales dotées des équipements nécessaires à la détection des facteurs circulants métaboliques et hormonaux et projetant sur les autres noyaux hypothalamiques d'intérêts. Ces deux populations aux rôles antagonistes sont, d'une part les neurones à neuropeptide Y (NPY) et à agouti-related peptide (AgRP), d'autre part les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) (Grill and Kaplan, 2002; Hillebrand et al., 2002; Williams et al., 2004).

Les effets du NPY ont fait l'objet d'un très grand nombre d'études depuis maintenant plus d'une trentaine d'années. Ces études ont montré que l'injection intracérébroventriculaire (icv) ou intrahypothalamique de NPY stimulait la prise alimentaire (Stanley et al., 1986) et diminuait les dépenses énergétiques (Billington et al., 1991), et que l'administration continue ou répétée de NPY conduit au développement d'une obésité (Zarjevski et al., 1993). Par ailleurs l'expression du gène et la sécrétion de ce peptide sont stimulées dans des conditions de déficit énergétique comme le jeûne ou l'hypoglycémie (Schwartz et al., 1996; Dryden et al., 1998). Néanmoins, la délétion du gène n'entraîne pas de diminution de la prise alimentaire comme attendu

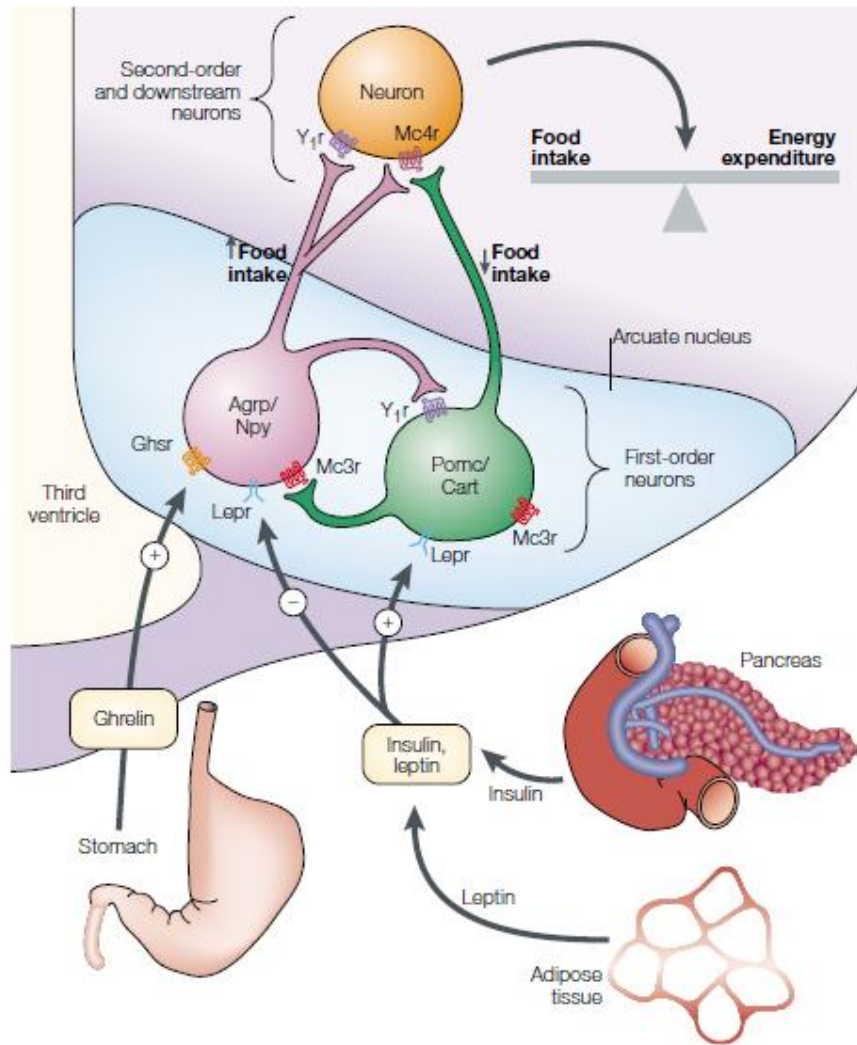


Figure 5: Contrôle de l'homéostasie énergétique par les neurones de l'ARC hypothalamique.

Il y a deux populations neuronales dans l'ARC - Les neurones AgRP/NPY et POMC/Cart - qui sont régulées par les hormones circulantes. AgRP et NPY sont des neuropeptides qui stimulent la prise alimentaire et diminuent les dépenses énergétiques, alors que POMC et Cart sont des neuropeptides qui inhibent la prise alimentaire et stimulent les dépenses énergétiques. L'insuline et la leptine sont des hormones qui circulent en proportion des stocks de tissus adipeux dans le corps, qui inhibent les neurones AgRP/NPY et stimulent les neurones POMC/Cart adjacents. Un niveau plus bas d'insuline et de leptine activerait les neurones AgRP/Cart alors qu'il inhiberait les neurones POMC/Cart. La ghreline est un peptide circulant sécrété par l'estomac qui peut activer les neurones AgRP/NPY et ainsi stimuler la prise alimentaire; ceci donnera un mécanisme potentiel pour la régulation à long terme de la balance énergétique suite au signal fourni après un repas court. Ghsr = growth hormone secretagogue receptor ; lepr = leptine receptor ; Mc4r/mc3r = melanocortine 4/3 receptor ; Y1r = récepteur au neuropeptide Y1.

Selon Barsh and Schwartz, 2002.

(Erickson et al., 1996). Cette absence de phénotype laisse suggérer l'existence de systèmes orexigènes redondants. Ceci a conduit à la découverte du système AgRP (Agouti Related Peptide) qui vient littéralement doubler le système à NPY, puisque l'AgRP est colocalisé dans 90% des neurones à NPY de l'ARC (Hahn et al., 1998) et serait libéré en même temps que ce dernier. Notons qu'un tiers de ces neurones NPY-AgRP expriment un 3ème neurotransmetteur connu pour stimuler la prise alimentaire : le GABA (Olgiati et al., 1980; Horvath et al., 1997). Le NPY exerce ses effets orexigènes ou anaboliques par l'intermédiaire, essentiellement, des récepteurs de type Y1 et Y5 (Schaffhauser et al., 1997; Kushi et al., 1998) et le GABA, par des récepteurs de type GABA_A (Pu et al., 1999). En revanche, le mode d'action de l'AgRP est sensiblement différent puisqu'il n'active pas de récepteur qui lui soit propre mais agit de manière antagoniste sur le système anorexigène de l'ARC. En effet, l'AgRP est un antagoniste des récepteurs MC4-R de l' α -MSH (voir paragraphe suivant) (Fan et al., 1997; Ollmann et al., 1997; Biebermann et al., 2012) (**Figure 5**).

La population de neurones de l'ARC exerçant un effet anorexigène est constituée des neurones à POMC, peptide précurseur de 241 acides aminés dont le clivage aboutit à la production, entre autre, de l' α -MSH. L'implication de ce peptide dans la régulation du métabolisme énergétique a émergé avec le clonage de ses récepteurs, les récepteurs MC3-R et MC4-R. La délétion du gène MC4-R entraîne, chez la souris, le développement d'une hyperphagie accompagnée d'une obésité sévère (Huszar et al., 1997) et différentes mutations de ce gène sont désormais associées au développement d'une obésité sévère chez l'enfant (Vaisse et al., 1998). Notons que la délétion du gène MC3-R entraîne l'apparition d'une obésité sans hyperphagie (Butler et al., 2000). Des expériences d'injections d'agonistes ou d'antagonistes MC4-R suggèrent l'existence d'un tonus anorexigène permanent (Fan et al., 1997), résultat quelque peu contradictoire avec les travaux d'Olszewski et al. (2001) qui montrent une réelle activation des neurones à

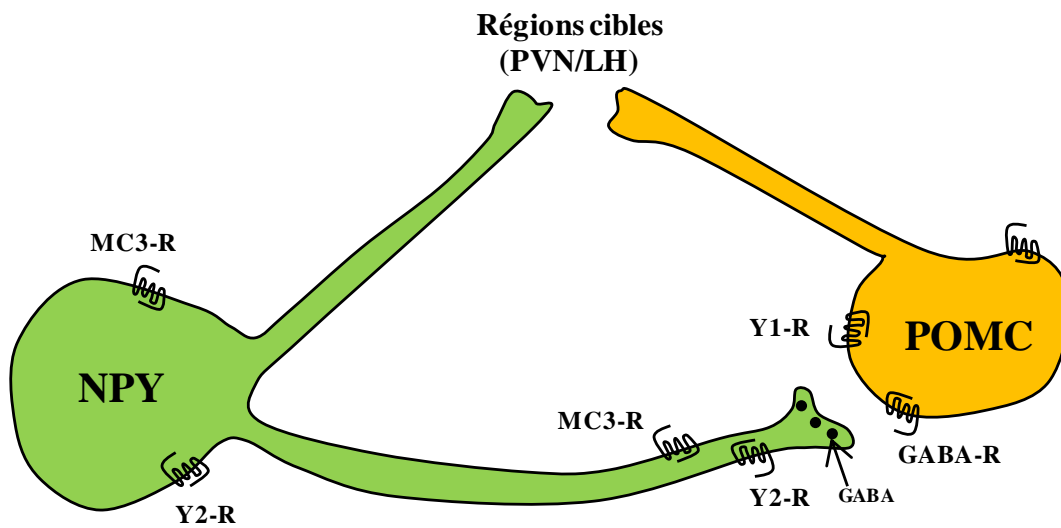


Figure 6: Représentation schématique de l'interconnexion possible entre les neurones à NPY et à POMC au sein du noyau arqué

MC3-R (melanocortin receptor 3), Y1-R et Y2-R (récepteur 1 et 2 au NPY), GABA-R (récepteur au GABA), PVN (noyau paraventriculaire), LH (hypothalamus latéral).

Selon Cone et al., 2001.

POMC uniquement après un repas. De manière similaire aux neurones NPY-AgRP, les neurones à POMC de l'ARC co-expriment un autre peptide capable d'inhiber la prise alimentaire : il s'agit du peptide CART (Cocaïne- and Amphetamine-Related Transcript) (Elias et al., 1998). Des injections intracébroventriculaires de CART diminuent, en effet, la prise alimentaire alors que celle-ci est augmentée suite à l'injection d'anticorps dirigés contre ce peptide (Kristensen et al., 1998). Des neurones à POMC sont également retrouvés au niveau de l'hippocampe et du NTS (centre du réflexe de satiété) dans le tronc cérébral. Notons que ceux présents au niveau du NTS ne co-expriment pas le peptide CART et sont aussi impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique avec un effet anorexigène (Cone, 2005; Berthoud et al., 2006).

Chez la souris, l'ARC renferme environ 500 neurones à NPY, localisés dans la région médiane du noyau et 3000 neurones POMC, principalement localisées dans la région latérale (Cone et al., 2001). Les neurones à POMC de l'ARC, comme les neurones à NPY, projettent majoritairement vers le PVN et le LH (Elias et al., 1998; Legradí and Lechan, 1998; Li et al., 2000; Lu et al., 2003). De manière surprenante, les travaux d'immunohistochimie révèlent que ces deux populations projettent sur les mêmes neurones cibles, que sont, entre autres, des neurones à CRH (Corticotropin Releasing Hormone) et TRH (Thyrotropin Releasing Hormone) dans le PVN, et les neurones à MCH (Melanin Concentrating Hormone) et à orexine dans le LH (Elias et al., 1998; Legradí and Lechan, 1998; Fekete et al., 2000). Ces deux populations neuronales sont d'autant plus liées qu'au niveau de l'ARC, il existe des connexions fonctionnelles entre les neurones à NPY et les neurones à POMC (Bagnol et al., 1999a; Cowley et al., 2001; Roseberry et al., 2004) (**Figure 6**). En effet, une activation des neurones à NPY conduit à l'inhibition des neurones POMC, notamment par l'intermédiaire de la libération de GABA. De plus, les neurones NPY et POMC peuvent également être la cible de l' α -MSH et de l'AgRP puisque ils expriment les récepteurs MC4-R (neurones POMC et NPY) et MC3-R

(neurones NPY) (Cone, 2005; Mounien et al., 2005). Ainsi, ils peuvent être la cible à la fois d' α -MSH et de son antagoniste l'AgRP. D'ailleurs, les agonistes de MC3/4-R dépolarisent alors que l'AgRP hyperpolarise les neurones POMC (Smith et al., 2007). Des neurones exprimant les récepteurs MC3/4R sont abondamment retrouvés dans le LH, VMN, PVN et le DMN au niveau hypothalamique, ainsi que dans le NTS et la moelle épinière (Mountjoy et al., 1994). De la même manière, les récepteurs au NPY sont retrouvés largement dans tout le SNC. Dans l'hypothalamus, les récepteurs au NPY de types Y1, Y2 et Y5 sont fortement exprimés dans l'ARC, le PVN et le VMN (Parker and Herzog, 1999). Enfin, il a été montré récemment que la stimulation des neurones AgRP par photostimulation provoque une augmentation drastique de la prise alimentaire chez la souris, et ceci sans qu'il y ait d'inhibition des neurones POMC (Aponte et al., 2011).

Il convient de noter qu'il existe, dans l'ARC, d'autres neurones exerçant un effet orexigène ou anorexigène, mais les données de la littérature à leur sujet sont plus éparpillées et font parfois l'objet de controverses. C'est la raison pour laquelle, ils ne sont pas développés dans ce manuscrit.

3-2 Les autres noyaux hypothalamiques

La destruction bilatérale du PVN conduit à une obésité associée à une hyperphagie (Aravich and Scalfani, 1983). Le PVN exerce donc un effet global anorexigène. Au moins trois neuropeptides synthétisés dans le PVN diminuent la prise alimentaire et le poids corporel: la CRH, la THR et l'ocytocine (Kow and Pfaff, 1991; Olson et al., 1991a, 1991b; Glowa et al., 1992). Le PVN est un noyau important en ce qui concerne l'intégration d'informations neuroendocrines ou du SNA, et c'est l'une des régions les plus innervées par les neurones POMC et NPY (Bagnol et al., 1999b; Cone, 2005). Le

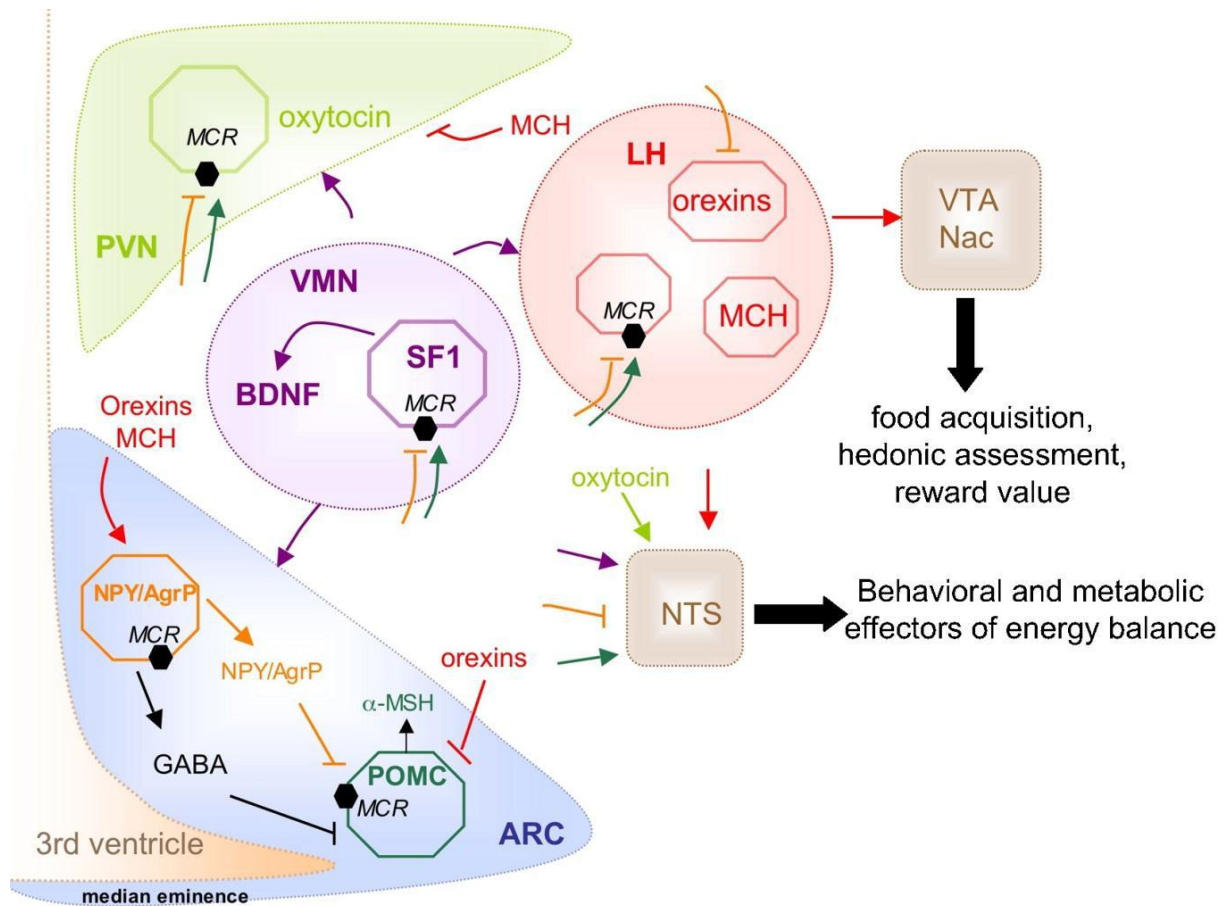


Figure 7: Circuits neuronaux activés lors de la détection hypothalamique de nutriments

Le système mélanocortinergique est le mieux caractérisé lors de la détection hypothalamique des nutriments. Les neurones POMC anorexigènes et NPY orexigènes du NA se projettent sur différents noyaux, dont le PVN, VMN et le LH. En retour, l'ARC reçoit des informations provenant du VMN et du LH ; ces deux noyaux sont interconnectés et se projettent également sur le PVN, centre intégrateur. Les neurones à orexines et MCH du LH interagissent avec le système à mélanocortine et intègrent les informations de ce système avec celles de la récompense/motivation, préalablement traitées dans l'aire tegmentale ventrale (VTA) et le noyau accumbens (Nac). Le NTS reçoit des projections provenant du NA, du PVN, du VMN et du LH, et intègre ces informations hypothalamiques descendantes ainsi que des signaux issue de la sphère digestive. L'ensemble permet de contrôler de multiples effecteurs comportementaux et métaboliques pour le maintien de l'homéostasie énergétique.

D'après Blouet, 2010.

PVN est également un relai du système mélanocortinergique. En effet, les récepteurs à α -MSH sont abondants dans le PVN. Ils sont notamment présents sur les neurones à ocytocine. Les fibres ocytocinergiques issues du PVN, activées lors de la prise alimentaire (Johnstone et al., 2006), projettent vers le noyau du tractus solitaire (NTS) du tronc cérébral (TC) (Sawchenko, 1987; Blevins et al., 2003) ce qui augmente la sensibilité de cette zone pour les signaux satiétogènes issus de la sphère digestive. Le PVN reçoit également des efférences corticales permettant de limiter la prise alimentaire (Moran et al., 2001; Berthoud et al., 2006) (Figure 7).

Le VMN participe au contrôle de la satiété. La majorité des neurones qui constituent ce noyau sont glutamatergiques. Le VMN reçoit des projections mélanocortinergiques de l'ARC, et envoie également des projections vers ce dernier, dont des projections glutamatergiques vers les neurones POMC (Sternson et al., 2005). Le VMN envoie également des projections vers le PVN, le LH, le DMN et le NTS (Sclafani et al., 1975; Canteras et al., 1994; McClellan et al., 2008). Récemment, le facteur stéroïdogénique 1 (SF-1), exprimé spécifiquement dans des neurones du VMN a été suggéré comme étant impliqué dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Bingham et al., 2008; Zhang et al., 2008; Kim et al., 2009). En effet, les neurones SF-1 du VMN expriment MC4-R et libèrent le brain-derived neurotrophic factor (BDNF), un modulateur de la prise alimentaire (Majdic et al., 2002; Unger et al., 2007; Wang et al., 2007). De plus, le tonus mélanocortinergique contrôle l'expression du BDNF (Xu et al., 2003). La perte de fonction du récepteur au BDNF conduit à une hyperphagie et une obésité (Lyons et al., 1999; Yeo et al., 2004). A l'inverse, l'administration (centrale ou en périphérie) de BDNF entraîne une diminution du poids corporel et de la PA, indiquant que le BDNF est un signal anorexigène stimulé par le système à mélanocortine (Xu et al., 2003). Enfin, une étude montre que la délétion du gène *Bdnf* spécifiquement dans le VMN conduit à une

hyperphagie et au développement de l'obésité, ceci suggérant un rôle majeur de ce facteur de croissance dans la régulation de la prise alimentaire (Unger et al., 2007) (Figure 7). Le LH est aussi un noyau hypothalamique dans lequel une détection directe des nutriments a été mise en évidence. De plus, les neurones du LH reçoivent et intègrent des informations sensorielles et hédoniques. Des terminaisons nerveuses du LH innervent également le cortex, le système limbique, le thalamus et la moelle épinière en particulier, déclenchant alors des réponses comportementales ou nerveuses via le SNA (Berthoud, 2002). Deux groupes de neurones peptidergiques sont connus dans le LH, il s'agit des neurones à MCH et à orexines (A et B, aussi appelées hypocrétines), qui jouent un rôle majeur dans l'équilibre énergétique (Sakurai et al., 1998), en particulier via les interactions avec le système à mélanocortine. En effet, les neurones à orexines projettent dans l'ARC, excitent les neurones à NPY (Muroya et al., 2004; van den Top et al., 2004), et inhibent les neurones POMC (Ma et al., 2007). Par ailleurs, les fibres à orexine A innervent les neurones pré-moteurs du raphé caudal, et ce circuit est impliqué dans la régulation de la thermogénèse, ainsi que les fonctions cardiovasculaire et gastrointestinale (Berthoud et al., 2005) (Figure 7). Les neurones MCH du LH sont également capables de moduler l'activité mélanocortinergique de l'ARC chez le rat. Ainsi, l'injection de MCH dans l'ARC augmente la libération d'AgRP et diminue celle d' α -MSH, augmentant ainsi la prise alimentaire (Abbott, 2003). Différentes études pharmacologiques ou génétiques confirment le rôle de la MCH dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et du glucose (Ludwig et al., 2001; Segal-Lieberman et al., 2003). Enfin, son rôle dans le contrôle des dépenses énergétiques via des projections sur le NTS a également été montré (Zheng et al., 2005) (Figure 7).

4- Plasticité hypothalamique et régulation de l'homéostasie énergétique

4-1 Définition de la plasticité cérébrale

Longtemps, les scientifiques ont pensé que le cerveau, une fois mature, se caractérisait par la stabilité de ses connexions, jugées immuables. Depuis une trentaine d'années, cette vision de la structure et de la fonction cérébrale a complètement changé. En effet, l'organisation des réseaux neuronaux peut varier en fonction des expériences vécues par l'organisme (Lambert, 2004). Les modifications de sensibilité ou de réactivité des réseaux neuronaux, ou même de leur connectivité sont autant de signes de la plasticité cérébrale qui persiste chez adulte. Pour parler de plasticité, il faut que les changements observés dans le réseau se traduisent par des changements fonctionnels (Paillard, 1976). Différentes formes de plasticité peuvent-être distinguées au travers de cette définition : la plasticité observée lors du développement (pré- et post-natale) à la base de l'organisation du SNC, la plasticité induite par des lésions (lors de traumatismes du tissu nerveux), et la plasticité adaptative, qui permet la réorganisation de certains circuits neuronaux (chez les jeunes ou les adultes lors d'un processus d'apprentissage, ou lors de modifications de l'environnement). Dans tous les cas, les changements fonctionnels liés à des processus moléculaires et pharmacologiques (comme la modification de la sensibilité de certains récepteurs aux neurotransmetteurs, ou l'apparition de nouveaux récepteurs au niveau des plaques synaptiques) peuvent être consolidés par des modifications morphologiques plus lentes à se mettre en place, mais aussi plus durables. Les modifications morphologiques peuvent se traduire par la disparition de synapses existantes ou la création de nouvelles. Cette synaptogenèse implique le bourgeonnement d'une région membranaire (formation d'épines dendritiques)

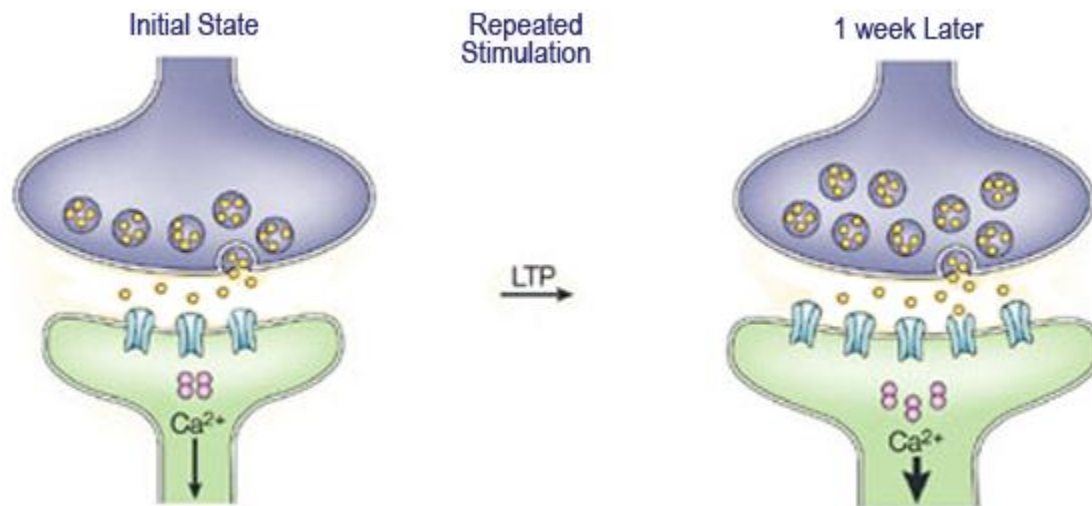


Figure 8: Illustration du phénomène de LTP (selon Hebb)

Après une semaine de stimulation répétée (lors d'apprentissage, de conditionnement, etc...), les connexions synaptiques sont renforcées. Ici ce renforcement se traduit par une augmentation du nombre de récepteurs post-synaptique.

ainsi que le recrutement de récepteurs à neurotransmetteurs à cet endroit. Elle peut s'accompagner d'un retrait d'une portion astrocytaire qui empêchait jusqu'alors tout contact neuro-neuronal ou neurovasculaire (Bonfanti, 2006). Une autre forme de plasticité a été mise en évidence plus récemment, elle est basée sur l'insertion ou le retrait de cellules au sein de circuits existants.

4-2 Plasticité hypothalamique

La plasticité cérébrale a été mise en évidence en premier lieu dans l'hippocampe (Hebb, 1949). Hebb propose que le processus d'apprentissage soit soutenu par un phénomène de potentialisation à long terme permettant un renforcement des synapses entre les neurones stimulés en même temps (**Figure 8**). Les processus de plasticité hippocampique lors de la mémorisation sont jusqu'à aujourd'hui les plus étudiées. Néanmoins, d'autres structures cérébrales se sont révélées capables de réorganisation en réponse aux conditions environnementales ou aux variations de l'état interne. L'hypothalamus fait partie de ces structures. L'apparition de la notion de plasticité hypothalamique date de 1968 (Valenstein et al.). L'expérience menée consistait à stimuler à l'aide d'électrodes le LH de rats adultes et à mesurer trois comportements qui étaient boire, manger, ou ronger. Les animaux stimulés réalisaient un des trois comportements durant la stimulation. Lorsque les expérimentateurs enlevaient l'objet correspondant au comportement observé (biberon d'eau, nourriture ou bout de bois à ronger), les animaux réalisaient une des deux autres tâches. A partir de là, un premier concept assez primaire de plasticité hypothalamique a émergé, décrit comme la capacité du réseau cellulaire hypothalamique à modifier ses connections dans le but de stimuler ou d'inhiber un comportement ou un autre. Depuis, la définition de la plasticité hypothalamique a évolué

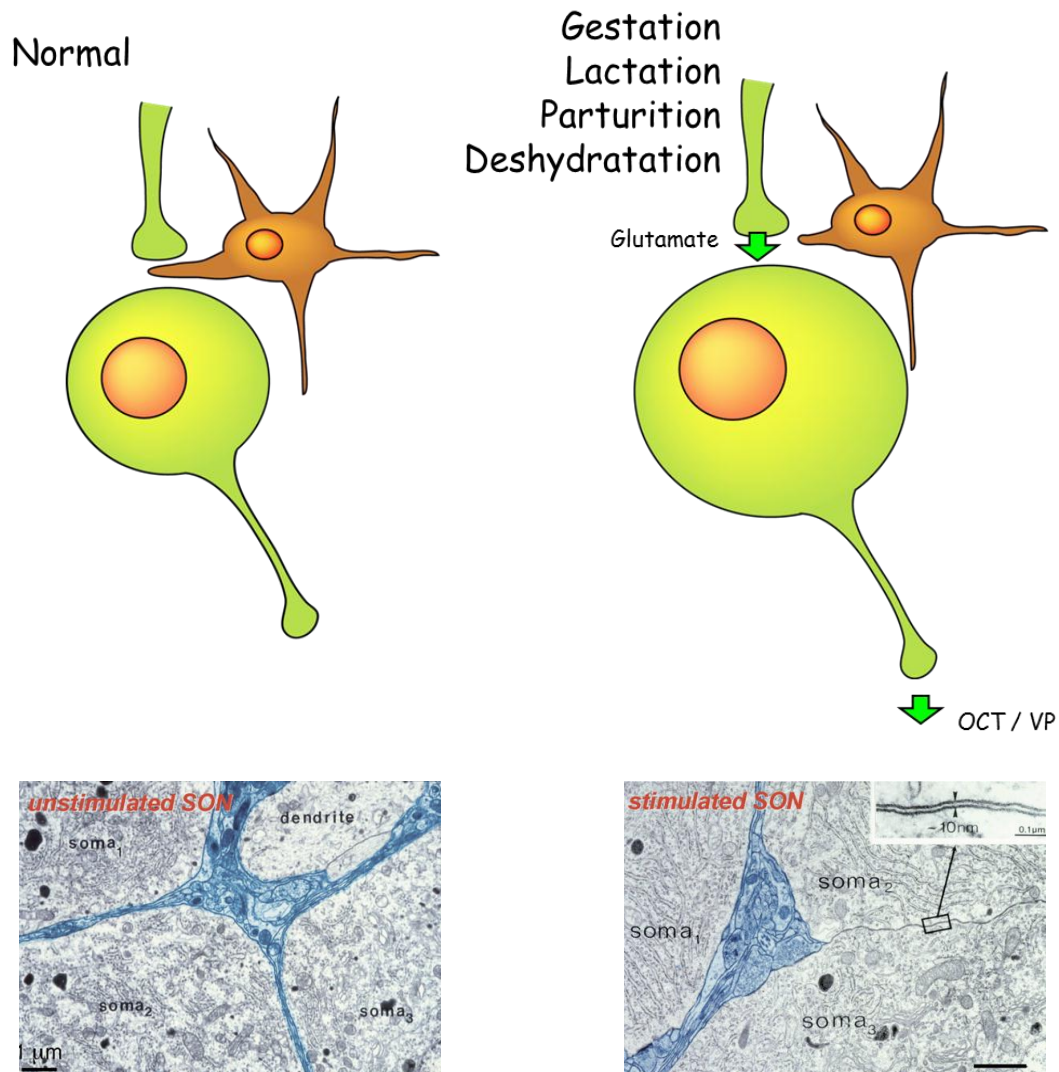


Figure 9: Illustration du retrait d'une projection astrocytaire permettant l'activation de la synapse.

Des changements physiologiques comme la lactation, la parturition ou la déshydratation vont avoir pour effet le retrait des projections astrocytaires d'entre les synapses, et l'activation par le glutamate des neurones à ocytocine et à vasopressine dans le SON et le PVN hypothalamiques.

Selon Theodosis and Poulain, 2008.

et a été étudiée dans différentes structures hypothalamiques.

4-2- α Le système magnocellulaire hypothalamo-hypophysaire

Beaucoup d'études ont révélé la capacité plastique du système magnocellulaire hypothalamo-neurohypophysaire chez l'individu adulte. Les noyaux hypothalamiques supraoptique (SON) et paraventriculaire (PVN), qui font partie de ce système, contiennent deux populations de neurones neurosécréteurs : les neurones à ocytocine et les neurones à vasopressine. Ces neurones reçoivent beaucoup d'afférences représentées par de nombreuses terminaisons synaptiques axonales sur leurs corps cellulaires et sur leurs dendrites. La majorité des cellules gliales dans ces 2 zones sont des astrocytes qui ont une morphologie proche de celle de la glie radiaire que l'on trouve dans un cerveau en développement : des corps cellulaires alignés, des projections denses qui se prolongent en projections plus fines qui sont entremêlées avec les éléments neuronaux, et une immunoréactivité positive pour la vimentine qui est un marqueur de glie radiaire (Theodosis and Poulain, 1993). Dans la zone somatique de ces deux aires hypothalamiques, les somas et dendrites des neurones à vasopressine et ocytocine sont en grande majorité séparés par de fines projections astrocytaires et seulement 1% des membranes neuronales sont en apposition directe (Tweedle and Hatton, 1977; Modney and Hatton, 1989; Marzban et al., 1992; Hatton, 1997). Plusieurs conditions physiologiques comme la gestation, la parturition, la lactation et la déshydratation, sont connus pour activer ces neurones et stimuler la sécrétion des deux hormones par l'hypophyse postérieure. Depuis les années 80, on sait que sous ces conditions, l'activation de ces deux populations de neurones est potentialisée par une rétractation rapide et coordonnée des projections astrocytaires (**Figure 9**), permettant ainsi une

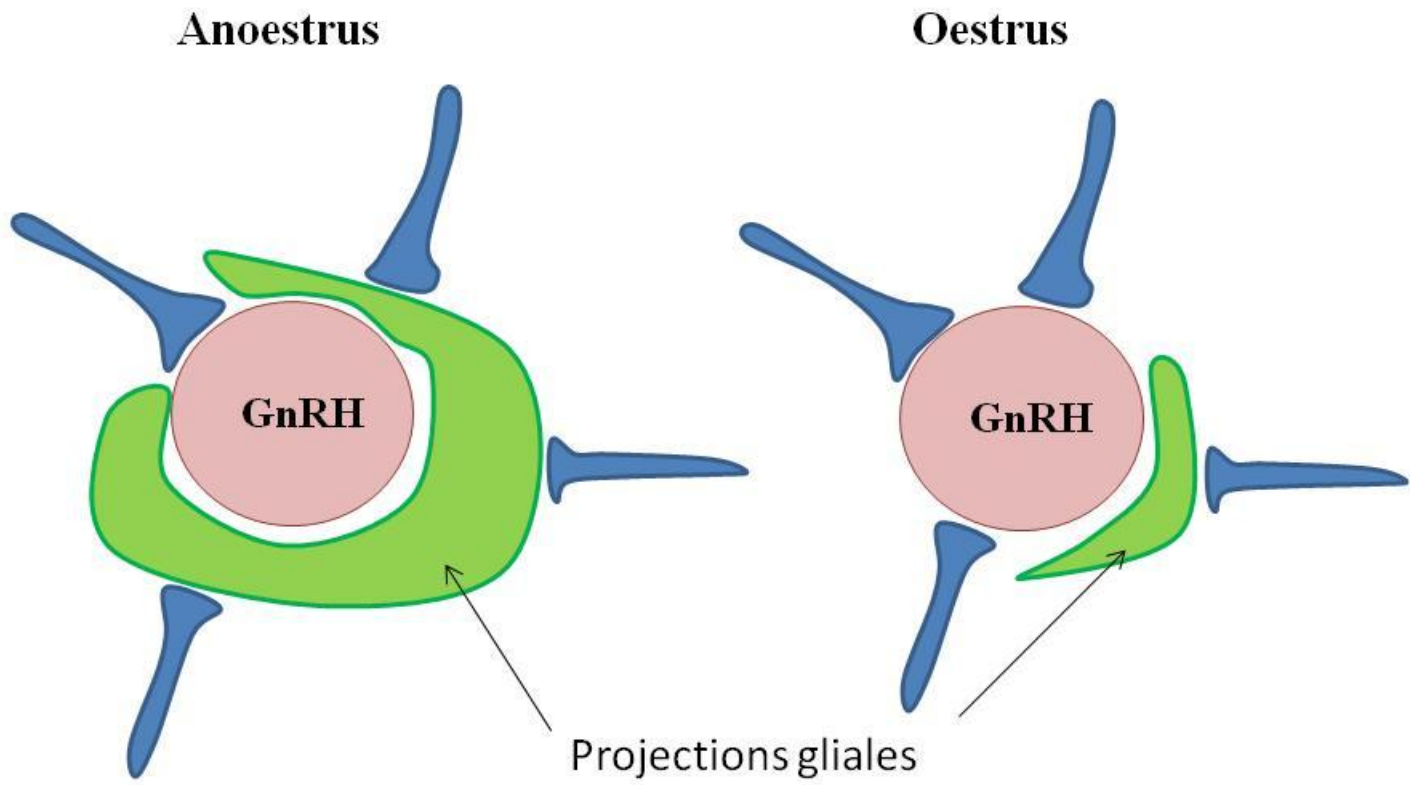


Figure 10: Enroulement des projections gliales autour du soma des neurones à GnRH en période d'anoestrus et d'oestrus.

augmentation des appositions somatiques et axosomatiques, voir même la création de multiples synapses dans le SON et le PVN (Theodosios et al., 1986, 2004; Theodosios and Poulain, 1993; Hatton, 1997). En cas de cessation des changements physiologiques ayant entraîné ces modifications, le réseau cellulaire revient à l'état standard dans un délai qui va de quelques heures à quelques jours (selon le stimulus), ceci montrant la rapidité avec laquelle les événements plastiques peuvent se réaliser.

4-2-β Aires pré-optique et médiobasale

Les neurones à GnRH (gonadotrophine-releasing hormone) se situant dans les aires hypothalamiques préoptique et médiobasale subissent des modifications lors de changements hormonaux (Theodosios and Poulain, 1993). Ainsi, Witkin et al. (1991) ont montré que l'ovariectomie chez le singe rhésus résultait en une augmentation de l'apposition des projections astrocytaires sur le soma des neurones à GnRH, ceci suivi d'une baisse concomitante de l'innervation de ces neurones. En conditions plus physiologiques, chez le mouton, la densité de glie autour des somas des neurones à GnRH est sous l'influence des rythmes saisonniers et sexuels (Lehman et al., 1988). Un animal en période d'anœstrus verra la quasi-totalité de ses neurones à GnRH « enveloppés » dans des projections gliales, réduisant ainsi l'activité synaptique de ces neurones en comparaison avec un animal sexuellement actif (**Figure 10**). Chez les étourneaux, la variation du nombre de synapses axosomatiques est liée à la lumière (Parry and Goldsmith, 1993). Chez les oiseaux ayant subi une période photoréfractaire prolongée, l'activité synaptique de leurs neurones à GnRH est augmentée à cause d'une baisse des contacts gliaux avec les somas de ces neurones.

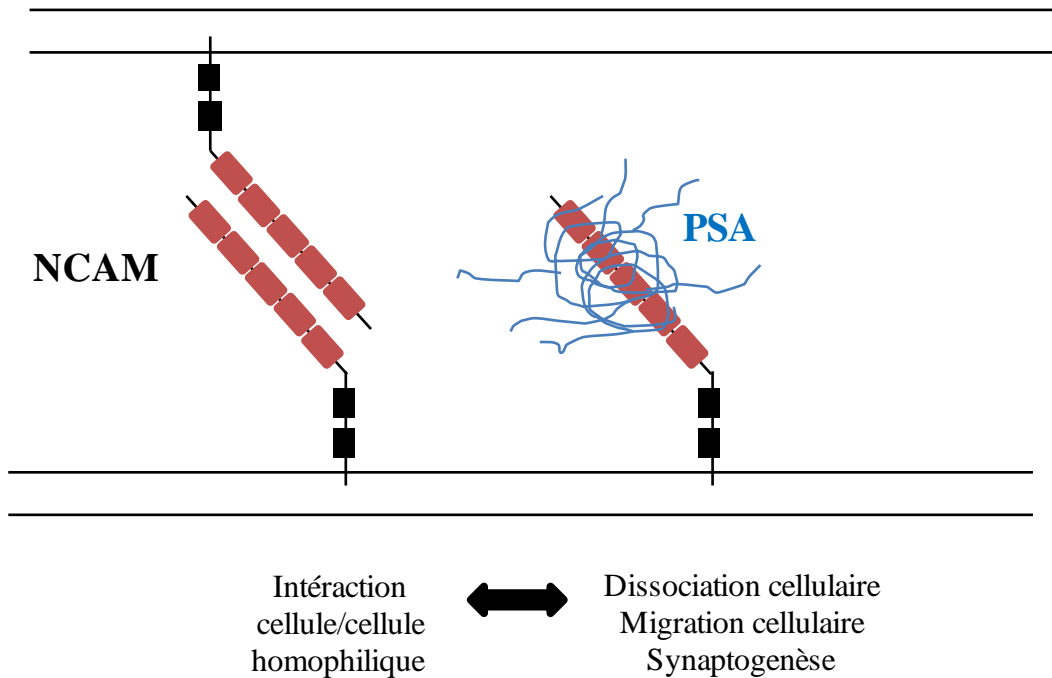


Figure 11: Molécule d'adhésion NCAM et mécanisme d'action de PSA.

Structure générale de NCAM sur la surface membranaire. Les 7 domaines membranaires se lient à une autre protéine NCAM identique sur la membrane cellulaire opposée pour former une jonction cellule-cellule. PSA-NCAM est modifié avec jusqu'à 2 chaînes d'acide polysialique linéaire chargées négativement.

4-2- γ Hypothalamus ventro-médian

L'ARC est une zone hypothalamique particulièrement sensible aux changements hormonaux. Chez la rate, les neurones de l'ARC sensibles à l'œstrogène sont inhibés par une augmentation de « l'enrobage » des cellules gliales autour des neurones lors d'une augmentation d'œstradiol (pro-œstrus), provoquant une baisse du nombre de synapses axosomatiques (Olmos et al., 1989). Ce phénotype se réverse très rapidement en phase d'œstrus (24H entre le pro-œstrus et l'œstrus chez la rate). Le VMN est également sensible aux œstrogènes, ceux-ci pouvant modifier la structure, la taille et l'organisation des synapses des neurones, ainsi que la densité des épines dendritiques (Carrer and Aoki, 1982; Frankfurt et al., 1990; Frankfurt and McEwen, 1991). Ces études démontrent que des réseaux neuronaux précis situés dans l'hypothalamus peuvent se réorganiser chez l'adulte de manière rapide et transitoire en fonction de variations hormonales physiologiques, relayant ou non des modifications environnementales.

4-2- δ Rôle de PSA-NCAM dans la plasticité hypothalamique

L'organisation du SNC est dépendante de molécules d'adhésion et de reconnaissance cellulaire. La possibilité de changer les interactions cellulaires lors de processus de plasticité est cruciale. Le rôle d'une protéine appelée NCAM (neural cell adhesion molecule) a été particulièrement bien étudié non seulement au cours du neurodéveloppement mais aussi dans différents modèles (**Figure 11**). Il existe trois isoformes principales de NCAM générées à partir d'une seule copie du gène après épissage alternatif. L'expression de NCAM peut-être régulée par différents facteurs de transcription comme par exemple les gènes *Hox* et *Pax* (Edelman and Jones, 1995). Au niveau structurel, la partie extracellulaire de NCAM se compose de cinq modules Ig et de

deux modules fibronectines de type III qui peuvent interagir avec les molécules de la matrice extracellulaire, telles que l'héparine, le sulfate d'héparine, le collagène et également les autres molécules NCAM. Le domaine cytoplasmique peut être attaché à l'actine du cytosquelette (Walmod and Kolkova, 2004) (**Figure 11**). La fonction principale de cette glycoprotéine faisant partie de la superfamille des immunoglobulines est de moduler les adhésions neurone/neurone et neurone/glie (Keilhauer et al., 1985). La protéine NCAM est essentielle pour des processus de développement du CNS comme la migration et la guidance axonale (Edelman and Jones, 1997) et la croissance de neurite (Rutishauser and Watanabe, 1985; Doherty and Walsh, 1992; Hall et al., 1996). L'inactivation du gène codant pour la protéine NCAM chez la souris provoque une diminution de la taille des bulbes olfactifs (Cremer et al., 1994), et un défaut de croissance axonale de la région CA3 de l'hippocampe (Cremer and Chazal, 1997). Lors du développement et chez l'adulte, NCAM peut s'associer à PSA (polysialic acid) (**Figure 11**). Ce processus est catalysé par deux sialyl transférases qui sont la sialyltransferase-X (STX ou St8SiaII) qui régule l'expression de PSA-NCAM pendant le développement, et la polysialyltransferase (PST ou St8SiaIV) qui est prédominante dans le cerveau post-natal (Hildebrandt et al., 1998). Lorsque PSA est associé à NCAM, l'adhésion cellule-cellule est diminuée, permettant un remaniement des connections synaptiques (Fields and Itoh, 1996; Benson et al., 2000; Cremer et al., 2000; Rønn et al., 2000; Bonfanti, 2006). Il a été démontré que certains remaniements des réseaux hippocampique et hypothalamique vus précédemment impliquaient PSA-NCAM. Dans l'hypothalamus, PSA-NCAM est particulièrement abondant dans le SON (Theodosios et al., 1991; Bonfanti et al., 1992). Des expériences de microscopie électronique ont montré que le marquage PSA est associé avec les projections astrocytaires, et surtout celles se trouvant autour des somas neuronaux, mais qu'il est également présent sur les dendrites et les axones qui projettent vers la neurohypophyse (Theodosios and Poulain, 1999; Bonfanti, 2006). Chez les rates en

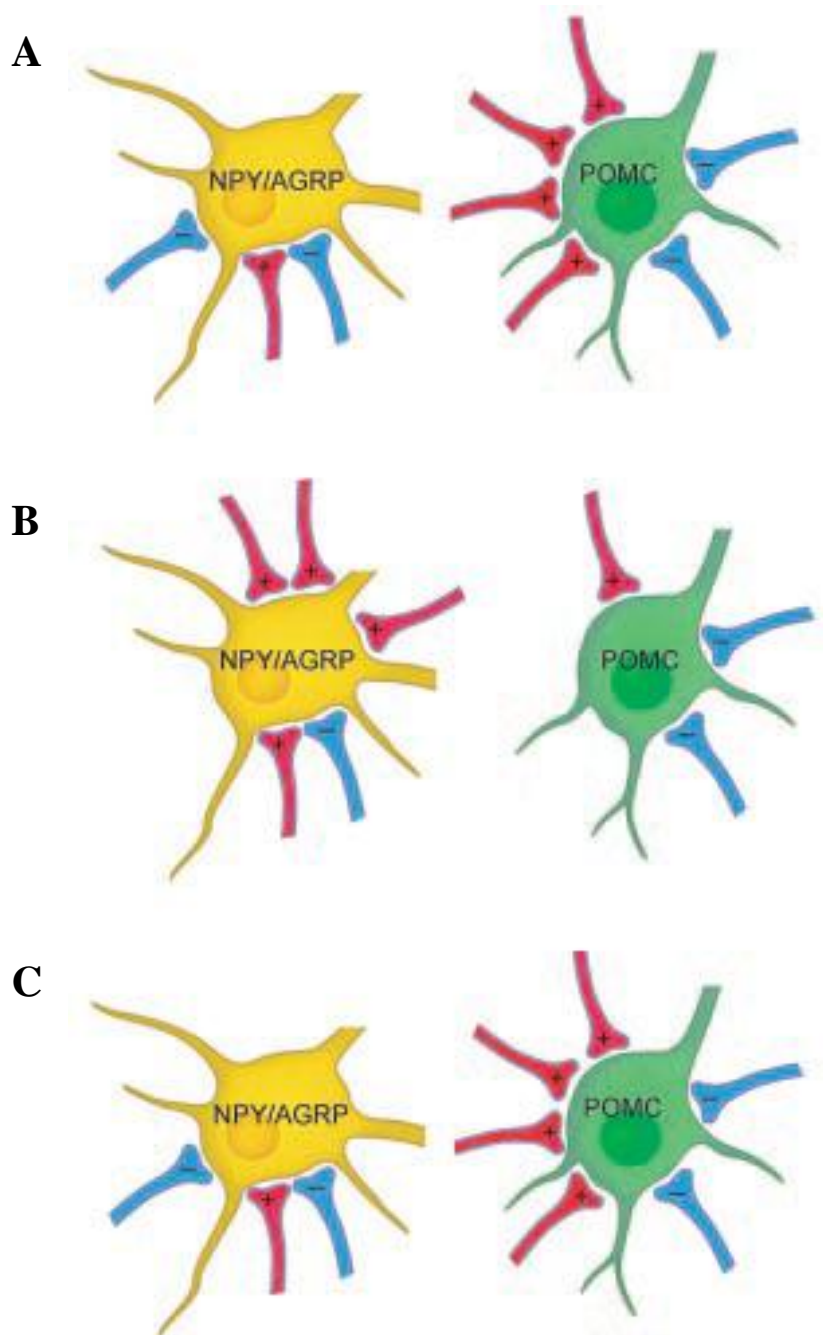


Figure 12: Modifications des afférences synaptiques chez les souris ob/ob et effet de la leptine.

(A) Afférences synaptiques sur les neurones POMC et NPY chez les souris wt. (B) Afférences synaptiques sur les neurones POMC et NPY chez les souris ob/ob. (C) 6h après injections en ip de la leptine, les deux populations neuronales retrouvent des tonus équivalents à ceux observés chez les souris wt.

Selon Pinto et al., 2004.

lactation, on observe une augmentation dramatique de l'expression de PSA-NCAM dans le SON et la neurohypophyse par rapport à des rates vierges (Pierre et al., 2001). De même, dans l'ARC, la suppression enzymatique de PSA montre que la réduction réversible du nombre de synapses chez la femelle adulte lors de l'oestrus est un phénomène PSA-NCAM dépendant (Hoyk et al., 2001). La polysialylation de NCAM semble donc être un événement moléculaire majeur permettant aux prolongements astrocytaires de se déplacer, et favorisant ainsi l'activation ou l'inhibition de certaines synapses.

4-3 Plasticité hypothalamique et régulation de l'homéostasie énergétique

Les variations hormonales sont capables de modifier la cytoarchitecture de certains réseaux neuronaux hypothalamiques. Par analogie, il était vraisemblable que des hormones métaboliques, telles que la leptine ou la ghréline, puissent aussi modifier les connexions cellulaires dans l'hypothalamus, et notamment affecter les circuits de la prise alimentaire. Ainsi, il a été montré que chez les souris déficientes en leptine (ob/ob), le nombre de synapses excitatrices (glutamatergiques) est élevé sur les neurones NPY et moins important sur les neurones POMC par rapport à la situation observée chez les souris sauvages. Le nombre de synapses inhibitrices (GABA-ergiques) est diminué sur les NPY et augmenté sur les POMC chez les souris mutantes par rapport à la situation contrôle (**Figure 12**). Cette situation doit favoriser la prise alimentaire, puisque le phénotype de ces souris présente une augmentation dramatique de leur poids. Une injection intrapéritonéale de leptine chez ces souris mutantes restaure l'organisation synaptique de ces circuits. En 6 heures seulement la leptine provoque une baisse de 85% des synapses excitatrices et une augmentation de 70% des synapses inhibitrices sur les neurones NPY ; et une augmentation de 300% des synapses excitatrices sur les neurones

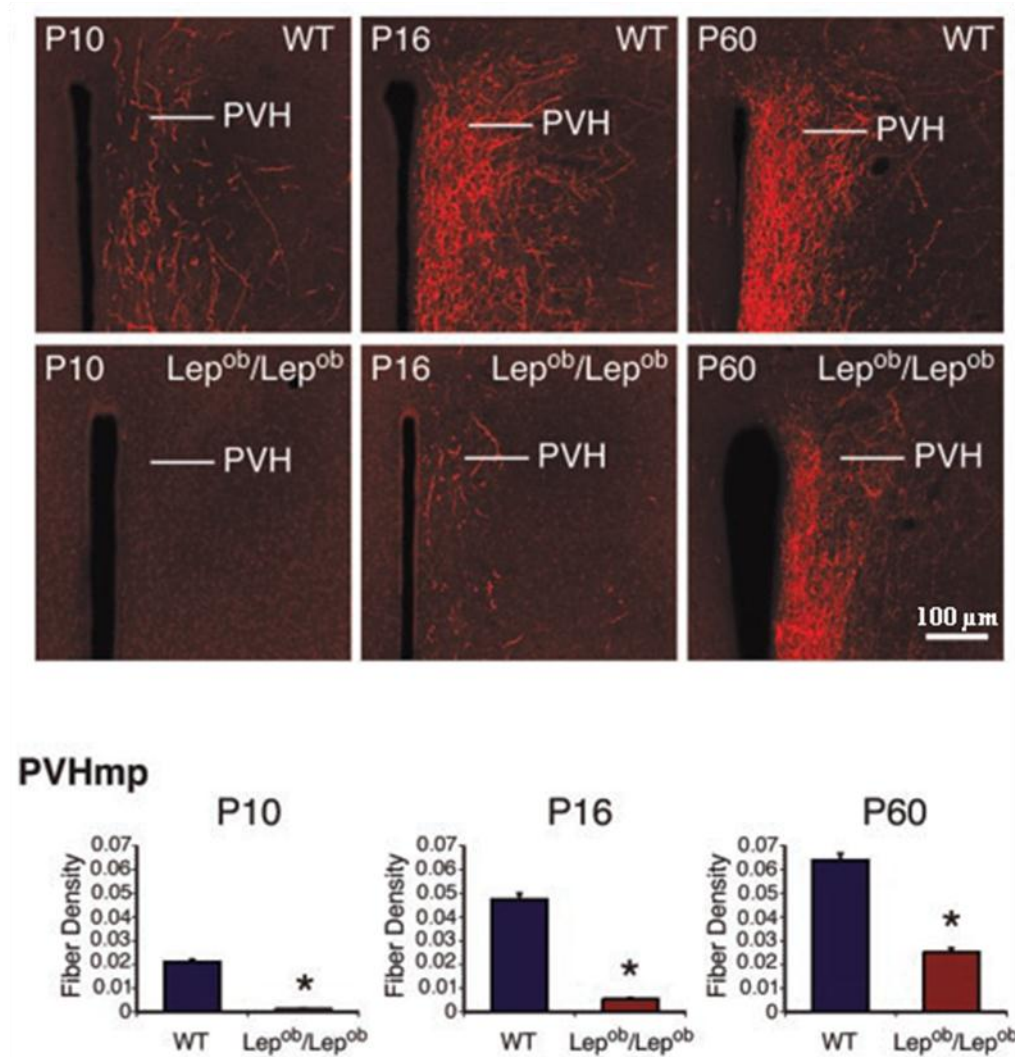


Figure 13: Projections de l'ARC vers le PVN chez des souris wt et chez les souris ob/ob à P10, P16 et P60.

La densité des fibres qui projettent de l'ARC au PVN est beaucoup moins importante chez les souris ob/ob dès le stade post-natal P10 jusqu'au stade adulte P60.

Selon Bouret et al., 2004.

POMC (Pinto et al., 2004) (**Figure 12**). Bien que 6h ne suffisent pas à rétablir le phénotype comportemental, un traitement de leptine durant 2 jours provoque une baisse de la prise alimentaire et du poids corporel. Si cet effet cellulaire structurant participe à la réponse comportementale, un délai de 24h au moins est donc requis. Ainsi le remodelage des connexions neuronales pourrait participer à la régulation de l'homéostasie énergétique. L'organisation des circuits de la prise alimentaire intègre donc les conditions métaboliques et varie notamment en fonction de l'état métabolique et en fonction des taux de leptine circulante. La leptine participe également à la mise en place des circuits neuronaux de la prise alimentaire au cours du développement. Le taux de leptine plasmatique augmente dès la première semaine post-natale (Ahima et al., 1998). Le pic de leptine néonatal ne provoque pourtant pas de perte de poids de l'animal. Durant cette période critique, un défaut de leptine comme on peut l'observer chez les souris ob/ob, provoque une perte de poids du cerveau des animaux par rapport à des souris contrôle (Ahima et al., 1999; Stepan and Swick, 1999; Ahima and Hileman, 2000). Ceci suggère que la leptine est un acteur essentiel pour le bon développement du cerveau. Les souris ob/ob déficientes en leptine présentent également des densités de projections axonales de l'ARC vers les autres noyaux hypothalamiques beaucoup moins importantes que les souris wt (de P10 à P60 ; Bouret et al., 2004) (**Figure 13**). L'injection chronique de leptine de P4 à P12 chez les ob/ob rétablit le phénotype et provoque une diminution de leur prise alimentaire à P32. L'étude *ex vivo* sur des tranches de cerveaux issus de ces souris montre que l'ajout de leptine provoque en seulement 72h la prolifération et l'élongation des axones des neurones de l'ARC. Ainsi la leptine est nécessaire pour générer les connexions entre l'ARC et le PVN, connexions qui s'avèrent essentielles au stade adulte puisque ces souris présentent un dysfonctionnement du contrôle de l'homéostasie énergétique.

Le même phénomène est retrouvé chez des rats sélectionnés pour leur prédisposition à devenir obèses s'ils sont soumis à un régime gras (rats DIO pour diet

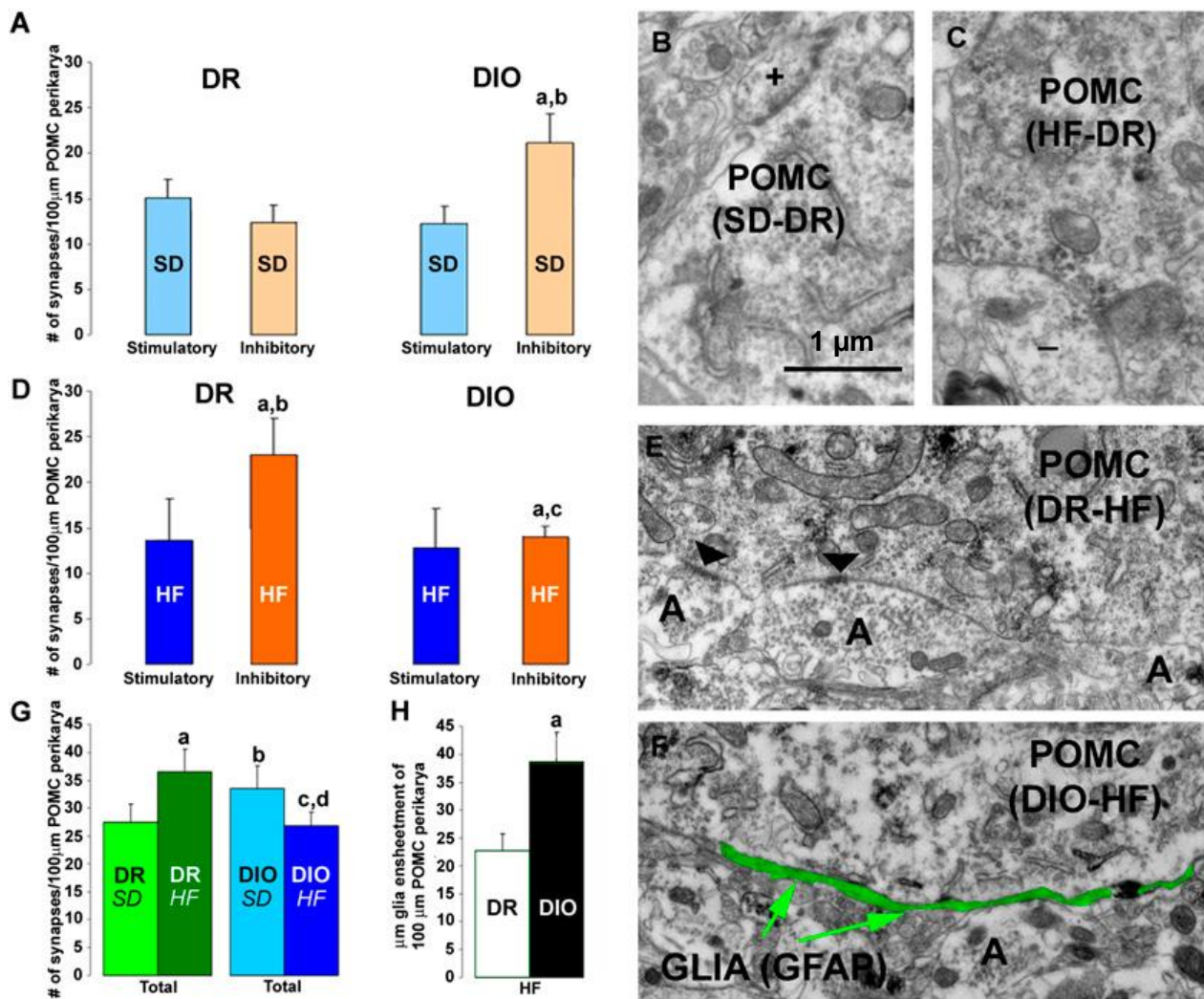


Figure 14: Organisation des afférences synaptiques chez les rats DR et les rats DIO.

(A) Nombres de connexions stimulatrices et inhibitrices sur les neurones POMC des deux populations de rats nourries en régime STD. (B et C) Images de microscopie électronique montrant une connexion excitatrice (B) et inhibitrice (C) sur un neurone POMC d'un rats DR-STD (B) et d'un rat DIO-STD (C). (D) Nombres de connexions stimulatrices et inhibitrices sur les neurones POMC des deux populations de rats nourries en régime HFD. (E et F) Images de microscopie électronique montrant le soma d'un neurone POMC d'un rat DR-HFD (E) et d'un rat DIO-HFD avec une projection gliale en vert (F). (G) Nombre total de connexions synaptiques chez des rats DR ou DIO nourries avec un régime STD ou HFD. (H) Surface de projections gliales entourant le périkarion des neurones POMC chez les rats DR ou DIO.

Selon Horvath et al., 2010.

induce obesity vs DR pour diet resistant). Lors du développement post-natal (à P12 et P16), les projections de l'ARC vers le PVN sont 2 à 4 fois moins denses chez les rats vulnérables par rapport aux rats résistants (Bouret et al., 2008). Cet effet est indépendant des conditions métaboliques des rats pendant la gestation et la lactation. De plus, chez les adultes, les rats sélectionnés pour être sensibles au régime gras mais maintenus sous régime STD présentent plus de synapses inhibitrices que de synapses excitatrices sur les neurones POMC de l'ARC (**Figure 14**), alors que les rats DR ont autant de synapses des deux types. Après 3 mois de régime HFD, cette organisation synaptique est inversée pour les deux populations de rats. Ainsi, les rats DIO présentent davantage de synapses excitatrices sur les neurones POMC alors que les rats DR présentent plus de synapses inhibitrices sur les neurones POMC (Horvath et al., 2010). Les conditions nutritionnelles sont capables de remodeler les connexions synaptiques, et ce remodelage semble être en faveur d'une stimulation des neurones POMC. Mais la situation est paradoxale car cette réorganisation qui pourrait être bénéfique suite à l'augmentation du tonus anorexigène, n'est pas accompagnée par une baisse de la prise alimentaire. Les auteurs suggèrent qu'à long terme la réorganisation des réseaux n'est pas capable d'enrayer la prise de poids car une résistance à la leptine s'installe, ce qui ne permet plus d'activer le système à mélanocortines même remanié.

De manière physiologique, chez l'adulte, la leptine va également permettre un remodelage des connexions synaptiques sur les neurones à hypocrétine/orexine (HCRT/ORX), qui sont connus pour stimuler l'état d'éveil et la prise alimentaire (Yamanaka et al., 2003). En temps normal, sur les neurones HCRT/ORX, le tonus exciteur est largement plus important que le tonus inhibiteur (Horvath, 2005). La mise à jeun augmente d'autant plus ce tonus exciteur de manière leptine dépendante. Cette plasticité qui permet une augmentation très importante de l'activité de ces neurones en cas de jeûne s'explique d'un

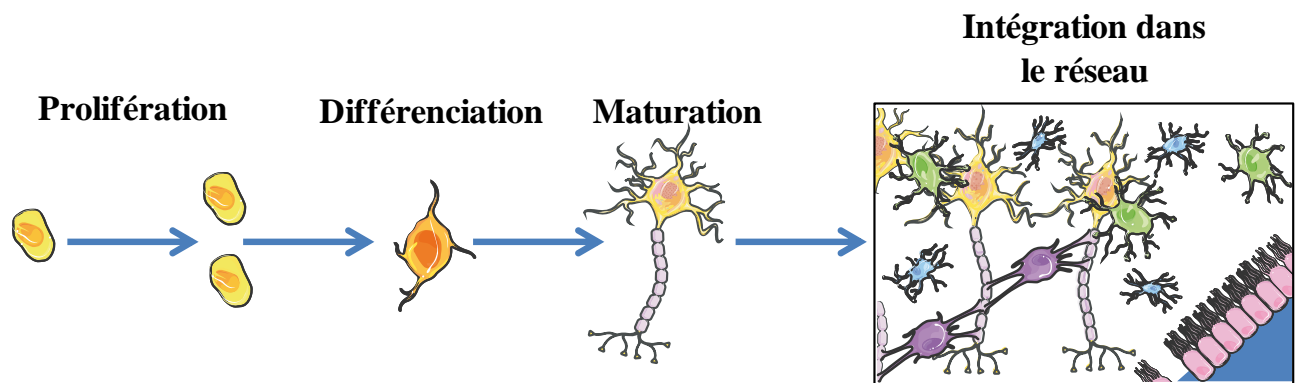


Figure 15: Illustration des étapes successives du phénomène de neurogenèse

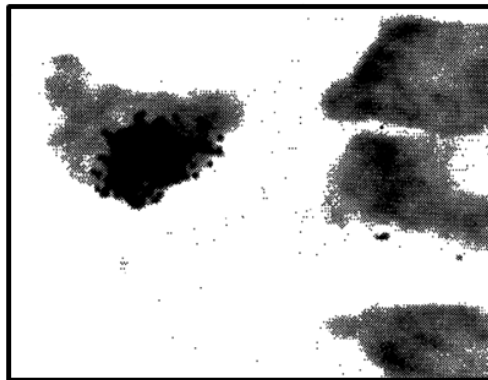


Figure 16: Première mise en évidence de la neurogenèse dans le cerveau.

Marquage radioactif de neurones ayant incorporé de la thymidine triciée dans le cortex cérébral de rat adulte ayant subi une lésion 1 mois plus tôt.

Selon Altman, 1962.

point de vue évolutif, en effet l'animal doit être particulièrement éveillé quand il est à la recherche de nourriture pour sa survie.

La plasticité synaptique hypothalamique semble donc être un phénomène rapide, réversible et impliqué dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Cependant une autre forme de plasticité pourrait aussi exercer un rôle important dans cette régulation, il s'agit du renouvellement cellulaire.

5- Neurogenèse et régulation de l'homéostasie énergétique

5-1 Définition

La biologie du développement nous apprend que l'organogenèse du SNC nécessite la multiplication de cellules immatures qui doivent être placées à l'endroit et au nombre adéquats, qui vont éventuellement migrer sur des distances plus ou moins importantes pour atteindre une région spécifique, puis se différencier en neurones qui vont eux-mêmes mûrir pour se spécialiser, puis se connecter entre eux pour former un réseau cellulaire (**Figure 15**). Cette séquence d'évènements constitue la neurogenèse au cours de laquelle des processus de sélection peuvent intervenir à chaque étape, et qui permettent d'affiner la structure du réseau. Mais ce processus n'est pas restreint à la période périnatale. En effet, le cerveau doit s'accommoder de la croissance de l'organisme et de ses nouvelles capacités cognitives et comportementales. Ainsi le cerveau adulte, comme le cerveau en développement, est capable de produire de nouveaux neurones. Cette idée a émergé pour la première fois en 1962 quand Altman a utilisé une méthode d'incorporation de thymidine tritiée pour démontrer l'apparition de nouveaux neurones dans le cerveau de rat après une lésion (**Figure 16**). Ces résultats allaient à contre-courant du dogme selon lequel

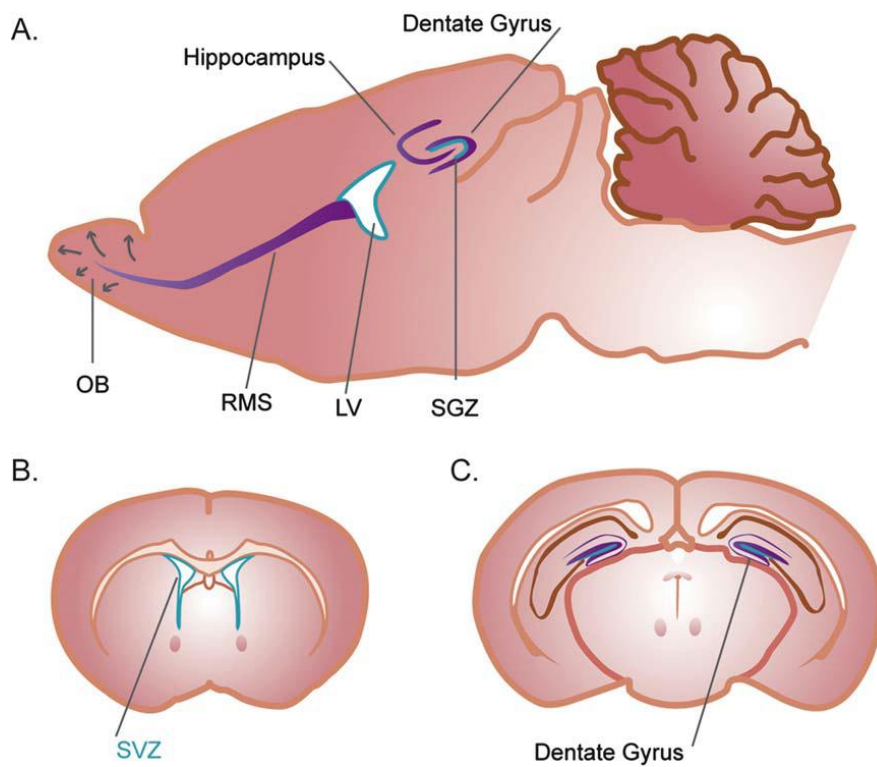


Figure 17: Localisation anatomique des deux niches neurogéniques les plus étudiées dans le cerveau: la SVZ et la SGZ.

LV = Ventricule latéral ; OB = Bulbes olfactifs ; RMS = Flux rostral migratoire ; SGZ = Zone sous granulaire ; SVZ = Zone sous ventriculaire.

le cerveau était constitué d'un nombre de neurones fixé à la fin du développement, celui-ci ne faisant que diminuer au fur et à mesure des années (Ramón y Cajal and May, 1928). Ce dogme fut d'ailleurs complètement abandonné après les études de Nottebohm et de ses collaborateurs qui ont observé une plasticité cellulaire saisonnière dans le centre de contrôle vocale des oiseaux chanteurs, et donc mis en évidence pour la première fois une plasticité du nombre de neurones dans le cerveau en conditions physiologiques (Goldman and Nottebohm, 1983; Paton and Nottebohm, 1984; Burd and Nottebohm, 1985).

5-2 Neurogenèse dans différentes structures cérébrales

Chez les mammifères, lors du développement, toutes les structures du cerveau sont capables de produire de nouveaux neurones. Au fur et à mesure que le cerveau se développe et se complexifie, la capacité de neurogenèse décroît. A l'âge adulte, cette neurogenèse se limite à quelques régions du cerveau uniquement.

5-2-α La zone sous-ventriculaire

La zone la plus étudiée pour son caractère prolifératif au stade adulte est la zone sous ventriculaire (SVZ) (**Figures 17 et 18**). Dans cette région certaines cellules exprimant GFAP et présentant une morphologie astrocytaire agissent comme des cellules souches à division lente (Doetsch et al., 1999). Ces cellules souches sont capables de se diviser et de générer des précurseurs neuraux immatures, qui prolifèrent encore transitoirement, et qui vont se différencier en neuroblastes (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Environ 30 000 neuroblastes vont migrer en chaîne de manière unidirectionnelle

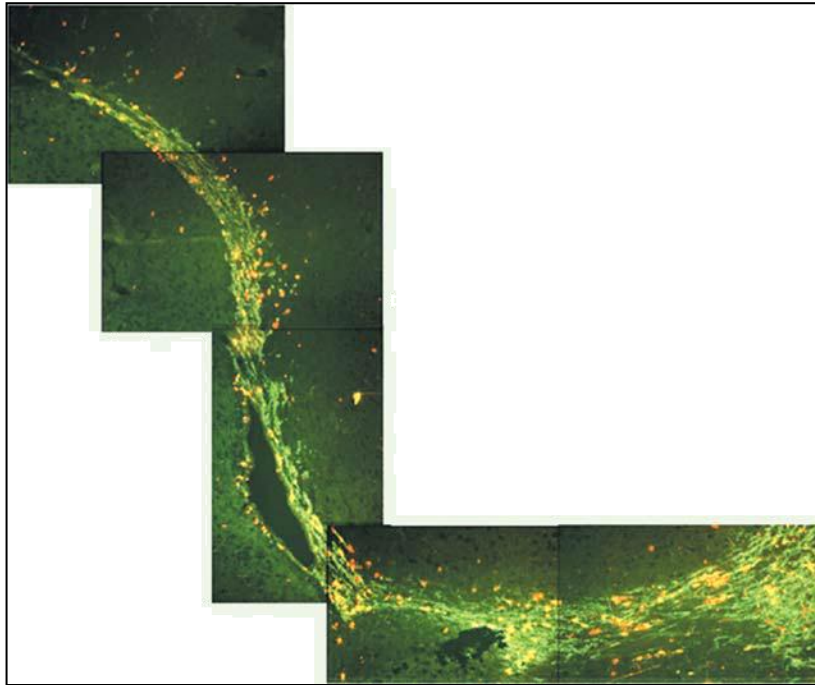


Figure 18: Flux rostral migratoire avec les cellules BrdU+ en rouge et PSA- NCAM en vert.

Selon Picard-Riera et al., 2003

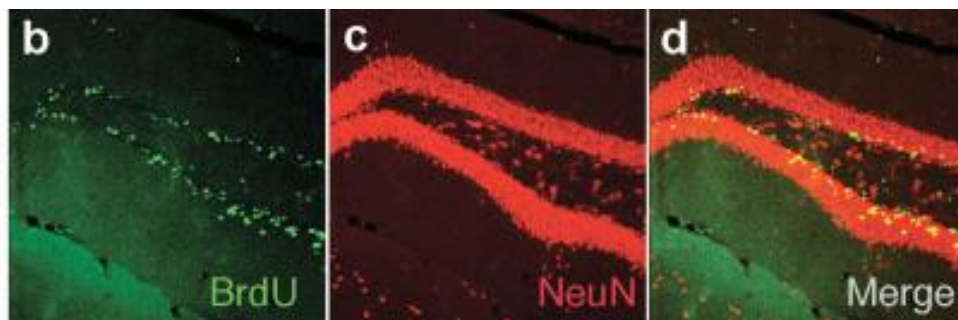


Figure 19: Neurones néoformés dans la SGZ du gyrus denté de l'hippocampe.

(b) Cellules BrdU+ en vert. (c) Cellules NeuN+ en rouge (d) Superposition

Selon Thuret et al., 2009.

jusqu'aux bulbes olfactifs (BO) *via* le flux rostral migratoire (RMS) chaque jour, ce qui fait de la SVZ la zone du cerveau qui a le plus fort potentiel prolifératif chez le rongeur. Les neuroblastes migrent au travers d'une structure tubulaire formée par des astrocytes spécialisés (Jankovski and Sotelo, 1996; Lledo et al., 2006). Une fois arrivées aux BO, seulement 50% des cellules nées dans la SVZ vont être sélectionnées et se différencient en 2 populations d'interneurones inhibiteurs, l'une qui va s'installer dans la couche granulaire du BO, et l'autre dans la couche périglomérulaire (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Yamaguchi and Mori, 2005; Mouret et al., 2008). Ces interneurones vont être ensuite intégrés au réseau et ils vont moduler les informations sensorielles arrivant aux BO. Il a d'ailleurs été montré que la création de nouvelles cellules, autant que l'élimination par apoptose des nouvelles cellules en surplus, sont des phénomènes essentiels pour l'apprentissage perceptuel olfactif (Petreanu and Alvarez-Buylla, 2002; Mandairon et al., 2006; Moreno et al., 2009; Mouret et al., 2009).

5-2-β L'hippocampe

L'autre zone du cerveau adulte connue pour sa grande capacité proliférative est la zone sous granulaire (SGZ) du gyrus denté (DG) de l'hippocampe (**Figures 17 et 19**). Dans cette région, chez la souris, on trouve environ 9000 progéniteurs neuraux exprimant DCX (Doublecortine ; marqueur de neurone immature) issus de la division asymétrique de cellules souches (Cameron and McKay, 2001). Contrairement à la SVZ, les progéniteurs neuraux de l'hippocampe vont se diviser, être sélectionnés, et se différencier localement dans la SGZ, leur migration se limite à se déplacer de la couche sous-granulaire à la couche granulaire du gyrus denté de l'hippocampe (Kuhn et al., 1996; Abrous and Koehl, 2005). Les neurones néoformés envoient des projections axonales vers la région CA3 de l'hippocampe, et des arborisations dendritiques vers la couche moléculaire

(Stanfield and Trice, 1988; Markakis and Gage, 1999). Ces nouveaux neurones sont morphologiquement identiques aux neurones granulaires déjà en place (ils expriment des marqueurs de neurones matures comme NeuN ou Map-2) (Kempermann, 2003) (**Figure 19**), et développent des propriétés électrophysiologiques de neurones matures (van Praag et al., 2002). Cette neurogenèse joue un rôle causal dans différentes fonctions de l'hippocampe : apprentissage, mémorisation, humeur (Shors et al., 2001; Santarelli et al., 2003; Dupret et al., 2007; Imayoshi et al., 2008; Garthe et al., 2009; Thuret et al., 2009).

Ces deux régions, la SVZ et la SGZ, sont appelées niches neurogéniques car elles possèdent un microenvironnement capable de retenir les cellules à un stade très immature et indifférencié (Li and Xie, 2005; Morrison and Spradling, 2008). Ces deux zones sont celles qui renferment le plus de précurseurs neuronaux chez l'adulte. Toutefois, des capacités neurogéniques ont été observées dans d'autres zones du cerveau, même si la production de nouvelles cellules est bien plus faible à ces endroits. Ainsi, la production de nouveaux neurones a été observée dans le néocortex (Altman, 1963; Huang et al., 1998; Gould, 1999; Gould et al., 2001; Bernier et al., 2002; Fowler et al., 2002; Dayer et al., 2005), le cortex piriforme (Bernier et al., 2002; Pekcec et al., 2006), l'amygdale (Bernier et al., 2002; Fowler et al., 2002), le striatum (Bédard et al., 2002, 2006), la substance noire (Zhao et al., 2003), les noyaux vestibulaires (Tighilet et al., 2009) et le complexe vagal dorsal (Bauer et al., 2005; Chigr et al., 2009).

5-3 Neurogenèse hypothalamique

La technique classique actuellement utilisée pour mettre en évidence la prolifération cellulaire consiste à réaliser des injections en ip d'un analogue de la thymidine: le bromodeoxyuridine (BrdU), qui s'incorpore à l'ADN lors de sa réplication. Ces injections sont suffisantes pour détecter les cellules qui se sont divisées dans la SVZ



Figure 20: Effet de l'exposition à un mâle dans l'hypothalamus des femelles campagnol.

(D) Hypothalamus d'une femelle non-exposé à un mâle, où on peut voir 3 cellules BrdU+ (E) Hypothalamus d'une femelle exposé à un mâle, on dénombre 8 cellules BrdU+.

Selon Fowler et al., 2002.

ou la SGZ (**Figures 18 et 19**), mais s'avèrent peu sensibles pour détecter des niveaux de prolifération faibles. Dans ces conditions, on observe dans l'hypothalamus adulte que quelques cellules dans la couche épendymaire du 3^{ème} ventricule, et d'autres éparses dans le parenchyme (Huang et al., 1998; Fowler et al., 2002; Kokoeva et al., 2005a, 2007) (**Figure 20 et 21**). Dès lors, l'hypothalamus a été considéré comme une zone du cerveau adulte très peu proliférative. Pourtant en 2001, Pencea et ses collaborateurs ont mis en évidence une prolifération beaucoup plus importante dans l'hypothalamus de rat par rapport à ce qui avait été initialement observé. Ceci a été confirmé quelques années plus tard chez la souris (Kokoeva et al., 2005). Pour mettre en évidence cette prolifération, ils ont utilisé une technique plus sensible qui consiste à injecter le BrdU directement dans le cerveau et de manière chronique grâce à des mini-pompes osmotiques. Cette technique a donc permis de détecter beaucoup plus de cellules BrdU+ (**Figure 21**) qu'avec la méthode classique, et de déterminer que les nouvelles cellules se situaient à la fois dans la couche épendymaire qui borde le troisième ventricule, mais aussi et très largement dans tout le parenchyme hypothalamique. Les cellules épendymaires bordant le 3^{ème} ventricule ainsi que les tancytes de l'éminence médiane, ont été identifiées comme étant des précurseurs neuraux (Xu et al., 2005; Lee et al., 2012; McNay et al., 2012). Plus précisément, ces précurseurs neuraux se subdivisent en deux populations qui sont d'une part des cellules souches à prolifération lente capables de s'autorenouveler, et de donner des neurosphères *in vitro*, et des cellules progénitrices neuronales à prolifération plus rapide qui ont une capacité d'autorenouvellement très limitée et qui sont déjà engagés dans une voie de différenciation neuronale d'autre part (McNay et al., 2012). A partir de ces observations, l'hypothalamus a été considéré comme une zone neurogénique. La prolifération cellulaire constitutive dans l'hypothalamus adulte a été retrouvée chez la souris (Kokoeva et al., 2005, 2007), chez le rat (Pencea et al., 2001; Matsuzaki et al., 2009), chez le hamster (Huang et al., 1998) ou chez le mouton (Migaud et al., 2010), indiquant que ce processus a

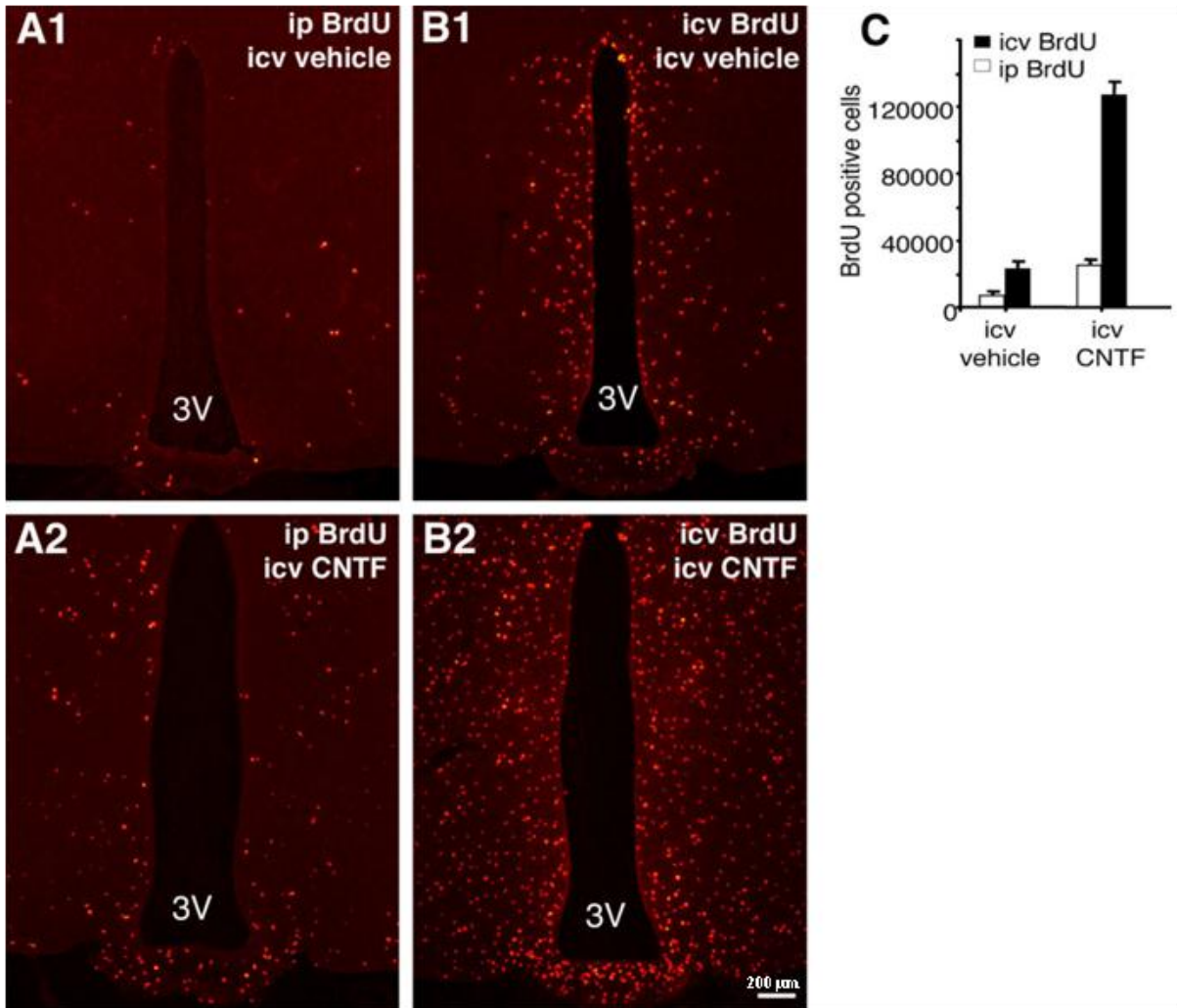


Figure 21: Prolifération hypothalamique.

(A1-2) Marquage anti-BrdU dans l'hypothalamus de souris après injections ip de BrdU pendant 7 jours, avec (A1) ou sans (A2) Infusion chronique de CNTF dans le ventricule latéral cérébral. (B1-2) Marquage anti-BrdU dans l'hypothalamus de souris après 7 jours d'infusion chronique de BrdU dans le ventricule latéral cérébral avec (B1) ou sans (B2) ajout de CNTF dans la solution injectée. (C) Nombre de cellules BrdU positive après traitement.

Selon Kokoeva et al., 2005.

été conservé pendant l'évolution. Cette prolifération peut varier en fonction de facteurs exogènes et endogènes. Par exemple, chez la femelle campagnol, deux jours d'exposition auprès d'un mâle provoquent une augmentation du nombre de cellules BrdU+ dans l'hypothalamus, alors qu'au contraire l'isolation provoque un stress causant une baisse du nombre de cellules prolifératives dans l'hypothalamus chez ces animaux sociaux (**Figure 20**) (Fowler et al., 2002). Il a aussi été rapporté que les jours à courte photopériode provoquent une augmentation du nombre de cellules prolifératives dans l'hypothalamus de hamster (Huang et al., 1998). Enfin, la prolifération cellulaire dans l'hypothalamus de rat est stimulée lorsque la température ambiante passe de 24°C à 32°C durant une période courte (6 jours) ou une période plus longue (53 jours) (Matsuzaki et al., 2009), suggérant un rôle de ce processus dans l'acclimatation. En ce qui concerne les facteurs endogènes, diverses molécules sont connues pour stimuler la prolifération hypothalamique comme le BDNF (Pencea et al., 2001), le CNTF (Kokoeva et al., 2005), ou encore l'IGF-1 (Fernandez and Torres-Alemán, 2012). La prolifération hypothalamique semble donc être un phénomène modulable et important pour l'adaptation aux différentes variations endogènes et exogènes subies par un individu.

5-4 Neurogenèse hypothalamique et homéostasie énergétique

L'hypothalamus étant une des zones du cerveau régulant la prise alimentaire, il était légitime de se demander si la neurogenèse hypothalamique pouvait jouer un rôle sur l'équilibre énergétique. Dans leur étude de 2005, Kokoeva et al. ont injecté du CNTF (ciliary neurotrophic factor) chroniquement dans le cerveau de souris adultes nourries pendant 2 mois avec un régime gras (**Figure 21**). Sept jours de traitement CNTF provoquent une perte de poids des animaux, et cette perte de poids demeure pendant au moins 15 jours après l'arrêt du traitement. La longue persistance de l'effet post-traitement du CNTF

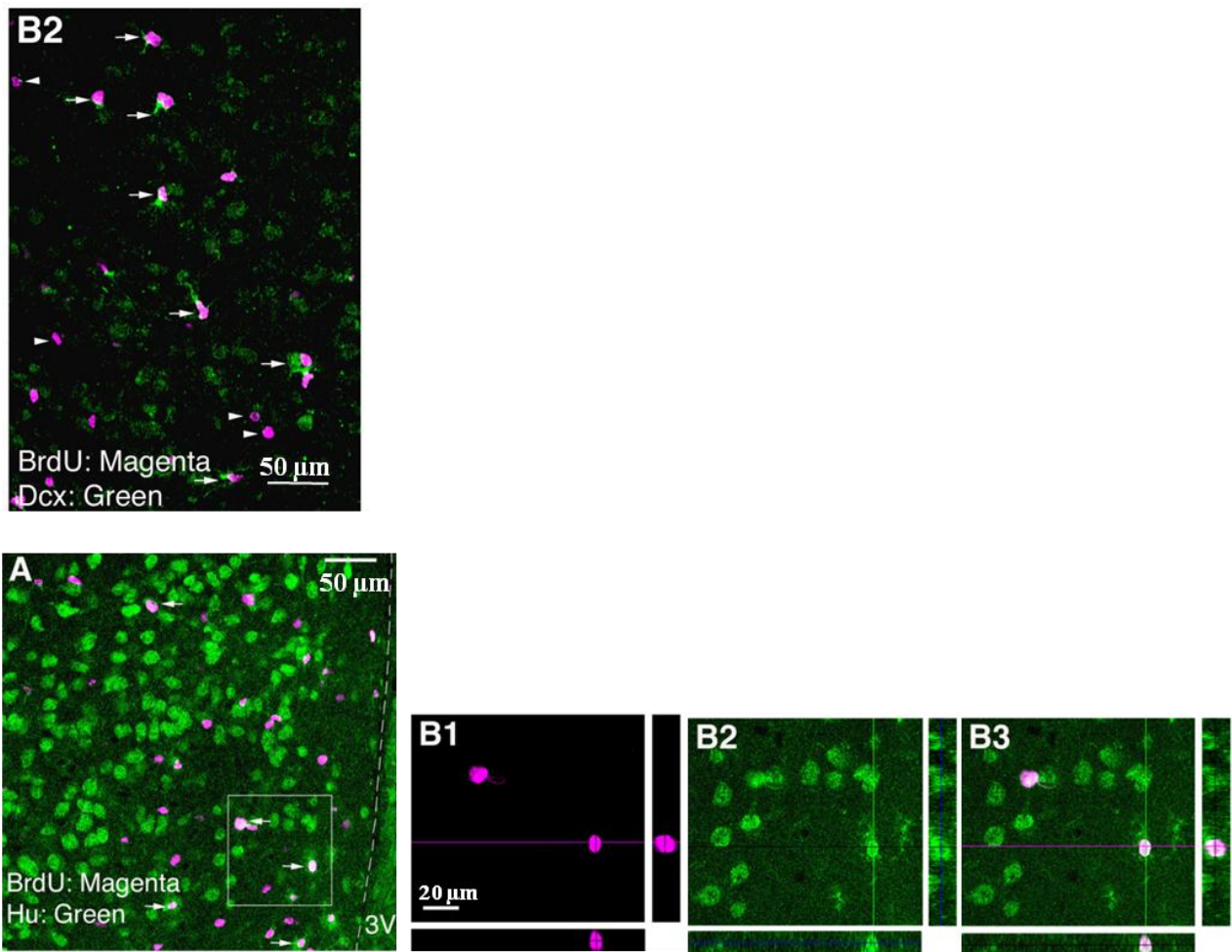


Figure 22: Expression de marqueurs neuronaux précoces ou tardifs dans les cellules néoformées, dans l'hypothalamus adulte.

(B2 panel du haut) Double marquage BrdU/Dcx dans le parenchyme hypothalamique. (A panel du bas) Double marquage BrdU/Hu dans le parenchyme hypothalamique. (B1, 2 et 3 panel du bas) Détail du marquage de deux cellules. Marquage BrdU seul (B1), Hu seul (B2) et merge (B3).

Selon Kokoeva et al., 2007.

suggère que le CNTF déclenche la mise en place d'un phénomène durable dans l'hypothalamus de ces souris. Il s'avère que sous CNTF, l'hypothalamus des souris HFD présente une augmentation significative du nombre de cellules BrdU+. Ces cellules se différencient en neurones majoritairement (42.7%), mais également en oligodendrocytes dans une plus petite proportion (22.9%). Les neurones engendrés par le CNTF expriment POMC et NPY et sont sensibles à la leptine. Ils sont matures et fonctionnels après 42 jours de traitement. Après blocage de cette prolifération via l'injection intracérébroventriculaire de l'anti-mitotique araC (arabinoside cytosine), les souris prennent beaucoup de poids. Cette étude a donc démontré pour la première fois qu'il existait un lien entre neurogenèse et régulation de l'homéostasie énergétique, et dans ce cas précis, la neurogenèse hypothalamique stimulée sous CNTF chez l'adulte joue un rôle bénéfique sur le maintien de la balance énergétique, et plus précisément un rôle anorexigène. Dans l'hypothalamus, une large proportion des neurones POMC et NPY nés pendant l'embryogenèse vont disparaître par apoptose à l'âge adulte (4 semaines d'âges) et vont être remplacés par de nouveaux neurones pendant les 8 semaines suivantes (McNay et al., 2012). Les nouvelles cellules néoformées se différencient majoritairement en neurones exprimant des marqueurs transitoires comme DCX puis des marqueurs de neurones matures comme Hu ou TuJ1 (**Figure 22**). Une faible proportion des cellules néoformées se différencient en cellules gliales (Kokoeva et al., 2007). Les nouveaux neurones vont maturer et exprimer des neuropeptides comme NPY ou POMC (McNay et al., 2012). De plus, certains de ces neurones expriment p-STAT3 suite à une injection intrapéritonéale de leptine, indiquant que les cellules néoformées de l'hypothalamus sont capables de répondre spécifiquement aux stimulations hormonales (Kokoeva et al., 2005).

En 2008, Chang et al. ont observé l'effet de l'exposition à un régime HFD à court terme pendant la gestation et l'allaitement chez la rate. Le régime gras a été donné à la mère soit pendant le stade embryonnaire E6 jusqu'à la naissance, au pendant le stade post-

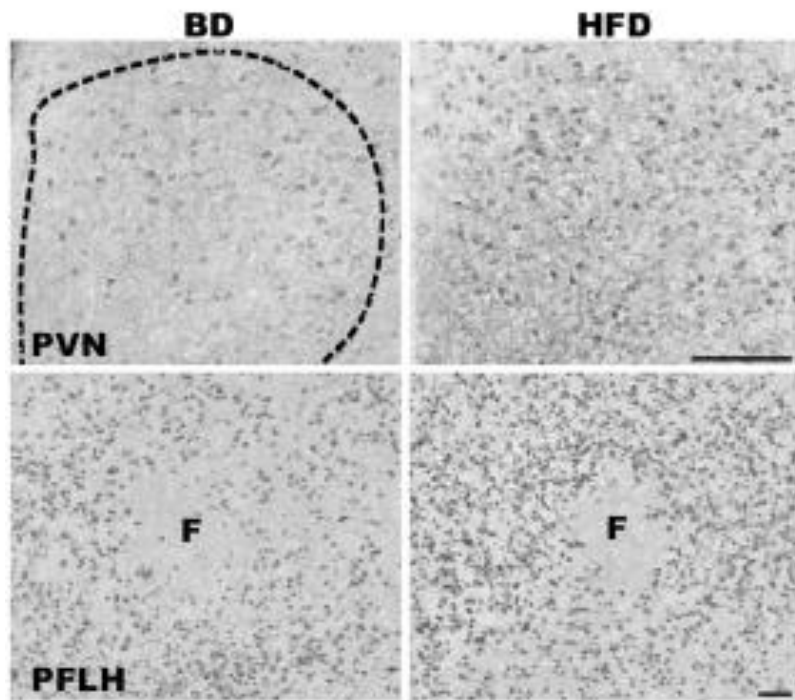


Figure 23: Effet d'un régime gras donné à une mère gestante sur la neurogenèse hypothalamique de la progéniture.

(Panel de gauche) Cellules BrdU+ dans le PVN (en haut) et le PFLH (en bas) d'un rat à P0 dont la mère a été nourrit avec de la nourriture STD (BD). (Panel de droite) Cellules BrdU+ dans le PVN (en haut) et le PFLH (en bas) d'un rat à P0 dont la mère a été nourrit avec de la nourriture HFD.

Selon Chang et al., 2008.

natal de P1 à P15, donc pendant 2 semaines en tout. Dès la naissance (P0) ces jeunes rats présentent une augmentation de la prolifération cellulaire uniquement dans deux noyaux hypothalamiques que sont le PVN et le PFLH (hypothalamus latéral périfornical) (**Figure 23**). Les nouveaux neurones générés dans ces conditions mûrissent et expriment des peptides connus pour stimuler la prise alimentaire qui sont la galanine, l'enképhaline et la dynorphine pour le PVN, l'orexine et la MCH (melanin concentrating hormone) pour le PFLH. Cette augmentation du nombre de neurones orexigènes dans ces deux noyaux hypothalamiques est directement corrélée avec une augmentation de la prise alimentaire et du poids de ces animaux à l'âge adulte. L'alimentation joue donc un rôle déterminant sur la neurogenèse hypothalamique dans un cerveau en développement.

D'autres études menées directement chez l'adulte ont montré qu'un régime gras d'un mois provoquait une augmentation du nombre de nouveaux neurones marqués au BrdU dans l'éminence médiane pendant les 8 premiers jours de régime. La suppression de 85% de ces neurones néoformés à l'aide de rayons-x chez ces souris entraîne un gain de poids moins important que pour les souris contrôles, suggérant que dans ces conditions, les nouveaux neurones de ces zones précises, favorisent la mise en réserve de l'excès d'énergie ingérée (Lee et al., 2012).

Chez des souris adultes sensibles au régime gras (dites DIO, âgées de 16 semaines, nourries à partir de leur 8^{ème} semaine sous HFD), le nombre de nouvelles cellules dans l'ARC baisse de moitié par rapport aux souris STD, mais la proportion de cellules BrdU+ exprimant le marqueur neuronal Hu est la même que pour les souris contrôles (**Figure 24**) (Mcnay et al., 2012). De plus, chez ces souris le régime gras inhibe la différenciation des cellules souches et induit une diminution de la survie des cellules progénitrices. Par conséquent, le régime empêche la mort cellulaire normale des anciens neurones et inhibe la génération de nouvelles cellules. Ce qui suggère que le renouvellement cellulaire ne se

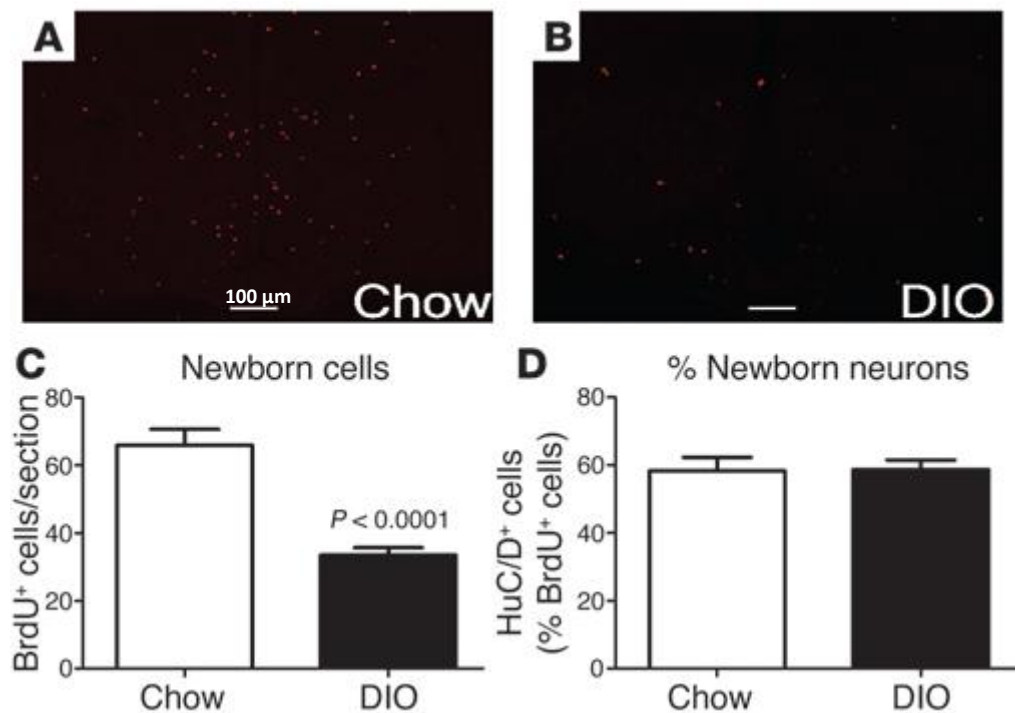


Figure 24: Effet d'un régime gras à long terme sur la neurogenèse dans l'ARC.

(A) Cellules BrdU+ révélées 4 semaines après une injection chronique d'une semaine, chez des souris âgées de 16 semaines et nourrit sous régime STD dès leur 8^{ème} semaine post-natale. (B) Cellules BrdU+ révélées 4 semaines après une injection chronique d'une semaine, chez des souris âgées de 16 semaines et nourrit sous régime HFD dès leur 8^{ème} semaine post-natale. (C) Nombre de cellules néoformées par section. (D) Pourcentage de cellules BrdU+ exprimant également le marqueur neuronal HuC/D.

Selon McNay et al., 2012.

fait plus après une longue période de régime gras. Toutefois, ce phénomène est stoppé et le phénotype est rétabli par une courte restriction calorique, mettant en évidence la rapidité du phénomène plastique dans l'hypothalamus. Contrairement au traitement CNTF, un régime HFD semble perturber la neurogenèse hypothalamique chez le jeune comme chez l'adulte. De manière générale, ces perturbations observées semblent avoir un effet délétère sur l'homéostasie.

Enfin, il a aussi été démontré que le renouvellement basal des neurones AgRP dans l'hypothalamus adulte était nécessaire pour le maintien de l'homéostasie énergétique (Pierce and Xu, 2010).

Problématique

L'obésité est une pathologie en constante progression dans les pays industrialisés. Cette maladie s'accompagne généralement par d'autres symptômes ou pathologies graves comme le diabète de type II, l'hypercholestérolémie, l'hyperglycémie, ou la dyslipidémie qui ensemble définissent le syndrome métabolique. Ces pathologies altèrent les conditions de vie et écourtent la vie des patients atteints. Aujourd'hui, la lutte contre l'obésité est devenue une priorité des autorités de santé publique. Cette maladie est associée à une consommation excessive de calories qui peut-être combinée à un manque d'exercice. Depuis une dizaine d'année, les recommandations nutritionnelles n'ont pas favorisé une alimentation plus saine des consommateurs. Il convient désormais de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques, et pour cela il est nécessaire de comprendre les mécanismes de mise en place de cette pathologie. Il est possible de tester les pouvoirs anti-obésité de nouveaux médicaments sur des modèles expérimentaux. Il est également possible d'étudier les phases asymptomatiques de ces pathologies, avant même que le tableau clinique soit établi, en identifiant les altérations moléculaires ou cellulaires déclenchées précocément si possible causal. Dans notre étude, c'est cette étude des phases asymptomatiques qui a été privilégiée.

Objectif

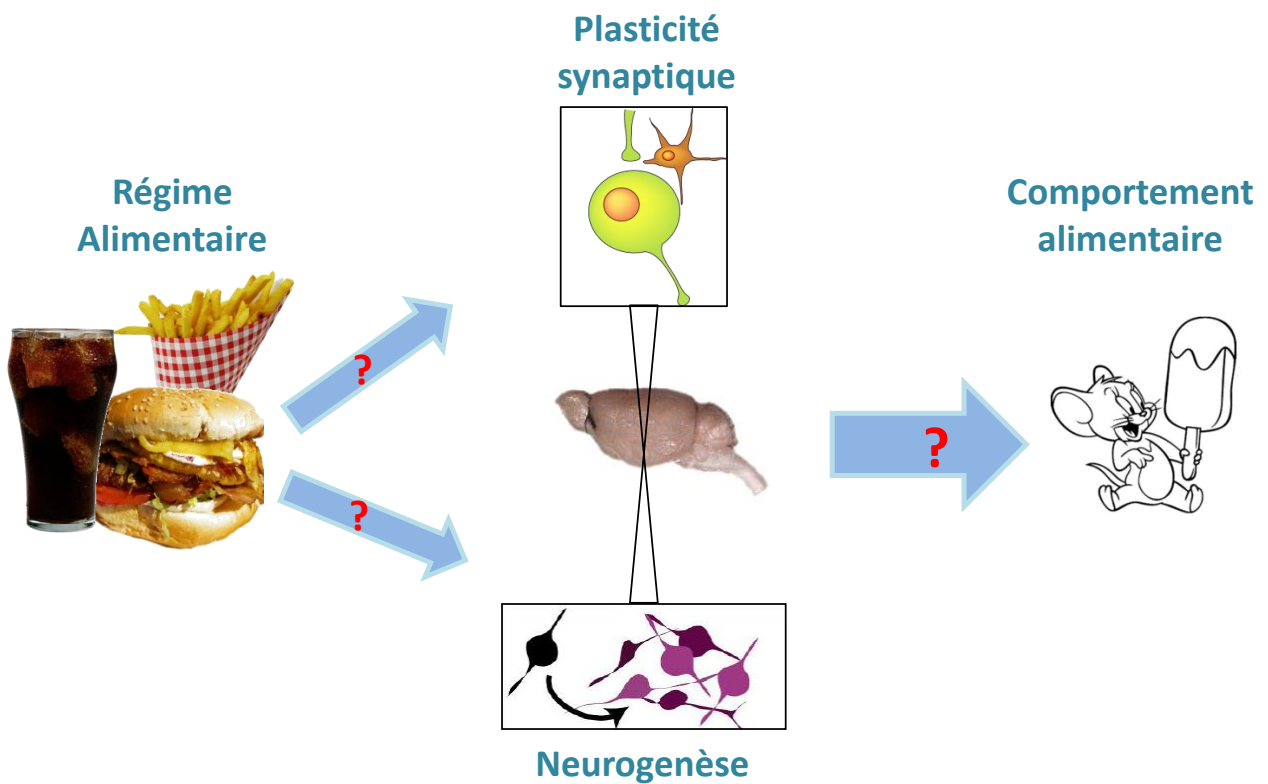


Figure 25: Objectif

Le type de régime alimentaire peut-il très rapidement modifier la plasticité synaptique et le neurogenèse hypothalamique chez l'adulte, et les modifications observées ont-elles un impact sur le comportement alimentaire ?

L'homéostasie énergétique est un mécanisme finement régulé par le système nerveux central. Une des structures cérébrales contrôlant cet équilibre est l'hypothalamus. Dans cette structure, des réorganisations cellulaires interviennent fréquemment en réponse notamment à des fluctuations hormonales. Depuis peu, les scientifiques s'intéressent à l'implication de la plasticité hypothalamique dans la régulation de l'homéostasie énergétique chez l'adulte. L'objectif principal de ce travail était de savoir si des processus de plasticité interviennent dans la régulation de la prise alimentaire en conditions physiologiques (**Figure 25**). Il existe plusieurs formes de plasticité hypothalamique, et dans ce travail nous avons étudié deux processus en particulier: la plasticité synaptique et la plasticité cellulaire conduisant à la formation de nouveaux neurones, la neurogenèse.

Stratégie

La première étape était de mettre en place un modèle de réponse homéostatique chez le rongeur. Suite à cela il fallait cribler les processus de plasticité impliqués lors de cette réponse en combinant des approches moléculaires, cellulaires et fonctionnelles. Une fois les phénomènes plastiques identifiés, il s'agissait de bloquer ces processus et d'analyser la réponse comportementale suite à ce blocage. Enfin, nous avons essayé de comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents à ces processus.

Le premier chapitre de ce manuscrit sera donc consacré à la mise en place du modèle. Nous avons choisi la souris comme modèle animal, car cette espèce donne accès à des outils génétiques (souris transgéniques, souris KO) qui se sont avérés utiles pour notre étude. Les souris utilisées étaient des souris mâles, ce qui nous a permis de nous affranchir des changements hormonaux, et âgées de 8 semaines afin qu'elles soient adultes et que l'on puisse éviter la plasticité liée au développement du système nerveux. Pour obtenir une réponse homéostatique chez ces animaux, deux expériences sont possibles : une mise à jeun suivie d'une réalimentation. Ceci permet d'en observer les effets du retour à une prise alimentaire normale. L'autre alternative est d'introduire un régime gras et d'observer l'effet sur la prise alimentaire. Nous avons choisi cette solution et donné aux souris un régime HFD dont la composition se rapproche d'une alimentation humaine type « cafétéria » ou « fast-food ». Les étapes de validation de ce régime consistaient à vérifier si, soutenue dans le temps, cette alimentation provoquait bien des pathologies métaboliques, puis de mesurer les effets à court terme de ce régime sur différents paramètres métaboliques, bien avant que les pathologies soient mises en place, et de déterminer un temps d'expérience correspondant au moment où une régulation homéostatique semble se mettre en place.

L'étape suivante consistait en l'étude des événements plastiques intervenant lors de la période précédemment déterminée. Le deuxième chapitre de ce manuscrit sera donc consacré au premier axe de la problématique, c'est-à-dire l'étude de la plasticité

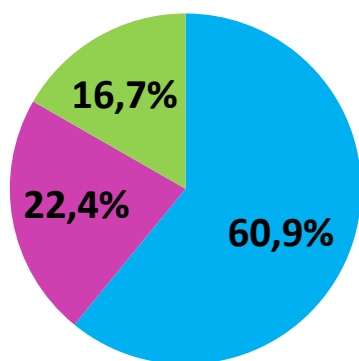
synaptique, étude qui a donné lieu à un article que je signe en 3^{ème} auteur. Pour cet objectif, il s'agissait de cribler plusieurs facteurs permissifs connus pour être présents lors de phénomènes de plasticité. Après avoir sélectionné un marqueur particulièrement intéressant, PSA-NCAM, nous l'avons bloqué et avons regardé l'effet sur une série de paramètres métaboliques. Le but était de comprendre le rôle de cette molécule sur la plasticité synaptique hypothalamique et son rôle dans l'homéostasie énergétique.

Enfin, le dernier chapitre traite du second et principal axe de ma thèse : la neurogenèse, qui donne lieu à un article soumis que je signe en premier nom. Pour cette étude nous avons évalué l'effet du régime HFD sur la prolifération cellulaire hypothalamique et identifié les cellules prolifératives. Le blocage de ces cellules nous a permis de connaître leur rôle sur le contrôle de l'homéostasie énergétique. Et enfin nous avons laissé les cellules se différencier et devenir matures afin d'identifier le phénotype d'une partie de ces nouvelles cellules.

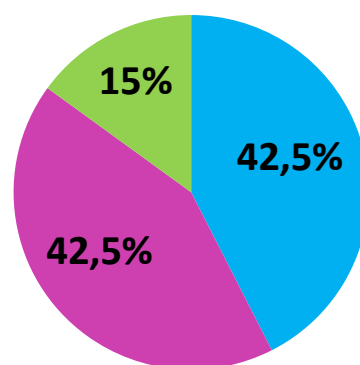
Chapitre 1:

Mise en place du modèle expérimental

Régime Standard



Régime Gras



- Glucides
- Lipides
- Protéines

Figure 26: Composition de la nourriture STD et de la nourriture HFD utilisé pour les expérimentations.

Ma thèse avait pour but de savoir si des mécanismes plastiques hypothalamiques chez l'individu adulte sont mis en œuvre très précocement lors d'une réponse homéostatique à un régime gras. La première chose à faire était donc de provoquer cette réponse homéostatique chez un modèle animal.

1- Méthodologie

1-1 Effets du régime HFD à long terme

Nous devons établir un modèle de souris adultes nourries avec un régime gras hyperlipidique hypercalorique. Un régime HFD a donc été fabriqué à façon afin que sa composition se rapproche le plus possible d'un régime dit « de cafétéria » (**Figure 26**). Ce type de régime est connu pour provoquer des défauts métaboliques à long terme. Nous avons donc voulu confirmer que c'était bien le cas chez nos souris dans le but de valider notre régime. Pour ce faire, ce régime a été donné à des souris C57Bl6/j âgées de 8 semaines (adultes) pendant une période de 3 mois. Les prises alimentaires de ces souris et leurs poids ont été mesurés régulièrement pendant cette période afin d'observer les éventuels troubles du comportement alimentaire, et le développement de l'obésité. A la fin de cette période, afin de constater les défauts métaboliques provoqués par le régime HFD, les souris ont été scannées par echoMRI dans le but de mesurer leurs masses grasses et leurs masses maigre. Une augmentation spécifique de la masse grasse est corrélée avec le développement de l'obésité. A la fin des 3 mois, un tableau clinique des souris a été dressé. La glycémie des souris a été mesurée grâce à des bandelettes et lecteurs glycémiques pour d'évaluer le développement du diabète de type II dans ce modèle. Le sang total fut ensuite prélevé et le taux de triglycérides, d'acides gras libre et de cholestérol (HDL et LDL) ont été mesurés par dosage colorimétrique afin de savoir si les

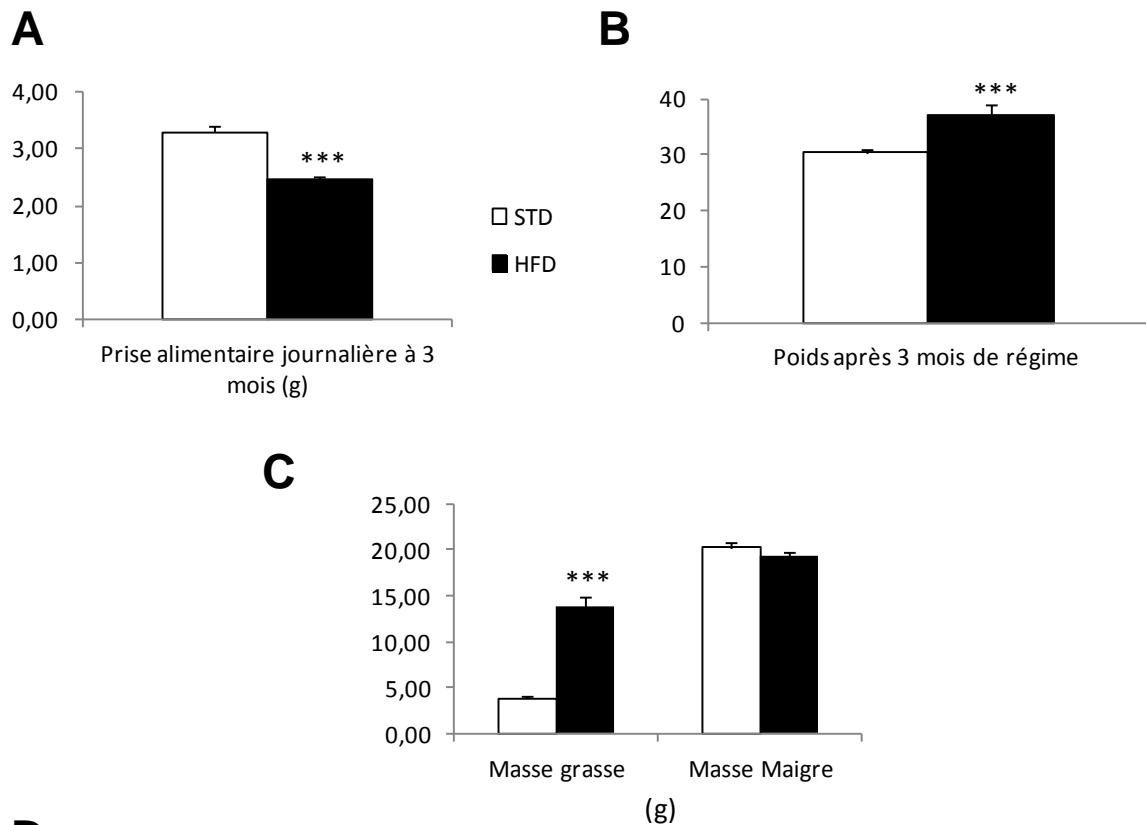


Figure 27: Effet du régime gras à long terme.

(A) Prises alimentaires moyennes quotidiennes pendant 3 mois de régime STD vs HFD. (B) Poids moyens des souris après 3 mois de régime STD vs HFD. (C) Evaluation par echoMRI du poids de la masse grasse et de la masse maigre des souris après 3 mois de régime STD ou HFD. (D) Dosage sanguin après 3 mois de régime STD ou HFD du glucose, des triglycérides, des HDL, des LDL et des acides gras libres. Les valeurs sont exprimées en mmol/L. *** $p \geq 0.001$; $n=11$ pour les STD et $n=13$ pour les HFD.

souris présentaient une dyslipidémie et une hypercholestérolémie. Tous les paramètres mesurés ont permis de savoir si après trois mois de régime gras les souris sont atteintes du syndrome métabolique.

1-2 Effets du régime à court terme

La deuxième étape était de caractériser la réponse homéostatique déclenchée par le régime HFD, et ce avant la mise en place de pathologies. Nous avons donc utilisé la même souche de souris C57Bl6/j âgées de 8 semaines auxquelles le régime HFD a été donné pendant une semaine. Pendant cette période, la prise alimentaire des souris a été suivie quotidiennement afin de suivre la réponse homéostatique. Pour connaître l'état métabolique des animaux, le poids total et le poids des tissus adipeux profonds et sous cutané ont été également suivis tout le long de l'expérience. A plusieurs temps : J1, J3 et J8, un tableau clinique des souris a été dressé. Les acides gras libres et les triglycérides sanguins ont été mesurés par dosage colorimétrique afin de détecter une éventuelle dyslipidémie. Un test de tolérance au glucose et la mesure de sécrétion d'insuline ont été réalisés afin de savoir si les souris présentaient des signes de diabète de type II. Le quotient respiratoire a été mesuré par calorimétrie indirecte, les échanges ainsi mesurés ont permis de connaître la nature des substrats utilisés (glucide ou lipide) par l'animal. La masse grasse totale ainsi que la masse des tissus adipeux blancs sous cutanés et viscéraux ont été mesurés pour détecter d'éventuels signes de développement d'obésité.

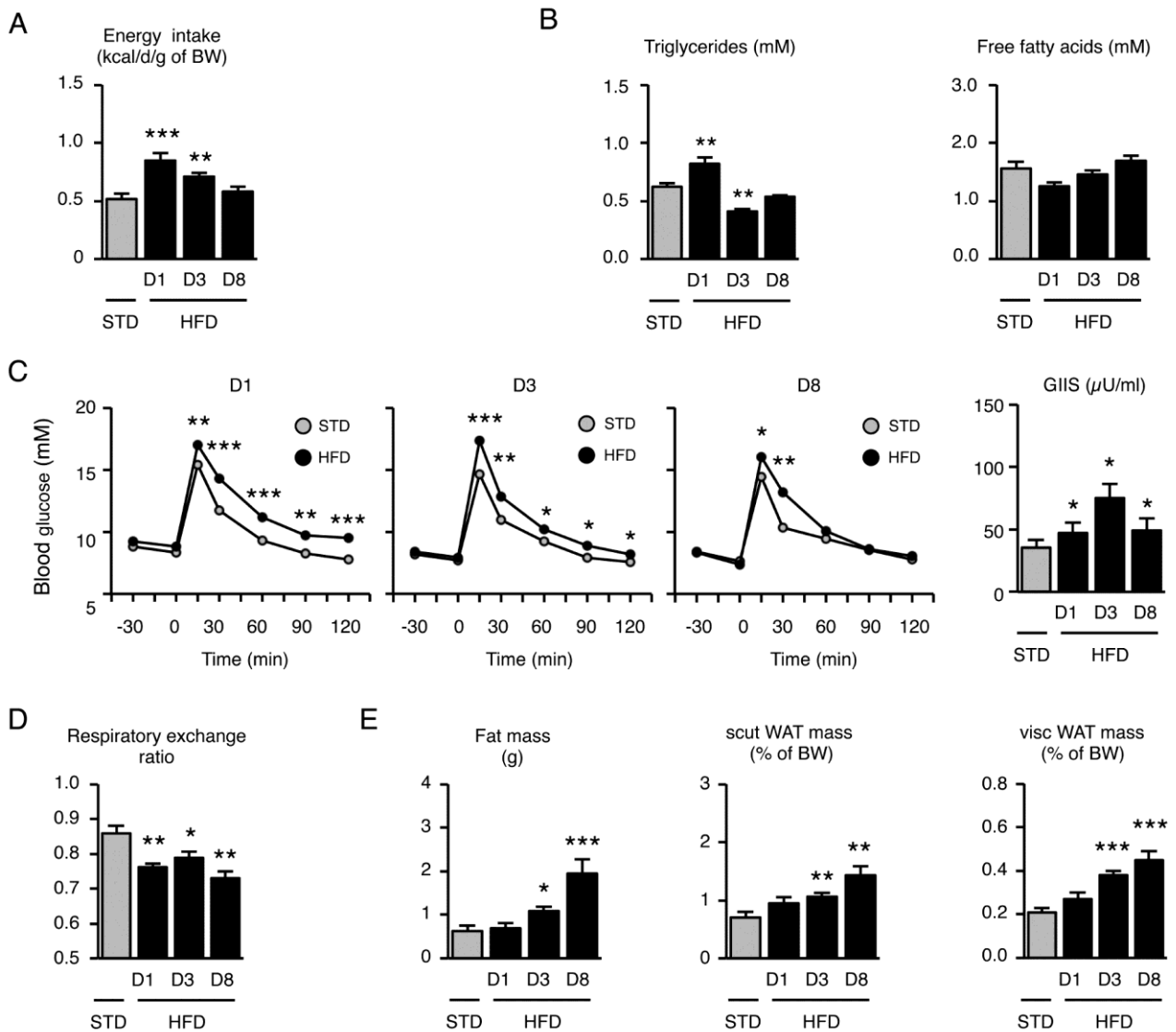


Figure 28: Effets du régime gras à court terme.

(A) Prise alimentaire (B) Triglycérides plasmatiques et niveaux d'acide gras libres (C) Test de tolérance au glucose et sécrétion d'insuline gluco-induite (D) Quotient respiratoire (ratio) (E) Adiposité mesuré par echoMRI et pourcentage de tissus adipeux blancs sous-cutané et viscéral en fonction du poids total. Toutes les mesures ont été faites chez les souris STD vs 1, 3 ou 8 jours sous régime HFD. Les astérisques indiquent les différences significatives entre les groupes.

Selon Benani et al., 2012.

2- Résultats

2-1 Le régime HFD provoque des défauts métaboliques importants à long terme

Les souris adultes placées sous régime gras présentent à 3 mois de graves défauts métaboliques. Elles sont en surpoids (STD 30.31 ± 0.74 g vs HFD 37.21 ± 1.79 g) (**Figure 27B**) malgré une prise alimentaire significativement plus basse que celle des souris sous régime STD (STD 3.25 ± 0.1 g/jour vs HFD 2.38 ± 0.18 g/jour) (**Figure 27A**). Ce surpoids se traduit par une augmentation très importante de leurs masses grasses sous régime HFD (STD 3.89 ± 0.27 g vs HFD 13.78 ± 1.2 g) (**Figure 27C**), et une augmentation de la glycémie à jeun et du taux de cholestérol total (**Figure 27D**).

2-2 Le régime HFD provoque des défauts métaboliques rapides et transitoires à court terme

Le régime HFD *ad libitum* chez la souris adulte provoque une augmentation rapide de la prise alimentaire (0.85 ± 0.06 kcal/jour/g à J1 vs 0.52 ± 0.05 kcal/jour/g chez les souris STD) (**Figure 28A**). Cette augmentation est transitoire et une prise alimentaire normale, semblable à celle des souris STD, est rétablie en 8 jours malgré une alimentation HFD permanente. Le régime provoque très rapidement des déficiences métaboliques comme une augmentation des triglycérides plasmatiques et une importante intolérance au glucose (**Figure 28B et C**), et comme pour la prise alimentaire ces défauts sont rétablis au bout de 8 jours. Enfin, on peut voir que le régime gras cause un déplacement d'utilisation des substrats énergétiques des glucides vers les lipides à tous les temps testés (**Figure 28D**). L'augmentation de l'adiposité commence à partir du 3^{ème} jour de régime HFD et perdure à J8, que cela soit pour le tissu adipeux blanc superficiel (sous-cutané) ou

pour le tissu adipeux blanc profond (viscéral) (**Figure 28E**). Ces deux derniers paramètres suggèrent que sous HFD, les lipides apportés en surplus par l'alimentation vont être utilisés en priorité par rapport aux autres nutriments, et le reste de lipides non-utilisés va être correctement stocké dans les tissus adipeux blancs. La conclusion principale suite au phénotypage de ce modèle est que la souris adulte adapte rapidement son comportement alimentaire et son métabolisme en condition nutritionnelle hypercalorique. Ce modèle peut donc être utilisé pour étudier le contrôle homéostatique en réponse à un excès de graisse dans l'alimentation.

3- Conclusions

La mise en place du modèle était une étape essentielle pour répondre à notre problématique sur la plasticité hypothalamique à court terme chez l'adulte. Nous avons donc choisis des souris adultes (8 semaines) que nous avons placées sous un régime HFD ayant une composition en nutriments proches de la nourriture « de cafétéria » que l'on peut trouver dans les pays industrialisés. La première étape était de savoir si ce régime provoquait à long terme des défauts métaboliques similaires à ceux observés chez l'Homme. Après trois mois, les souris présentent un surpoids traduisant un début d'obésité. L'augmentation de la glycémie à jeun est importante et suggère la mise en place d'un diabète de type II. L'hypercholestérolémie associée à ces autres problèmes, montrent que les souris HFD développent ou sont en voie de développer un syndrome métabolique, Le régime utilisé est bien obésogène et provoque des défauts métaboliques graves, ce qui fait de lui un outil indispensable pour la suite de l'étude.

Une fois le régime sélectionné, il fallait évaluer les effets de ce régime à très court terme. Le régime HFD provoque une réponse homéostatique rapide qui se traduit par une

hyperphagie très rapide qui diminue dès J3 et disparaît complètement à J8. Le régime entraîne également des défauts métaboliques rapides (dès le premier jour), mais ces défauts disparaissent après 1 semaine. Seuls les masses grasses et les quotients respiratoires restent différents après 1 semaine de régime. Ces résultats suggèrent que le régime HFD provoque des défauts rapides de prise alimentaire et de métabolisme. Après cette journée une régulation semble se mettre en place, permettant à l'individu de diminuer ses apports et de retrouver un équilibre énergétique dès le huitième jour. Malgré cela, le poids des tissus adipeux augmente progressivement, et ce phénomène semble durer sur le long terme et provoquer les problèmes que l'on peut observer chez les souris sous régime pendant 3 mois. Néanmoins la régulation observée dès les premiers jours semble être essentielle pour le maintien de l'homéostasie énergétique. Nous avons donc choisi ce laps de temps, cette première semaine, pour mener nos investigations et ainsi comprendre les modifications centrales impliquées dans la mise en place de ces régulations.

Chapitre 2:

Effet d'un régime gras sur la plasticité synaptique hypothalamique

Le 1^{er} axe de ce travail était d'explorer les éventuels phénomènes de plasticité synaptique intervenant lors de la réponse homéostatique à un régime gras, et si ces éventuelles modulations participaient à la régulation de l'homéostasie énergétique.

1- Méthodologie

1-1 Marqueurs de plasticité

La première étape de ce travail était de savoir si les facteurs permissifs connus pour participer à la plasticité synaptique étaient exprimés dans notre modèle. Grâce aux données bibliographiques nous avons ciblé quatre familles de gènes impliqués dans le remodelage du cytosquelette, les modifications des interactions cellulaires, la synaptogenèse et le remodelage matriciel. L'expression de ces gènes a été mesurée sur ARN tissulaire grâce à une technique de carte microfluidique à trois temps clés de la réponse homéostatique : J1, J3 et J8 et dans trois noyaux hypothalamiques: l'ARC, le PVN et le LH.

1-2 Expression de PSA-NCAM

Après avoir criblé les différents facteurs modulés lors de la réponse homéostatique dans notre modèle, nous avons focalisé nos recherches sur l'expression d'une protéine d'adhésion: NCAM, qui entre en interaction avec PSA (polysialic acid) lors de phénomènes plastiques afin de modifier les interactions cellule/cellule. Nous avons donc déterminé l'expression de PSA-NCAM par immunohistochimie avec un anticorps primaire dirigé contre PSA. Ces expériences ont été réalisées dans le noyau arqué, à J1, J3,

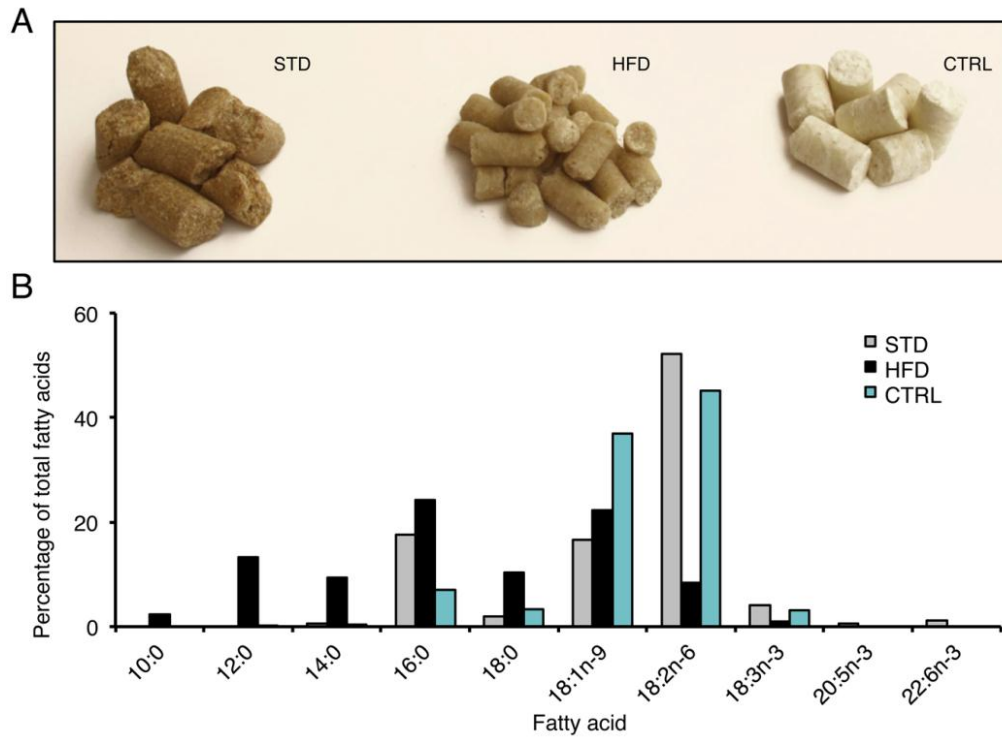


Figure 29: Types de régimes utilisés pour cette étude.

(A) De gauche à droite : Régime STD, HFD et CTRL. (B) Composition en acide gras de chaque régime en pourcentage du taux d'acides gras total.

Selon Benani et al., 2012.

J8 sous HFD ou STD et les intensités de marquage ont été comparées par rapport aux souris STD.

1-3 Implication de l'effet de nouveauté

La réponse homéostatique et les phénomènes de plasticité qui l'entraînent ou qu'elle entraîne pourraient être dus à l'effet de nouveauté du régime et non à sa composition. Pour vérifier cela, des souris ont été placées sous un régime contrôle (CTRL) (**Figure 29**), isocalorique par rapport au régime STD, pendant une journée. Une autre série de souris a été placée sous HFD pendant 1 journée, puis 6 jours de STD et encore une fois 1 journée de HFD. Le but de cette manipulation était de voir que le régime gras provoquait bien la même réponse homéostatique et les mêmes phénomènes plastiques et ce même si les souris y avaient déjà été soumises une première fois. Pour vérifier l'effet sur la plasticité, des immunohistochimies anti-PSA ont été réalisées dans tous les groupes.

1-4 Remodelage synaptique des neurones POMC sous régime HFD

Le régime provoque une réponse homéostatique rapide et un retour à la normale de la prise alimentaire est observé dès J3. Pour savoir si la plasticité synaptique observée concernait les neurones impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, nous avons focalisé nos expériences sur la population de neurones anorexigènes hypothalamique : les neurones POMC. Pour savoir si le régime gras pouvait affecter les synapses stimulatrices ou inhibitrices sur ces neurones, les fréquences des courants post-synaptiques spontanés et miniatures excitateurs et inhibiteurs ont été enregistrés sur les neurones de souris

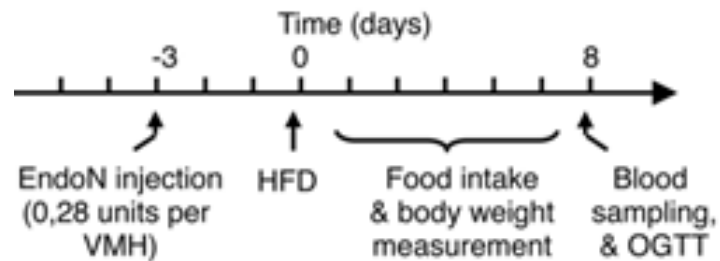


Figure 30: Protocole d'infusion de l'enzyme endoN.

L'endoN est injecté en une fois dans le parenchyme du VMN en bilatéral à J-3, puis à J0 le régime gras est donné aux souris jusqu'à J8. Pendant le régime, la prise alimentaire et le poids des animaux sont mesurés quotidiennement, et à la fin de l'expérience un test de tolérance au glucose (OGTT) et des prélèvements sanguins sont réalisés.

Selon Benani et al., 2012.

transgéniques GFP-POMC par électrophysiologie. Le corps cellulaire des POMC se situant dans l'ARC, les mesures ont été faites dans ce noyau chez des souris HFD vs STD après trois jours de régime.

1-5 Implication de PSA-NCAM dans le remodelage synaptique hypothalamique

Afin de connaître l'implication de PSA-NCAM dans le remodelage synaptique hypothalamique et dans la régulation de l'homéostasie énergétique, des injections bilatérales de l'enzyme Endoneuraminidase N (endoN), qui enlève spécifiquement les résidus PSA des isoformes NCAM, ont été réalisées selon le protocole décrit **Figure 30**. Pour connaître les altérations éventuelles sur la réponse homéostatique chez ces souris, la prise alimentaire et le poids des souris ont été suivis pendant 8 jours sous régime HFD. A la fin de l'expérience les souris ont subi un test de tolérance au glucose afin de savoir si le traitement endoN provoquait un développement précoce de diabète. Dans un autre groupe sous endoN les fréquences des courants pré-synaptiques spontanés et miniatures excitateurs et inhibiteurs ont été enregistrées sur les neurones GFP-POMC de l'ARC des souris HFD vs STD après trois jours de régime.

Pour approfondir le rôle de PSA dans la régulation de l'homéostasie énergétique et comprendre les mécanismes sous-jacents permettant la plasticité synaptique, la réponse homéostatique au HFD a été évaluée chez des souris KO pour Pst-1 (*St8sia4^{-/-}*), l'enzyme Pst-1 étant une polysialyl transferase responsable de l'addition de PSA sur NCAM. Chez ces souris, des immunohistochimies contre PSA ont été réalisées afin de contrôler l'absence d'expression de cette protéine chez ces souris. La prise alimentaire a été

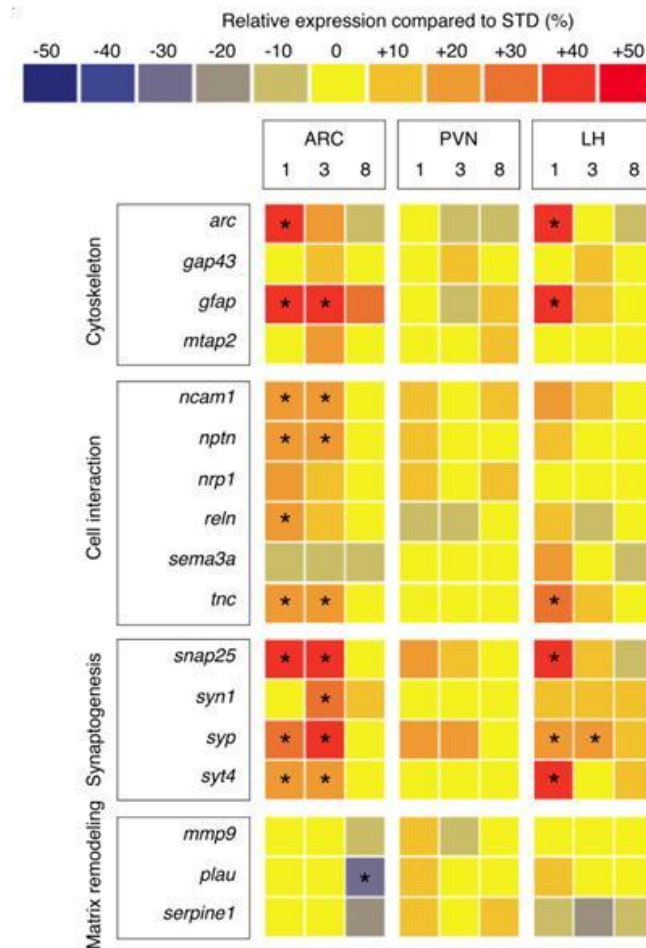


Figure 31: Le régime HFD provoque des changements d'expression de marqueurs de plasticité.

Quantification simultanée de l'expression de gènes impliqués lors de remodelage plastique dans l'ARC, le VMN et le PVN, à 1, 3 ou 8 jours après changement de régime. Les couleurs représentent des baisses ou des augmentations d'expressions en pourcentage par rapport aux valeurs des souris STD.

Selon Benani et al., 2012.

mesurée quotidiennement, toujours pour évaluer la réponse homéostatique et ainsi connaître le rôle de cette enzyme dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

2- Résultats

2-1 Signature moléculaire de plasticité suite au régime HFD

Afin d'évaluer de manière globale l'effet du régime HFD sur la plasticité, l'expression relative de certains facteurs permettant la plasticité a été mesurée dans 3 noyaux hypothalamiques: l'ARC, le VMN et le PVN (**Figure 31**). De manière générale, on observe un effet du régime surtout dans l'ARC, et principalement à J1 et J3. La surexpression de *ncam1*, *nrp1*, *tnc*, *snap25*, *syp* et *syt4* pendant ces 3 premiers jours suggèrent que le régime gras provoque des modifications d'interactions cellulaires et une induction de synaptogenèse. En revanche, l'expression de *gap43*, *serpine1*, *nmp9* ou *plau* ne sont pas affectées, suggérant qu'il n'y a pas de changement au niveau du bourgeonnement axonal. Il semble donc que le régime gras provoque rapidement et transitoirement des changements plastiques dans l'hypothalamus et plus particulièrement dans l'ARC.

2-2 Le régime gras provoque une rapide surexpression de PSA-NCAM dans l'ARC

Après avoir établi une « carte » des gènes de plasticité impliqués lors d'un changement de régime alimentaire, nous nous sommes aperçus que le régime provoquait des modulations de l'expression de plusieurs facteurs impliqués dans différents phénomènes de plasticité. Nous avons également pu voir que ces phénomènes plastiques

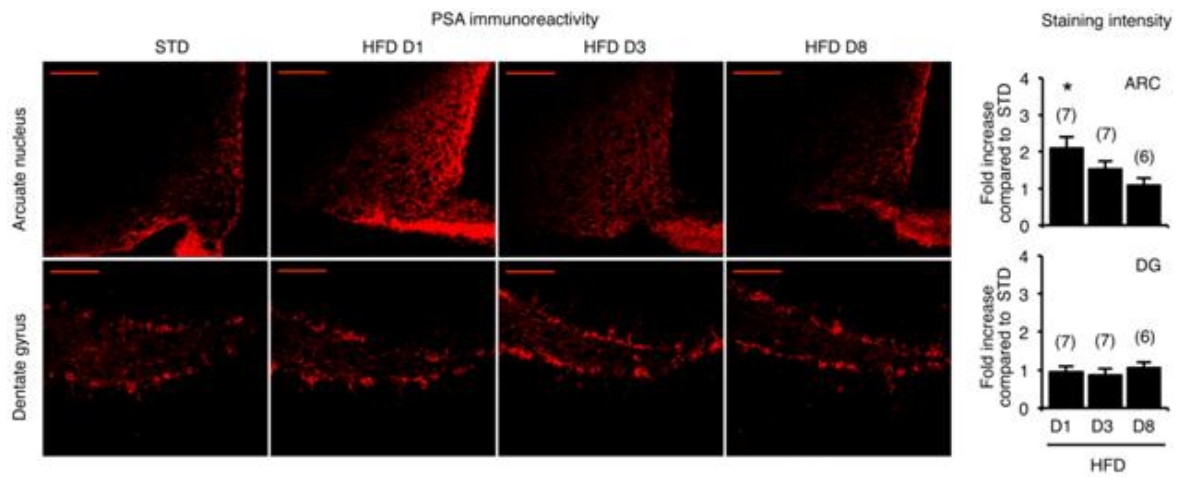


Figure 32: Expression de PSA-NCAM

Images représentatives des immunohistochimies anti PSA-NCAM dans l'ARC (panel du haut) et le DG (panel du bas) des souris STD et HFD J1, J3 ou J8. L'intensité du marquage (par rapport aux STD) a été mesurée dans les 2 zones étudiées. Les astérisques indiquent les différences significatives entre les groupes.

Selon Benani et al., 2012.

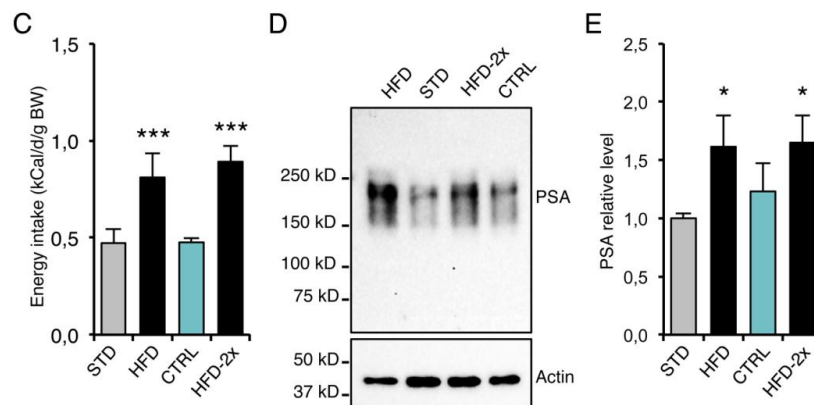


Figure 33: Effet de la nouveauté sur l'expression de PSA.

(C) Prise alimentaire des souris STD, HFD et CTRL à J1, et des souris ayant reçu une journée de HFD puis 6 jours de régime STD et enfin une journée de HFD (prise alimentaire sur cette dernière journée de HFD). (D et E) Expression de PSA dans les 4 groupes, western blot (D) et valeurs relatives (E) par rapport au groupe STD.

Selon Benani et al., 2012.

sont localisés dans l'ARC et le LH, et ont lieu à J1 et J3. L'expression du gène *ncam1* est stimulée dans l'ARC à J1 et J3. Nous nous sommes particulièrement intéressés à ce gène car il est connu dans la littérature que la protéine NCAM peut être modifiée post-traductionnellement par PSA (polysialic acid), ce qui peut conduire à un remaniement des interactions cellule/cellule. Nous nous sommes donc intéressés à PSA-NCAM. Les immunohistochimies contre PSA montrent une très nette surexpression (x 2) de cette protéine à J1 dans l'ARC, alors que le régime n'a aucun effet sur l'expression de PSA-NCAM dans l'hippocampe (**Figure 32**). A J3 et J8, l'expression de PSA revient à un niveau équivalent à celui des souris STD.

2-3 La nouveauté de régime n'est pas suffisante pour induire PSA dans l'ARC

Les résultats obtenus sur l'expression de PSA dans l'ARC montrent que le changement de régime alimentaire vers un régime HFD provoque une surexpression de PSA à J1. Mais on peut se demander si l'effet observé est dû au régime gras lui-même, ou simplement au changement d'alimentation, quelque soit le régime. Pour répondre à cette question, nous avons donné un régime CTRL isocalorique et isolipidique par rapport au régime STD aux mêmes souris adultes. Lorsque l'on regarde la prise alimentaire des 4 groupes de souris à J1 : STD, HFD, CTRL et HFD X2 (souris ayant reçu 1 journée de HFD puis 6 jours de STD et enfin une journée de HFD), on s'aperçoit que le groupe STD et CTRL ont une prise alimentaire similaire contrairement au deux groupes HFD qui ont une prise alimentaire bien plus élevée (**Figure 33C**). L'expression de PSA n'est d'ailleurs stimulée que chez les 2 groupes HFD (**Figure 33D et E**). Le fait que le groupe CTRL ne

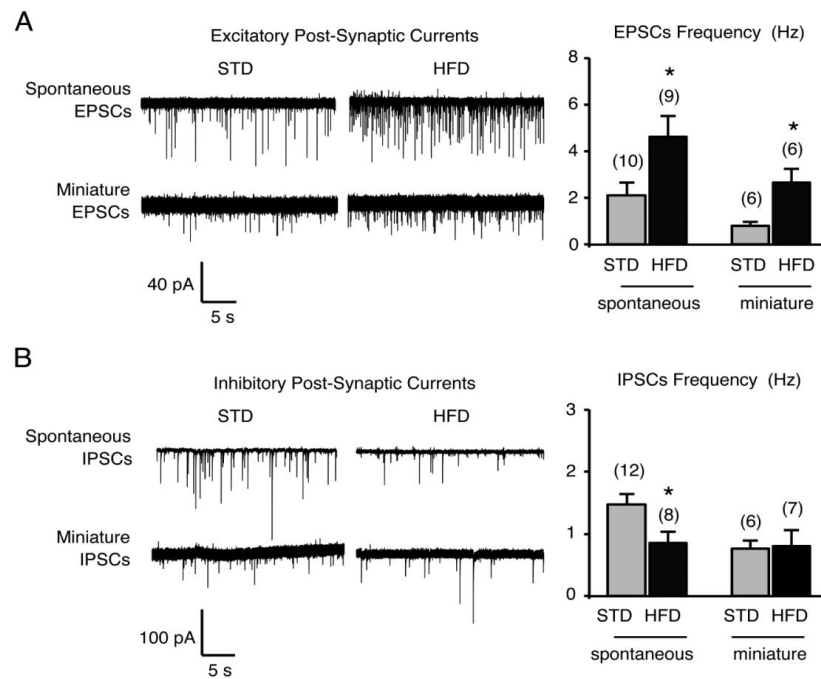


Figure 34: Effet du régime gras sur les connexions synaptiques des neurones POMC de l'ARC.

Courants post-synaptiques excitateurs (A) et inhibiteurs (B) sur les neurones GFP-POMC de l'ARC des souris sous régime STD ou HFD pendant 3 jours. Configuration voltage-clamp cellule entière. EPSCs = Courants post-synaptiques excitateurs ; IPSCs = Courants post-synaptiques inhibiteurs.

Selon Benani et al., 2012.

soit pas hyperphagique et ne montre pas d'augmentation d'expression de PSA alors que c'est le cas pour le groupe HFD X2 malgré le fait que le régime ne soit plus nouveau pour lui prouve que le changement de régime ne suffit pas à provoquer les changements d'expression de PSA, et donc ces changements sont bien dus au régime HFD.

2-4 Trois jours de régime HFD provoque un recablage des neurones POMC de l'ARC

Afin de savoir si le régime gras a un effet sur les afférences pré-synaptiques sur les neurones anorexigène POMC, les fréquences des courants post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs sur ces neurones ont été mesurés par électrophysiologie chez des souris STD et HFD au troisième jour de régime (**Figure 34**). On observe une augmentation des courants post-synaptiques excitateurs, spontanés (EPSCs) et miniatures (EPSCm), des neurones POMC des souris sous HFD. L'augmentation de la fréquence des courants spontanés montre une augmentation de la stimulation pré-synaptique sur les neurones POMC, et l'augmentation de la fréquence des courants miniatures suggèrent une augmentation du nombre de synapses excitatrices sur les neurones POMC. Les fréquences des courants post-synaptiques inhibiteurs (IPSCs) spontanés diminuent significativement sous HFD, alors que les miniatures (IPSCm) ne sont pas significativement différents sous HFD par rapport au groupe STD. Ceci suggère qu'il y a une baisse de l'inhibition sur les neurones POMC sous HFD, et que cette baisse n'est pas due à une baisse du nombre de synapses inhibitrices sur les neurones POMC.

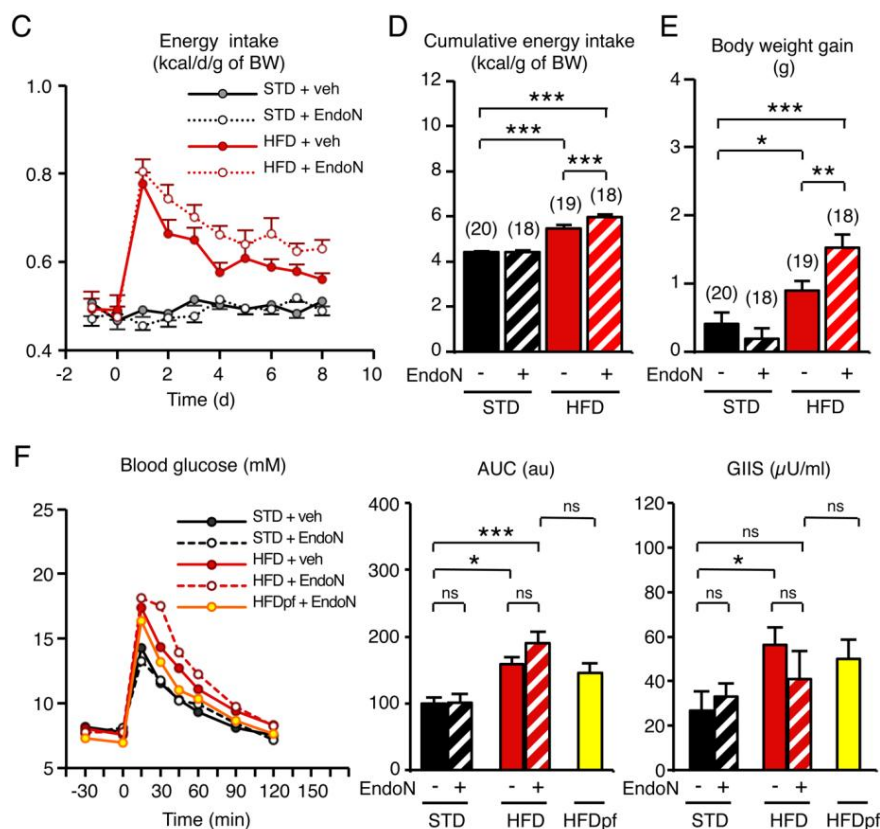


Figure 35: Effets de l'endoN sur la régulation de l'homéostasie énergétique.

(C) Prises alimentaires suivies quotidiennement chez les 4 groupes de souris : STD+veh ; STD+endoN ; HFD+veh ; HFD+endoN. (D) Prises alimentaires cumulées des 4 groupes de souris à la fin de la période de mise sous régime (J8). (E) Gain de poids des 4 groupes de souris en fin d'expérience (J8). (F) Test de tolérance au glucose (OGTT) chez les 4 groupes de souris. Les souris reçoivent un bolus de glucose au temps 0 et la glycémie est suivie jusqu'à 2H après l'injection. AUC = aires sous la courbe, GIIS = glucose-induced insulin secretion.

Selon Benani et al., 2012.

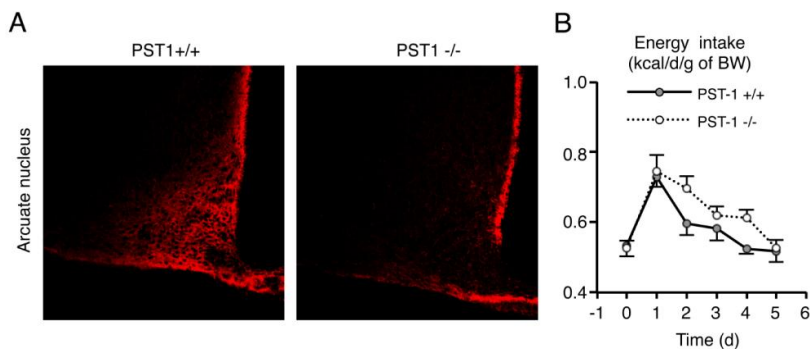


Figure 36: Effet du régime HFD sur la prise alimentaire des souris PST-1^{-/-}.

(A) Immunohistochimies contre PSA dans l'ARC des souris wt vs PST-1 KO nourrit avec le régime HFD pendant 1 journée. (B) Prise alimentaire de ces souris suivie pendant 5 jours sous régime HFD.

Selon Benani et al., 2012.

2-5 PSA est requis pour le remodelage synaptique et la réponse homéostatique au régime HFD

Pour connaître le rôle de PSA, l'enzyme endoN, qui retire spécifiquement les résidus PSA des isoformes NCAM, a été injecté dans le parenchyme hypothalamique. L'endoN inhibe complètement l'augmentation de fréquences des EPSCs et EPSCm chez les souris HFD après 3 jours de régime. Ceci suggère que la polysialylation de NCAM par PSA est un phénomène essentiel pour le remodelage synaptique induit par le régime HFD sur les neurones POMC.

Le traitement endoN entraîne une **(Figure 35C et D)** augmentation de la prise alimentaire et du poids des souris HFD, suggérant que PSA est essentiel pour le maintien de l'homéostasie énergétique. L'homéostasie glucidique, elle, ne dépend pas de PSA puisque le traitement endoN provoque une légère augmentation de l'intolérance au glucose sous HFD, mais cette augmentation n'est pas significative. Cet effet est sûrement dû à l'augmentation d'ingestion de gras provoquée par le traitement endoN car les valeurs de tolérances sont similaires entre les animaux HFD+endoN et les animaux HFD pair-fed **(Figure 35F)**.

Pour aller plus loin dans le rôle de PSA dans la régulation de l'homéostasie énergétique, nous avons testé la réponse physiologique au régime gras chez les souris PST-1 KO. Ces souris ne possèdent pas l'enzyme ST8SiaIV ou PST-1 qui est une polysialyl-transferase responsable de l'addition de PSA sur NCAM. Les immunohistochimies contre PSA chez ces souris ne montrent d'ailleurs aucun marquage spécifique dans l'ARC après une journée de régime HFD **(Figure 36A)**. La prise alimentaire de ces souris sous HFD est identique à celle des souris wt à J1, mais le retour à une prise alimentaire normale prend une journée de plus chez les souris PST-1^{-/-} **(Figure**

36B). Ces résultats suggèrent que l'enzyme PST-1 joue un rôle dans l'adaptation comportementale suite au régime HFD.

3- Conclusions

Cette étude a permis d'établir un modèle d'adaptation rapide face à une nouvelle condition nutritionnelle. Dès le changement de régime, les souris présentent des défauts métaboliques importants comme une hyperphagie, une hypertriglycéridémie, et une intolérance au glucose. En revanche, ces défauts sont transitoires, et dès 8 jours un phénotype normal est rétabli. Dès lors, on pouvait penser que l'hypothalamus de ces souris subissait des modifications ayant pour but d'assurer la réponse homéostatique visant à rétablir un équilibre métabolique. Pour conforter cette idée, nous avons démontré que le changement d'alimentation déclenche une surexpression de plusieurs familles de gènes impliqués dans la plasticité synaptique. Parmi les différents gènes impliqués nous nous sommes intéressés particulièrement à *ncam*. La polysialisation de la protéine NCAM par PSA est un événement connu pour moduler les interactions cellulaires. Ici, nous avons vu qu'une seule journée de régime gras provoque une forte surexpression de PSA dans l'ARC hypothalamique, et que cette surexpression est liée à une augmentation de la stimulation et une baisse de l'inhibition des neurones POMC, l'augmentation de la stimulation étant due en partie à une augmentation du nombre de synapse excitatrices sur les neurones POMC. Cette stimulation des neurones POMC pourrait expliquer en partie la régulation de la prise alimentaire observée après les premiers jours de régime gras. Le blocage de PSA entraîne d'ailleurs une absence de remaniement des connexions synaptiques sur POMC et également une absence de régulation de la prise alimentaire. Ce phénomène est très spécifique à la prise alimentaire et au poids de l'animal puisque les

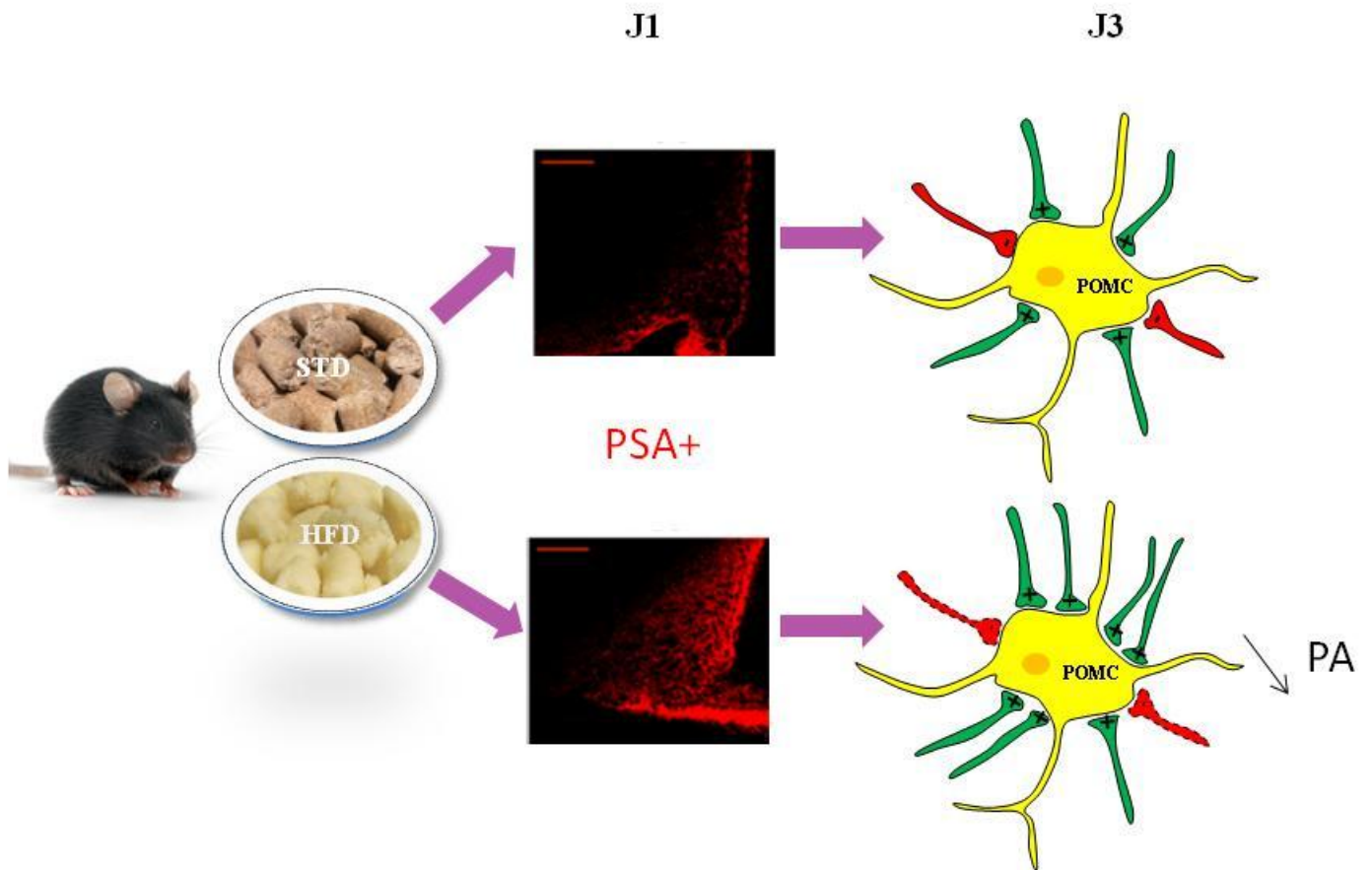


Figure 37: Effet rapide du régime HFD sur la plasticité synaptique hypothalamique chez la souris adulte.

STD = régime standard ; HFD = régime HFD ; PSA+ = le marquage immunohistochimique PSA positif apparaît en rouge ; POMC = neurones à pro-opiomélanocortines, PA = prise alimentaire ; J1 et J3 = premier et troisième jour sous le régime correspondant ; les afférences excitatrices apparaissent en vert et les inhibitrices en rouge.

défauts d'homéostasie glucidique observés après une à trois journées de régime HFD sont indépendants de l'expression de PSA. Grâce à cette étude, nous avons mis en évidence le fait que le régime gras chez l'individu adulte provoque des défauts rapides de l'homéostasie énergétique, mais que très vite il y a rétablissement de l'équilibre. Ce rétablissement est dû en partie au moins à un remaniement rapide des connexions synaptiques sur les neurones POMC de l'ARC. Nous avons vu également que ce remaniement nécessite préalablement une augmentation de l'expression de PSA, qui, grâce à son association avec la protéine d'adhésion NCAM, semble permettre une mobilité des cellules et des reconnections synaptiques (**Figure 37**).

Food Intake Adaptation to Dietary Fat Involves PSA-Dependent Rewiring of the Arcuate Melanocortin System in Mice

Alexandre Benani,¹ Cécile Hryhorczuk,² Alexandra Gouazé,¹ Xavier Fioramonti,¹ Xavier Brenachot,¹ Christophe Guissard,² Alice Krezymon,¹ Thibaut Duparc,³ André Colom,³ Emmanuelle Nédélec,¹ Caroline Rigault,¹ Aleth Lemoine,¹ Jean Gascuel,¹ Rita Gerardy-Schahn,⁴ Philippe Valet,³ Claude Knauf,³ Anne Lorsignol,² and Luc Pénicaud¹

¹Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Unité Mixte de Recherche 6265-CNRS, 1324-INRA, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France,

²STROMAlab; Unité Mixte de Recherche CNRS-Université Paul Sabatier 5273, EFS, U1031 INSERM, BP 84225 31432 Toulouse Cedex 4, France, ³Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Unité de Recherche 1048 INSERM, F-31432 Toulouse Cedex 4, France, and ⁴Institute for Cellular Chemistry, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany

Hormones such as leptin and ghrelin can rapidly rewire hypothalamic feeding circuits when injected into rodent brains. These experimental manipulations suggest that the hypothalamus might reorganize continually in adulthood to integrate the metabolic status of the whole body. In this study, we examined whether hypothalamic plasticity occurs in naive animals according to their nutritional conditions. For this purpose, we fed mice with a short-term high-fat diet (HFD) and assessed brain remodeling through its molecular and functional signature. We found that HFD for 3 d rewired the hypothalamic arcuate nucleus, increasing the anorexigenic tone due to activated pro-opiomelanocortin (POMC) neurons. We identified the polysialic acid molecule (PSA) as a mediator of the diet-induced rewiring of arcuate POMC. Moreover, local pharmacological inhibition and genetic disruption of the PSA signaling limits the behavioral and metabolic adaptation to HFD, as treated mice failed to normalize energy intake and showed increased body weight gain after the HFD challenge. Altogether, these findings reveal the existence of physiological hypothalamic rewiring involved in the homeostatic response to dietary fat. Furthermore, defects in the hypothalamic plasticity-driven adaptive response to HFD are obesogenic and could be involved in the development of metabolic diseases.

Introduction

Some specific brain areas remain “plastic” in adulthood, meaning that they can undergo functional or morphological remodeling. The hypothalamus, which ensures coordination of both endocrine and autonomic functions, and thus long-term stability of the inner milieu, can also undergo remodeling. A wide range of conditions have been shown to induce hypothalamic plasticity, including external sensory stimulations such as variations in the photoperiod or ambient temperature, and individual physiological fluctuations such as during dehydration, lactation and the ovarian cycle (Oliet, 2002; Prevot, 2002; Ebling and Barrett,

2008). In addition, hypothalamic plasticity appears to be a widely conserved process found in frogs, birds, rodents, and primates.

The involvement of hypothalamic plasticity in the control of whole-body energy homeostasis emerged as a new concept in 2004 (Pinto et al., 2004). This process seems to be essential and its impairment could contribute to obesity. In laboratory animals, rapid rewiring of the hypothalamus can be achieved by using various experimental procedures, including fasting and hormone treatments with exogenous hormones such as leptin and ghrelin (Pinto et al., 2004; Sternson et al., 2005; Andrews et al., 2008; Yang et al., 2011). Such manipulations produce marked changes in feeding behavior, which are probably triggered, at least in part, by the stimulated hormone-dependent reorganization of synapses in specific hypothalamic neurons (Pinto et al., 2004; Sternson et al., 2005; Andrews et al., 2008; Yang et al., 2011). Nevertheless, whether hypothalamic plasticity could play a role in the regulation of food intake in naive animals according to changes in their nutritional conditions is still unknown. To address this issue, we explored hypothalamic plasticity in adult mice fed a high-fat diet (HFD) for 1 week.

Materials and Methods

Animals. Protocols that included the manipulation of animals were reviewed by our local ethics board and were in strict accordance with European Community guidelines (directive 86/906). Experiments were

Received Jan. 27, 2012; revised July 4, 2012; accepted July 10, 2012.

Author contributions: A.B., A. Lorsignol, and L.P. designed research; A.B., C.H., A.G., X.F., X.B., C.G., A.K., T.D., A.C., E.N., C.R., and C.K. performed research; A. Lemoine and J.G. contributed unpublished reagents/analytic tools; A.B., X.F., R.G.-S., P.V., C.K., A. Lorsignol, and L.P. analyzed data; A.B., X.F., and L.P. wrote the paper.

This work was funded by CNRS, Institut National de la Recherche Agronomique, Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-PNRA-004 to L.P.), the Burgundy county (FABER-2009-9201-AA0036500635 to L.P. and A.B.), the Association Française d'Etudes et de Recherches sur l'Obésité (to A.B.), and the Institut B. Delessert (to A.B.). We thank Jeffrey M. Friedman for providing POMC-GFP mice; Sylvian Bauer, Hervé Guillou, and Anne Taupignon for fruitful discussions; Xavier Blanc for providing the isocaloric control diet; Lionel Bretilon and Stéphane Grégoire for HPLC analysis of fat content of diets; Christine Fourreau, Xavier Sudre, and Anne Lefranc for their technical assistance; and the Toulouse RIO Imaging facility for help with confocal imaging.

Correspondence should be addressed to Luc Pénicaud, CSGA, 9E Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France. E-mail: luc.penicaud@u-bourgogne.fr.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0624-12.2012

Copyright © 2012 the authors 0270-6474/12/3211970-10\$15.00/0

Table 1. Characteristics of diets indicating energy composition, centesimal composition, and biochemical analysis of lipid content

	Centesimal composition (%)			Energy content (%)	
	STD	HFD		STD	HFD
Crude protein	16	20	Caloric density (kcal/g)	2.9	4.4
Crude oil	3.1	21.8	Calories from carbohydrate	60.9	42.5
Crude fiber	3.9	3	Calories from fat	22.4	42.5
Starch	45.8	28	Calories from protein	16.7	15
Sugar	3	19			
Minerals and vitamins	5.5	8			

performed with 2-month-old male C57BL/6J Ola mice from Harlan Laboratories. The mice were housed individually, and fed a standard pelletized commercial chow diet (A04; Safe) for 1 week after arrival. After acclimatization, they were fed either the same standard diet (STD) or a customized highly palatable high-fat diet (Safe). The characteristics of the diets are given in Table 1. The change of diet was made at 9:00 A.M. and both the standard and high-fat diet were renewed daily at 9:00 A.M. The mice had *ad libitum* access to food and water. Food consumption and body weight (BW) were measured daily. For metabolic studies by indirect calorimetry, the mice were housed in individual air-tight cages and gas exchanges were monitored using an air analyzer system (Oxylet; BIOSEB). For tissue collection, the mice were killed between 9:30 A.M. and 12:00 P.M. Some experiments used 8- to 10-week-old male transgenic homozygous knockout PST-1 mice. These mice had been generated by using targeted mutations in the ST8SialV gene (Eckhardt et al., 2000).

Bilateral injection into the hypothalamus. The mice were placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments) under anesthesia with 0.5–2% isoflurane constant gas inhalation (Forene; Abbott Laboratories). After dermal disinfection with Vetadine solution (Vetoquinol), the skin and cranial muscles were incised and the skull was exposed. A small hole was drilled and a needle was inserted to target each ventromedial hypothalamus nuclei successively using the following coordinates: –1.5 mm posterior to the bregma, ± 0.4 mm lateral to the sagittal suture, and –5.6 mm below the skull surface. Endoneuraminidase N (EndoN; Ab-Cys) or artificial CSF (aCSF; Tocris Bioscience) was injected through a 34 ga blunt needle mounted on a 10 μ l syringe (NanoFil device from WPI) controlled by a micropump (UMP2 from WPI). A volume of 400 nl per side of both solutions was delivered into the brain parenchyma at rate of 100 nl/min. EndoN-treated mice received 0.28 U per side. After injection, the needle was maintained for a further 3 min to avoid back leakage. Finally, the skin was sutured using cyanoacrylate glue. After surgery, the animals were kept under controlled temperature and rehydrated with intraperitoneal injections of physiological fluid. The mice were then housed individually and were allowed 3 d for recovery before the experiment, i.e., before the diet change.

Hypothalamus dissection for qPCR analysis. Once the mice had been killed, their brains were quickly removed and immersed for 10 min in 2 ml of ice-cold preservative medium (200 mM sucrose, 28 mM NaHCO₃, 2.5 mM KCl, 7 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM CaCl₂, 1 mM L-ascorbate, and 8 mM D-glucose, pH 7.4) complemented with 10% RNAlater (Ambion). After incubation, the brains were mounted on a specimen plate using cyanoacrylate adhesive. The brains were then sliced using a vibratory microtome in a bath containing the chilled preservative medium with RNAlater. Five 500- μ m-thick serial coronal sections per brain were selected with the assistance of a mouse brain atlas, approximately from –3.0 to –0.5 to bregma. The slices were individually placed onto dishes containing 500 μ l of RNAlater. For the microdissection of the hypothalamus nuclei, each slice was placed on a 6% agarose bloc, covered with 50 μ l of RNAlater, and dissected under stereomicroscope and cold-light illumination, using a scalpel and sharp forceps. The arcuate nucleus (ARC), lateral hypothalamus area, and paraventricular nucleus were collected from two or three specific slices of the five, depending on their anteroposterior anatomical position. During the dissection, the harvested samples were placed on ice in 2 ml centrifuge tubes containing 50 μ l of RNAlater. After removal of the RNAlater, the samples were finally stored at –80°C.

RNA extraction and processing. The tissues were lysed and homogenized in 300 μ l of lysis buffer (RLT Buffer, Qiagen) using the TissueLyser system (Qiagen) and 5 mm stainless steel beads (Qiagen). Total RNA was isolated on spin columns with silica-based membranes (RNeasy Mini Kit, Qiagen), following the manufacturer's instructions. DNA digestion was done directly on the columns. RNA was eluted with 30 μ l of H₂O. Aliquots of each extract (1 μ l) were checked for RNA concentration, purity and integrity with the Experion electrophoresis system (Bio-Rad) and the Experion RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad). Total RNAs were then stored at –80°C. A small amount of purified RNAs (0.2 μ g) was reverse-transcribed in 20 μ l of mixture using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Qiagen), as indicated by the manufacturer. Synthesized cDNA were then stored at –20°C.

qPCR analysis by TaqMan low-density array. The low-density array (LDA) is a 384-well micro-fluidic card on which 384 simultaneous real-time PCRs can be performed (Applied Biosystems). Each custom card was configured as 8-sample loading lines containing 48 reaction chambers. Gene-specific exon-spanning primers and TaqMan probes were factory-designed and embedded in each well. Analysis of one hypothalamic sample consisted in loading 100 μ l of reaction mixture into one port of the LDA. The mixture comprised 15 μ l of synthesized cDNA (corresponding to 150 ng of RNA), 50 μ l of TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), and 35 μ l of water. After loading, the LDA was sealed and centrifuged twice for 2 min at 280 \times g. The LDA was placed in the 384-well block module of a thermal cycler (model 7900HT Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems). The PCR conditions were 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Raw fluorescence data were collected through the PCR using the SDS 2.3 software (Applied Biosystems), which further generated threshold cycles Ct with automatic determination of both baseline and threshold. After SDS software-assisted filtering of assays to discriminate aberrant PCR runs, the assays per hypothalamic area were: $n = 9$ –12 for STD, $n = 6$ –7 for HFD D1 (day 1), $n = 6$ –7 for HFD D3, and $n = 5$ –6 for HFD D8. The data were then analyzed with RQ Manager 1.2 software (Applied Biosystems) for relative quantitation. Relative quantification of gene expression (RQ) was based on the comparative Ct method using the equation $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct$ for one gene target was its own Ct variation subtracted from a calibrator sample and normalized with an endogenous control. Precisely, *polr2a* was defined as the endogenous control after analysis of the most stable housekeeping gene using geNorm freeware, and one STD sample was arbitrarily chosen as a calibrator. Graphic representation of results was manually designed to assign one color for a 10% increment of gene expression relative to the STD group. Significant variation was noted with an asterisk.

Immunohistochemistry. The mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine mix and then perfused intracardially with 4% paraformaldehyde solution. The brains were removed, postfixed at 4°C overnight, cryoprotected with 30% sucrose for 2 d at 4°C, frozen in isopentane at –60°C, and finally stored at –80°C until use. The hypothalamus was cut into 30 μ m serial sections with a cryostat (Leica). Five sections of the 15–18 harvested sections containing the arcuate nucleus were treated for immunohistochemistry. The sections were first blocked for 3–4 h and then incubated overnight at 4°C with anti-PSA (polysialic acid molecule) antibody (1:6000, #AbC0019, EuroBio). After washing, the sections were then incubated in Alexa546-conjugated goat anti-mouse IgM (Invitrogen, 1:400) for 2 h at room temperature. After further washes, the sections were finally held with mounting medium and a coverslip.

Image acquisition and analysis. For densitometric analysis, immunolabeled sections were viewed on a confocal microscope (Leica SP2) under the 40 \times oil-immersion objective. Images of an immunostaining run (one animal of each condition: STD, HFD 1 d, HFD 3 d, HFD 8 d) were acquired with the same parameters (561 nm laser power, gain and offset of the photomultiplier). By using ImageJ software, the intensity of PSA labeling per section was bilaterally quantified on a selected area corresponding to the arcuate nucleus. Labeling intensity was measured on 5 sections per animal. The dentate gyrus was chosen as the control area. For the large-field study, sections were observed using an upright light microscope Axio Imager 2 (Zeiss) equipped with a motorized stage. Entire brain sections were scanned automatically under the 40 \times objective.

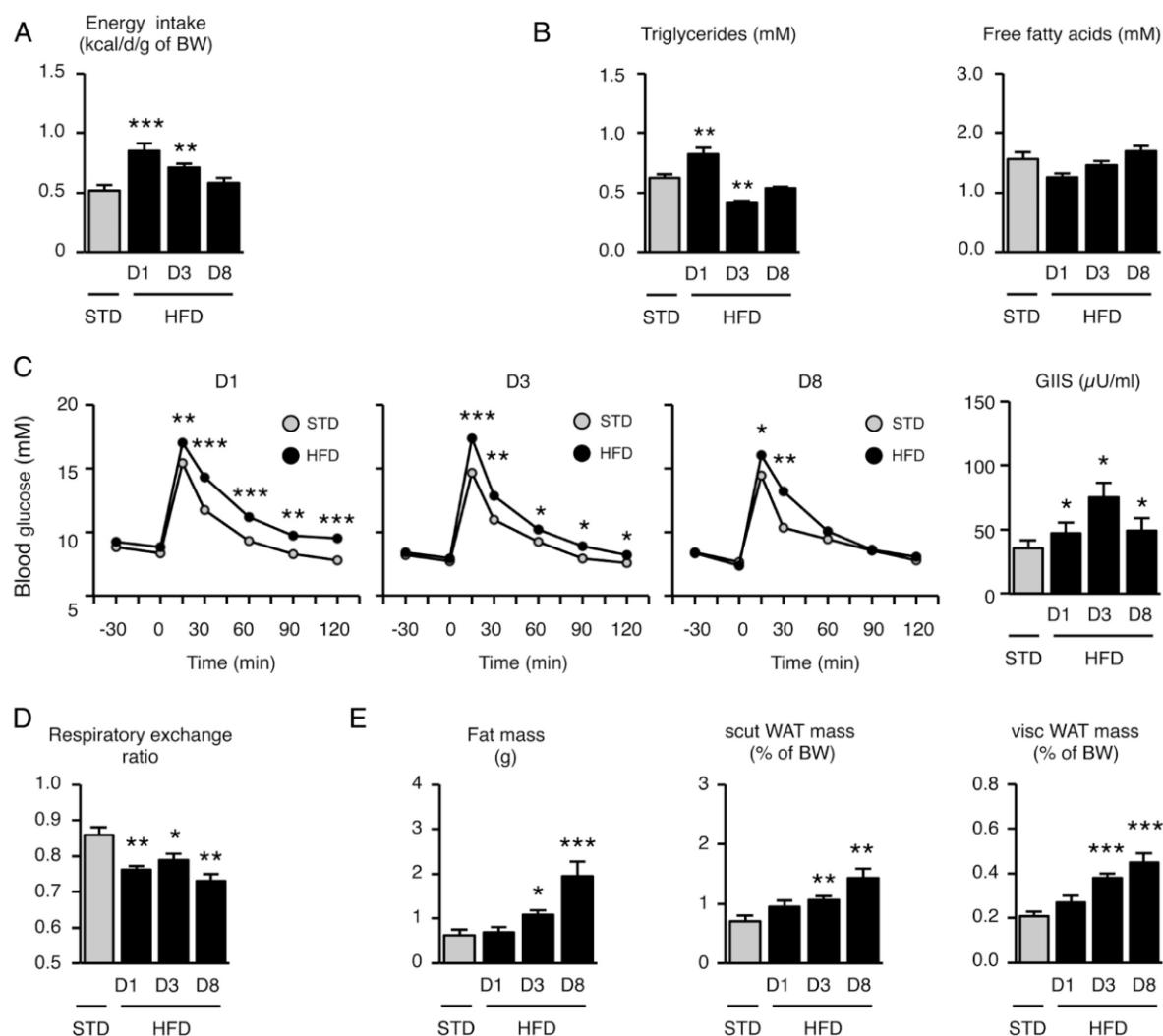


Figure 1. Energy intake and peripheral metabolism are transiently altered in mice fed HFD for 1 week. **A–E**, Energy intake (**A**), plasma triglycerides and free fatty acid levels (**B**), glucose tolerance with glucose-induced insulin secretion (GIIS) (**C**), respiratory exchange ratio (**D**), and adiposity assessed by EchoMRI scan and subcutaneous (scut) and visceral (visc) fat pad weight after dissection (**E**) were measured in standard- and HFD-fed mice. D, Day. Data are means \pm SEM of $n = 6–8$ animals per group. In all panels, groups were compared using Dunnett's test after ANOVA, with STD mice as the reference, or using the Mann–Whitney test when appropriate. Significant difference at $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, or $***p < 0.001$, respectively.

Large high-resolution images were generated with Axiovision software and the MosaiX module (Zeiss).

Western blotting. Brains were removed and sliced in PBS using an acrylic matrix (WPI). The ventromedial hypothalami were dissected from one slice. Proteins were extracted in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate) supplemented with a protease inhibitor mix (Complete Mini, Roche), using the TissueLyser system (Qiagen) and 5 mm stainless steel beads (Qiagen). The homogenates were centrifuged at $5000 \times g$ for 5 min, and the supernatants were collected and stored at -80°C until use. The protein content of brain lysates was determined by the Lowry method (DC Protein assay kit; Bio-Rad Laboratories). Proteins (10 μ g per lane) were separated by SDS/PAGE using 4–15% precast gels (Mini-Protein TGX, Bio-Rad Laboratories), and transferred onto 0.2 μ m PVDF membranes (Trans-Blot Turbo mini PVDF transfer pack, Bio-Rad Laboratories) with the Trans-Blot Turbo system (Bio-Rad Laboratories). After blocking with 5% nonfat milk in TBST (Tris-buffered saline–Tween 20; 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.6) for 1 h at

room temperature, the membranes were probed at 4°C overnight with rabbit polyclonal anti-PSA antibody (1:10,000; #AbC0019; Eurobio), diluted in TBST with 1% nonfat milk. The blot was rinsed in TBST (3×5 min) and was further incubated with HRP-conjugated secondary antibody anti-IgG for 1 h (1:10,000 in TBST; #NA931V; GE Healthcare) and soaked in a luminol-contained mix (ImmunStar WesternC Chemiluminescence kit, Bio-Rad Laboratories). The enhanced chemiluminescent signal of the blot was detected in a darkroom with a CCD camera (Molecular Imager Gel Doc XR System; Bio-Rad). The volume of the bands (i.e., area \times intensity) was quantified using Quantity One software (Bio-Rad). To ensure equality in the protein loading, the membranes were also probed with a rabbit polyclonal β -actin antibody (1:10,000; #MAB1501; Millipore).

Electrophysiological recordings. Brain slices (300 μ m) were prepared from adult POMC-GFP (pro-opiomelanocortin-green fluorescent protein) mice (6–8 weeks old). The slices were incubated at room temperature in oxygenated extracellular medium containing (in mM): 118 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl_2 , 25 NaHCO_3 , 1.2 NaH_2PO_4 , 1.5 CaCl_2 , 5 D-glucose, 15 sucrose (300–

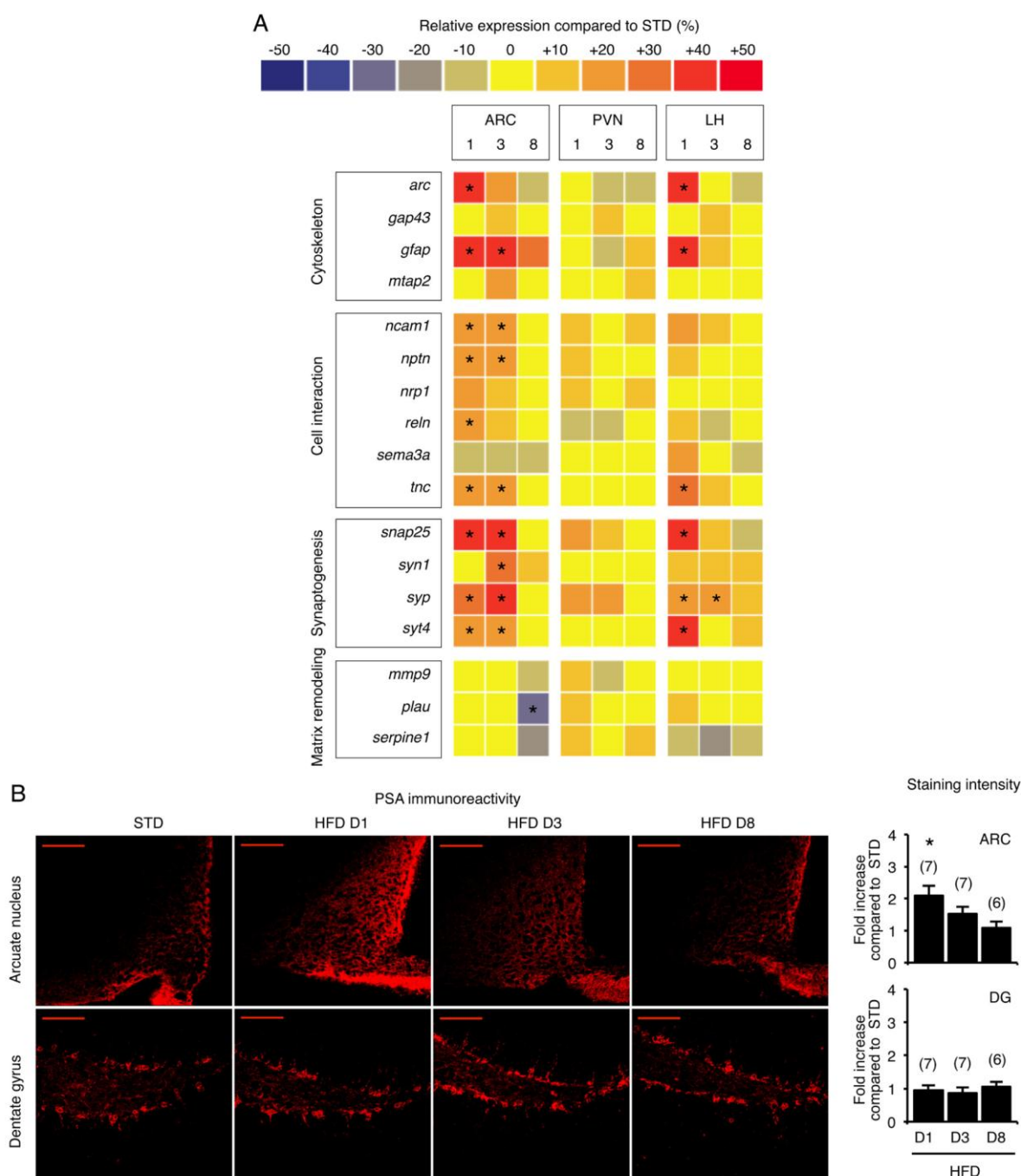


Figure 2. Hypothalami from mice fed an HFD for 1 d exhibit the molecular signature of plasticity. **A**, Simultaneous quantification of the expression of genes in hypothalamic biopsies using Taqman low density arrays. **B**, Representative PSA immunostaining in arcuate nucleus and dentate gyrus of standard- and HFD-fed mice. Scale bar, 100 μ m. D, Day; ARC, arcuate nucleus; PVN, paraventricular nucleus; LH, lateral hypothalamic area; DG, dentate gyrus. Data are means \pm SEM. In **A** and **B**, groups were compared using Bonferroni's test after ANOVA. Regarding the gene expression study, individual analysis was conducted for each gene. Significant difference at $*p < 0.05$.

310 mOsm, pH 7.4) for a recovery period. Once in the recording chamber, the slices were perfused at 2–3 ml/min with the same extracellular medium. Viable ARC neurons were viewed using a 40 \times water-immersion objective (Nikon) under IR-DIC illumination and an infrared video camera (Hamamatsu Photonics). GFP-positive neurons were visualized using epi-

fluorescence and specific filter sets (AHF analysentechnik AG). For EPSC recordings, borosilicate pipettes (4–6 M Ω ; GC150F-10, Phymep) were filled with a potassium-gluconate-based solution containing (in mM): 155 K-gluconate, 0.1 EGTA, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 5 KCl, 10 KOH, 4 Mg-ATP, 0.25 Na-GTP (290 mOsm, pH 7.3). The extracellular medium was supplemented

with picrotoxin (100 μ M) to block GABAergic IPSCs. For IPSC recordings, pipettes were filled with a cesium-chloride solution containing (in mM): 140 CsCl, 3.6 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 0.1 Na₂EGTA, 4 Mg-ATP, 0.25 Na-GTP (290 mOsm, pH 7.3). A mixture of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (20 μ M) and (2R)-amino-5-phosphonovaleric acid (50 μ M) was added to the extracellular medium to block glutamatergic currents. Miniature EPSCs and IPSCs were isolated and monitored by adding tetrodotoxin (TTX, 500 nM) to the extracellular solution. The recordings were made using an Axopatch 1D amplifier, digitized using the Digidata 1320A interface and acquired using pClamp 9.2 software (Molecular Devices). The pipettes and cell capacitances were fully compensated. Access resistance was monitored over the course of the recordings. Cells were excluded if the access resistance was >35 M Ω and/or increased significantly (>20% of change) during the experiment. Cells were voltage clamped at -60 mV, and sampled at a frequency of 10 kHz. Currents were recorded for at least 5 min. EPSC and IPSC frequency was calculated over a period of at least 150 s using Clampfit software (Molecular Devices).

Statistical analysis. All data are expressed as means. Error bars indicate SEM. Multiple comparisons of groups were performed by a one-way ANOVA using Prism 4.0 software (GraphPad Software). *Post hoc* analyses were used when main effects reached significance without any mathematical correction. Before analysis, Bartlett's and Shapiro-Wilk's tests were applied to check equality of variances and to evaluate the normality of distribution, respectively. Bonferroni's, Newman-Keuls', or Dunnett's tests were used to compare groups. Student's *t* test was used when only two groups (STD vs HFD) were studied. When variances were significantly different, the Mann-Whitney test was applied. Significant difference was noted on the graphic representation when *p* value was <0.05, 0.01, or 0.001.

Results

Homeostatic response to HFD feeding

We first characterized the model of short-term HFD used in this study (see Table 1 for information regarding diets). In 8-week-old mice, feeding HFD *ad libitum* rapidly increased energy intake: 0.85 ± 0.06 kcal/d/g body weight after 24 h versus 0.52 ± 0.05 kcal/d/g in mice maintained on a standard diet. However, this HFD-induced energy intake was transient and reversed in a week even under the persistent diet challenge (Fig. 1A; $F_{(3,24)} = 10.50$; $p < 0.001$ for HFD D1 and $p < 0.01$ for HFD D3, determined using one-way ANOVA and Dunnett's *post hoc* test against STD). In other words, food intake progressively fell after introduction of the HFD and was stabilized after a week (from 0.18 ± 0.02 to 0.12 ± 0.02 g/d/g body weight). In addition, the ingestion of dietary fat rapidly caused metabolic impairments such as elevated plasma triglyceride levels, and marked glucose intolerance (Fig. 1B,C) as fully described by others (Butler et al., 2001; Wang et al., 2001; Poci et al., 2005, 2006). Again, these alterations were reversed in a week. Finally, a shift in substrate utilization from carbohydrates to lipids was detected after only 24 h on the HFD (STD: 0.86 ± 0.04 ; HFD D1: 0.77 ± 0.02 ; Fig. 1D; $F_{(3,22)} = 7.57$; $p < 0.05$ for HFD

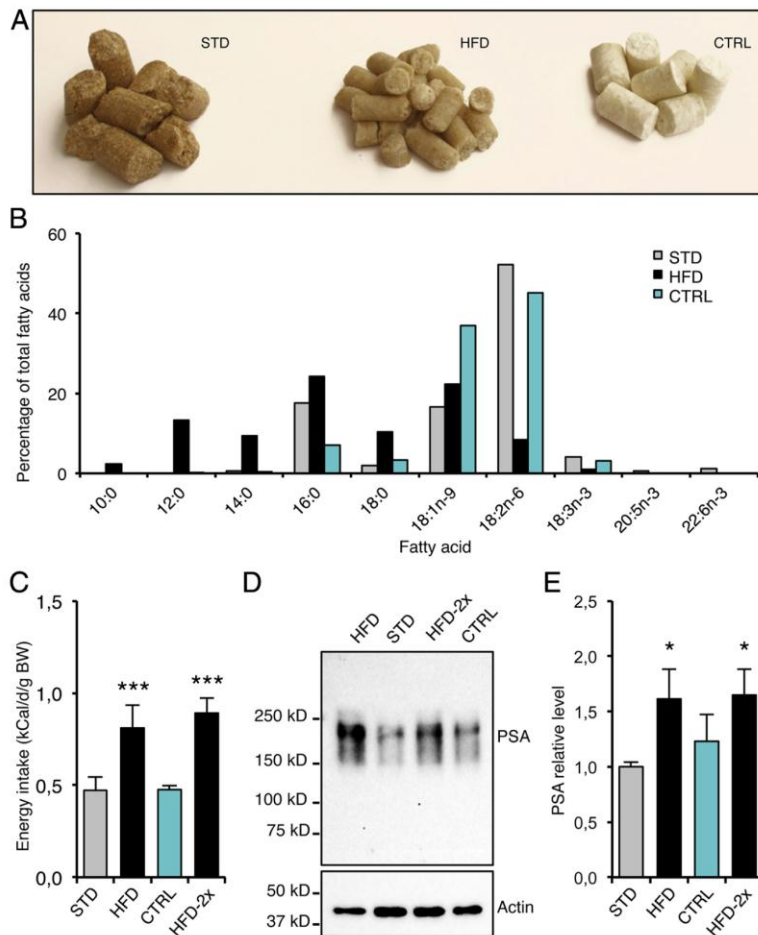


Figure 3. Food novelty is not sufficient to stimulate PSA production in the hypothalamus. **A**, Photograph of STD, HFD, and CTRL diets. **B**, Fatty acid composition of diets, as determined by gas chromatography. **C**, Energy intake after STD, CTRL, or HFD feeding for 1 d. HFD was introduced once (HFD) or twice (HFD-2x), with 1 week maintenance on STD between the two exposures. **D**, Representative immunoblot of PSA levels detected in protein extracts from arcuate biopsies collected after STD, CTRL, or HFD feeding. **E**, PSA levels in arcuate biopsies from STD, CTRL, or HFD fed mice, measured by Western blot. HFD-2x = reexposure to HFD. Data are means \pm SEM of $n = 9$ (STD), 5 (HFD), 7 (CTRL), and 7 (HFD-2x). In **C** and **E**, groups were compared using the Mann-Whitney test. Significant difference at * $p < 0.05$ or *** $p < 0.001$, respectively.

D1, HFD D3, and HFD D8, determined using one-way ANOVA and Dunnett's *post hoc* test against STD), and adiposity was increased on the third day (fat mass STD: 0.63 ± 0.13 ; fat mass HFD D3: 1.08 ± 0.11 g; Fig. 1E; $p < 0.05$ for HFD D3, $p < 0.001$ for HFD D8, determined using the Mann-Whitney test against STD), suggesting appropriate nutrient channeling and efficient storage of the energy overload. We concluded that the mice rapidly adapted their eating behavior and metabolism to the hypercaloric nutritional condition. Indeed, this model constitutes a paradigm of homeostatic control in response to dietary fat, as suggested by Butler et al. (2001).

Molecular signature of brain plasticity is induced in the hypothalamus after HFD feeding

The adaptive response to sustained external stimuli or durable physiological modification can be linked to tissue rearrangement in specific brain areas (Hübener and Bonhoeffer, 2010; McEwen, 2010). These activity-dependent modifications are based on the co-

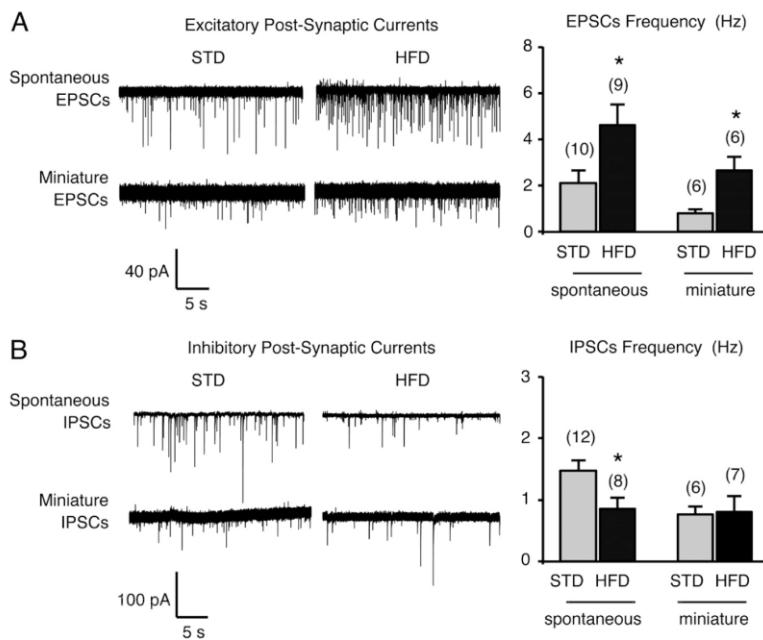


Figure 4. Arcuate POMC neurons of mice fed an HFD for 3 d are rewired. Postsynaptic excitatory (**A**) and inhibitory (**B**) currents in GFP-tagged POMC neurons from standard mice and mice fed an HFD for 3 d were recorded in a whole-cell voltage-clamp configuration (holding potential at -60 mV). Representative sample traces (30 s) are given in each panel. Frequencies of spontaneous and miniature currents were calculated before and after adding TTX, respectively. Data are means \pm SEM. Groups were compared using Student's *t* test. Significant difference at $*p < 0.05$.

ordinated regulation of mRNA expression (Bramham and Wells, 2007) and protein synthesis (Cajigas et al., 2010). To determine whether HFD feeding induces plasticity within the hypothalamus, we measured the relative expression of several permissive factors of brain plasticity in dissected hypothalamic areas (i.e., arcuate nucleus, paraventricular nucleus and lateral hypothalamus) using low-density arrays. Screening was performed after 1, 3, and 8 d of HFD feeding. Compared with standard-diet-fed mice, mRNA abundance of a cluster of plasticity markers ($n = 10$) was significantly increased in biopsies from HFD-fed mice (from 10 to 40%) (Fig. 2A; statistical significance determined using one-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* test, or using Mann–Whitney test when variances were unequal). This change was rapid and transient, occurring after 1 and 3 d of HFD feeding, and was mostly located in the arcuate nucleus. We found upregulation of *ncam1*, *nrl1*, *trc*, *snap25*, *syp*, *syt4*, suggesting that HFD modified cell interactions and induced synaptogenesis. By contrast, expression of *gap43*, *serpine1*, *mmp9*, or *plau* was not affected suggesting no change in axonal sprouting. Changes in cell interactions can be mediated by the polysialic acid (PSA) molecule (Rutishauser, 2008). PSA is a cell-surface glycan with a large hydrated volume that modulates distances between cells. Basically, the attachment of PSA to membrane proteins, such as the neural cell-adhesion molecule (NCAM), promotes synaptic reorganization and other plasticity-related events by weakening cell-to-cell interactions. We therefore examined levels of PSA in adult brains from standard- and HFD-fed mice. The brains were fixed, sectioned and analyzed for the abundance of PSA by immunohistochemistry. A twofold increase in arcuate PSA immunoreactivity was calculated from optical sections acquired by confocal laser scanning microscope (Fig. 2B; $F_{(3,24)} = 4.67$; $p < 0.05$ for HFD D1, determined using one-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* test), whereas no

variation was detected in the dentate gyrus of the hippocampus, the most frequently described brain area able to undergo remodeling.

Novelty is not sufficient to induce PSA in the arcuate nucleus

The molecular signature of plasticity that is detected in the hypothalamus after HFD feeding could be induced by the change in food composition or merely by the stress linked to the novelty. We therefore tested whether the replacement of food was sufficient to stimulate PSA expression in the arcuate nucleus. A standard diet was replaced by an isolipidic isocaloric control (CTRL) diet, whose composition was similar but which differed in appearance, in texture, and probably in flavor (Fig. 3A, B). Introduction of the CTRL diet did not modify the energy intake of mice (Fig. 3C). One day after feeding with the STD, HFD or CTRL diet, PSA abundance was measured in protein extracts from arcuate nuclei by Western blot (Fig. 3D). Again, the HFD for 1 d increased PSA levels in the arcuate nucleus (Fig. 3E; $p < 0.05$, determined using the Mann–Whitney test against STD). By contrast, the CTRL diet did not modify the PSA level. Moreover, after 6 d on the STD diet, 24 h of reexposure to the HFD still increased energy intake (Fig. 3C; $p < 0.001$, determined using the Mann–Whitney test against STD), and increased the PSA level in arcuate biopsies (Fig. 3E; $p < 0.05$, determined using the Mann–Whitney test against STD). Together, these results indicate that novelty in food conditions alone is not sufficient to increase PSA levels in the hypothalamus.

take (Fig. 3C; $p < 0.001$, determined using the Mann–Whitney test against STD), and increased the PSA level in arcuate biopsies (Fig. 3E; $p < 0.05$, determined using the Mann–Whitney test against STD). Together, these results indicate that novelty in food conditions alone is not sufficient to increase PSA levels in the hypothalamus.

HFD feeding for 3 d induces arcuate POMC neuron rewiring

The melanocortin system in the CNS plays a fundamental role in the regulation of energy homeostasis by producing anorexigenic effects when stimulated (Cone, 2005; Berthoud and Morrison, 2008). The response controlled by POMC neurons is actually defined by their intrinsic neuronal activity and synaptic inputs. Interestingly, these inputs can be rapidly rewired (Pinto et al., 2004; Sternson et al., 2005). To investigate whether the HFD challenge could affect presynaptic inputs on arcuate POMC neurons, we recorded the frequencies of spontaneous and miniature postsynaptic currents (sPSCs and mPSCs) in arcuate GFP-tagged POMC neurons held in the whole-cell voltage-clamp configuration, using brain slices from mice fed either a standard diet or HFD for 3 d. We found an increase in the frequency of spontaneous EPSCs (sEPSCs) on arcuate POMC neurons in HFD mice (STD: 2.12 ± 0.55 Hz; HFD: 4.63 ± 0.87 Hz; Fig. 4A; $p < 0.05$, determined using *t* test). By contrast, the frequency of spontaneous IPSCs was decreased in HFD fed mice (STD: 1.47 ± 0.17 Hz; HFD: 0.86 ± 0.17 Hz; Fig. 4B; $p < 0.05$, determined using *t* test). We also quantified the frequency of mPSCs arising from spontaneous vesicle fusion by using TTX to block all action potential-driven PSCs. The quantification of mPSC frequency gives an indirect estimation of the number of synapses onto postsynaptic neurons. Miniature EPSC (mEPSCs) frequency was increased

after HFD feeding whereas miniature IPSC (mIPSCs) frequency was not changed (mEPSCs: STD: 0.81 ± 0.16 Hz vs HFD: 2.66 ± 0.57 Hz; mIPSCs: STD: 0.76 ± 0.14 Hz vs HFD: 0.80 ± 0.26 Hz; Fig. 4A,B; $p > 0.05$, determined using *t* test). No significant differences were observed in the amplitude of either sPSCs or mPSCs after the HFD challenge (sPSCs: STD: 18.25 ± 1.49 vs HFD 17.32 ± 3.77 pA; mPSCs: STD: 11.19 ± 0.87 vs HFD 11.54 ± 0.72 pA) ($p > 0.05$, determined using a *t* test). Together, these data suggest the reorganization of synapses onto arcuate POMC neurons after 3 d of HFD, thus increasing the excitatory inputs on these cells. A higher anorexigenic tone from POMC neurons is consistent with the progressive decrease in energy intake observed after HFD introduction.

PSA is required for POMC rewiring and the homeostatic response to dietary fat

We next examined the role of PSA in diet-induced hypothalamic plasticity using the enzyme EndoN, which specifically removes PSA residues from NCAM isoforms (Vimr et al., 1984). We injected EndoN bilaterally into the ventral hypothalamus by stereotaxy. Three days after surgery, the mice were fed a standard or an HFD. Microscopic observation of brains 3 d after surgery revealed that EndoN totally removed PSA immunoreactivity in the whole hypothalamus of HFD-fed mice (Fig. 5B). The EndoN-induced PSA washout persisted for at least 1 week. EndoN injection fully inhibited the increase in the frequency of sEPSCs and mEPSCs onto POMC neurons previously observed in uninjected mice fed an HFD for 3 d (sEPSCs: 1.49 ± 0.51 Hz; mEPSCs: 0.65 ± 0.12 Hz) ($p < 0.05$, determined using a *t* test).

To investigate whether diet-induced POMC rewiring was involved in the maintenance of energy balance, we quantified energy intake in EndoN-treated animals. Mice receiving either vehicle or EndoN maintained a constant energy intake when fed a standard diet (≈ 0.50 kcal/d/g; Fig. 5C). As before, energy intake was increased in mice fed an HFD for 1 d in both treatments, reaching 0.80 kcal/d/g approximately. However, mice receiving EndoN were still overfed after 1 week on the HFD and their cumulative energy intake was higher (+9.2%) than that of vehicle-treated mice (Fig. 5D; $F_{(3,71)} = 59.68$; $p < 0.001$, determined using one-way ANOVA and Newman–Keuls *post hoc* test). Moreover, EndoN-treated mice displayed a greater body weight gain after 1 week (HFD+EndoN: 1.52 ± 0.19 g; HFD+vehicle: 0.90 ± 0.14 g; Fig. 5E; $F_{(3,71)} = 13.95$; $p < 0.01$, determined using one-way ANOVA and Newman–Keuls *post hoc* test). Despite this, EndoN treatment did not directly affect glucose tolerance (Fig. 5F). As before (Fig. 1B), glucose tolerance was not totally recovered after HFD feeding for 8 d. EndoN did

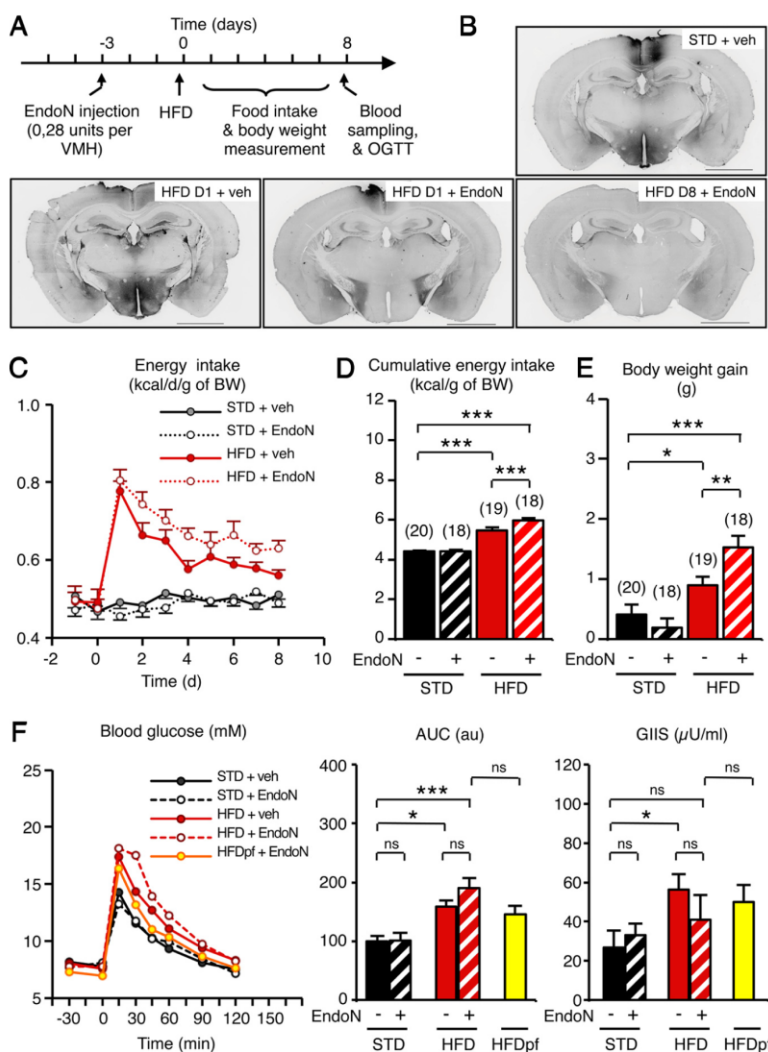


Figure 5. PSA removal in the hypothalamus impairs the homeostatic control of energy intake after HFD introduction. **A**, Experimental paradigm to remove PSA in the hypothalamus and assess energy balance in mice fed an HFD or not. **B**, Pictures show representative brain sections with a complete washout of PSA immunoreactivity after endoneuraminidase injection. Scale bar, 2 mm. **C–F**, Energy intake (**C**), cumulative energy intake (**D**), body weight gain (**E**), and glucose tolerance, with glucose-induced insulin secretion (**F**) of standard- and HFD-fed mice receiving or not a bilateral injection of EndoN into the hypothalamus 3 d before HFD introduction. **D**, Day; veh, vehicle; HFDpf, high fat diet, pair fed; AUC, area under curve; GIIS, glucose-induced insulin secretion. Data are means \pm SEM. Groups were compared using the Newman–Keuls test after ANOVA. Significant difference at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$, respectively.

not alter glucose tolerance in STD mice. In HFD-fed mice, EndoN treatment produced a minor but nonsignificant increase in glucose intolerance. This slight effect was probably due to the EndoN-induced increase in dietary fat ingestion, because tolerance values were similar when EndoN-treated HFD-fed animals were pair-fed with the HFD-veh group.

To further assess the role of PSA in the regulation of energy intake, we compared physiological responses to HFD in wild-type and PST-1 knock-out mice (*St8sia4*^{-/-}). These mice lack the ST8SiaIV (or PST-1) enzyme, a polysialyltransferase responsible for the addition of PSA to NCAM (Eckhardt et al., 2000). No increase in arcuate PSA immunoreactivity was detected in adult mutant mice after HFD introduction (Fig. 6A). In wild-type and mutant mice, daily energy intake was identical (0.53 ± 0.03 kcal/

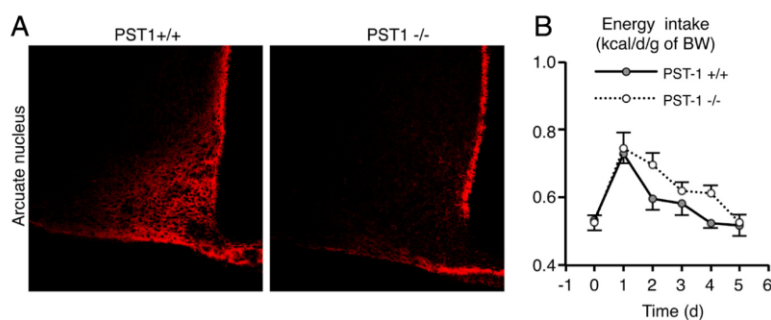


Figure 6. PST-1 enzyme deficiency impairs the homeostatic control of energy intake after HFD introduction. **A**, Representative PSA immunostaining in arcuate nucleus of PST-1^{+/+} and PST-1^{-/-} mice fed an HFD for 1 d. **B**, Energy intake of PST-1^{+/+} and PST-1^{-/-} mice fed an HFD for 5 d. Data are means \pm SEM. $n = 6$ PST-1^{+/+} mice and $n = 12$ PST-1^{-/-} mice. Groups were compared using Student's *t* test.

d/g; Fig. 6B). Moreover, energy intake of wild-type and mutant mice increased similarly on day 1 after HFD introduction (0.73 ± 0.03 and 0.75 ± 0.05 kcal/d/g, respectively). However, in mutant mice the return to basal level took 1 d longer than in wild-type mice. Consequently, the cumulative energy intake was increased by 8.6% in mutant mice fed for 5 d with HFD compared with their wild-type littermates (wild-type: 2.95 ± 0.09 kcal/g, KO: 3.20 ± 0.07 kcal/g; $p < 0.05$, determined using *t* test). Body weight gain of HFD-fed mutant mice was not significantly increased (wild-type: 0.38 ± 0.22 g, KO: 0.69 ± 0.14 g), probably exposure to the HFD was too short. These results demonstrate that the PST1 enzyme plays a role in the behavioral adaptation to HFD.

Discussion

Hypothalamic plasticity could be defined as an adaptive process aimed at integrating changes in environmental conditions and physiological states (Oliet, 2002; Prevot, 2002; Ebling and Barrett, 2008). Here, we report that a change of diet is another situation leading to hypothalamic neuronal network rewiring. Indeed, persistent fat ingestion increases the frequency of miniature excitatory postsynaptic currents in POMC neurons, which strongly suggests a synaptic reorganization on these cells (Pinto et al., 2004). In this study, we did not find the causative link between these electrophysiological data and the modification of food intake after HFD introduction, which requires inducible and targeted inhibition of PSA-mediated synaptogenesis in POMC cells. However, (1) PSA overexpression precedes behavioral changes, (2) both, HFD-induced POMC rewiring and the progressive restoration of energy intake are EndoN sensitive, and (3) anorexigenic POMC neurons are thought to be involved in adaptive homeostatic processes that maintain energy homeostasis (Cone, 2005). As a result, the HFD-induced PSA-dependent POMC rewiring could explain the homeostatic response to dietary fat.

Although the role of the melanocortin system in the adaptation of food intake in response to variations in nutritional conditions has been already proposed (Butler et al., 2001; Pilot et al., 2011), synaptic reorganization on arcuate POMC neurons now has to be considered a key component in the physiological feedback. Nevertheless, we cannot exclude either a synergic effect due to mirror synaptic rewiring of orexigenic cells, NPY/AgRP neurons for instance. Additional defenses against metabolic imbalance also involve nonsynaptic mechanisms, such as the HFD-stimulated up-regulation of POMC expression (Ziotopoulou et al., 2000). As cell turn-over in feeding circuits is inhibited in obese mice (McNay et al.,

2012), hypothalamic cell renewal might also contribute to the homeostatic response to dietary fat. Therefore the homeostatic control of energy balance is surely consolidated by a combination of several plasticity-related processes from rapid pharmacological to slower morphological changes. Unfortunately, all of these brain safety mechanisms are obviously overtaken when the calorific pressure is sustained.

Interestingly, the molecular screening of plastic events in the hypothalamus of HFD mice using low-density arrays suggests a brief and arcuate-specific modification in cell interactions. Although the melanocortin system is a widespread neuronal network, diet-induced synaptic plasticity seems to affect arcuate, probably first-order, neurons only. Therefore, downstream targets of arcuate POMC or AgRP neurons such as paraventricular MC4R-positive neurons, which are crucial in the homeostatic response to dietary fat (Butler et al., 2001), could relay the increased anorexigenic tone from the arcuate nucleus without particular synaptic remodeling.

In this article, we report a PSA-dependent control of body weight. The obesogenic effect of EndoN could be linked to an alteration in food intake regulation, but an effect on energy expenditure is not excluded either. Indeed, POMC neurons also govern "facultative" thermogenesis, which burns off excess calories during times of plenty. On the other hand, the restoration of glucose tolerance is not EndoN sensitive, suggesting that PSA-dependent neuronal rewiring is not crucial to maintain glucose homeostasis. Thus, PSA-dependent hypothalamic plasticity appears to act on specific physiological responses such as the regulation of food intake. This was unexpected, given the broad spectrum of action of the melanocortin system on peripheral metabolism (Mountjoy, 2010). However, to our knowledge, hormonal stimulation of POMC neuron rewiring does not alter glucose homeostasis either.

It appears that synaptic activity on POMC neurons promotes a homeostatic response to dietary fat ingestion, i.e., the progressive reduction of food intake over a week. The change in hypothalamic neuron connectivity persists for several months even though the HFD continues (Horvath et al., 2010). However, the different outcomes in short- and long-term exposure to HFD could be linked to leptin resistance in diet-induced obese animals, a situation in which elevated leptin levels no longer sustain POMC neuronal firing (Cowley et al., 2001; Enriori et al., 2007; Diano et al., 2011).

We identified PSA as a downstream actor required for the diet-induced rewiring of POMC neurons. Polysialylation is a ubiquitous mechanism found in several hypothalamic processes that involve modifications in cell interactions (Theodosis et al., 1991). Therefore, it is probably not specific to the diet-dependent synaptic plasticity of arcuate POMC neurons. Rather, it could be considered a common permissive process that might be recruited in other previously described hormone-dependent rewiring of these neurons (Pinto et al., 2004; Gao et al., 2007; Gyengesi et al., 2010; Yang et al., 2011). In addition, according to the transcriptomic assay, other regulators of dynamic cell interactions and synaptogenesis might also be involved in diet-induced hypothalamic plasticity. Indeed, syndecan-3 and synaptotagmin-4 are

promising targets to control obesity and related diseases (Strader et al., 2004; Zhang et al., 2011).

Biological mediators that promote diet-induced hypothalamic plasticity have not been investigated in this study, but one can easily speculate that metabolic hormones, which act on the energy metabolism through their neurotrophic properties, might be involved in this physiological mechanism (Pinto et al., 2004; Abizaid et al., 2006; Coppola et al., 2007; Andrews et al., 2008; Chiu and Cline, 2010; Yang et al., 2011). Leptin is one of the putative candidates. Blood leptin levels promptly increased after 3 d of HFD (Wang et al., 2001). This is consistent with the fat mass expansion detected in our model. Therefore, leptin could promote the synaptic reorganization of POMC neurons to inhibit food intake in addition to its direct stimulating effect on POMC neuronal activity. The contribution of nutrients themselves and/or their metabolites in this process should be considered too. For instance, dietary fat-derived endocannabinoids are major components of the gut-brain axis and can engender synaptic alterations in the brain (Crosby et al., 2011; Lafourcade et al., 2011; Bermudez-Silva et al., 2012). On the other hand, it seems that stress-related signals are not involved in diet-induced hypothalamic plasticity because familiar conditions, like reexposure to HFD, still produced upregulation of the plasticity marker PSA, whereas food novelty was not sufficient to induce this response.

Since hypothalamic plasticity appears to be a widely conserved process (Peinado et al., 2002; Pinto et al., 2004; Ebling and Barrett, 2008; Appelbaum et al., 2010; Baroncini et al., 2010), diet-induced hypothalamic plasticity could be present in humans as well. Indeed, haploinsufficiency of BDNF, the typical permissive factor of brain plasticity, is associated with childhood-onset obesity (Han et al., 2008). Furthermore, two recent genome-wide association studies of large human cohorts have reported a strong association between a high body-mass index and polymorphic loci whose neighboring genes are highly expressed in the brain and appear to be involved in neuronal development and/or activity (Thorleifsson et al., 2009; Willer et al., 2009). Thus, these studies highlight the crucial role that brain plasticity may play in regulating food intake and energy homeostasis in humans as well.

In conclusion, our findings bring new insights into the regulation of food intake. We show that the melanocortin system quickly adapts to the ingested food. Diet-induced rewiring of POMC neurons produces effects on energy intake. Inability to initiate diet-induced hypothalamic plasticity is obesogenic and could therefore be a new factor in the etiology of metabolic diseases.

References

- Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschöp MH, Gao XB, Horvath TL (2006) Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J Clin Invest* 116:3229–3239.
- Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, Tschöp MH, Shanabrough M, Cline G, Shulman GI, Coppola A, Gao XB, Horvath TL, Diano S (2008) UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* 454:846–851.
- Appelbaum L, Wang G, Yokogawa T, Skariah GM, Smith SJ, Mourrain P, Mignot E (2010) Circadian and homeostatic regulation of structural synaptic plasticity in hypocretin neurons. *Neuron* 68:87–98.
- Baroncini M, Jissendi P, Cateau-Jonard S, Dewailly D, Pruvo JP, Francke JP, Prevot V (2010) Sex steroid hormones-related structural plasticity in the human hypothalamus. *Neuroimage* 50:428–433.
- Bermudez-Silva FJ, Cardinal P, Cota D (2012) The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *J Psychopharmacol* 26:114–124.
- Berthoud HR, Morrison C (2008) The brain, appetite, and obesity. *Annu Rev Psychol* 59:55–92.
- Bramham CR, Wells DG (2007) Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* 8:776–789.
- Butler AA, Marks DL, Fan W, Kuhn CM, Bartolome M, Cone RD (2001) Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nat Neurosci* 4:605–611.
- Cajigas JJ, Will T, Schuman EM (2010) Protein homeostasis and synaptic plasticity. *EMBO J* 29:2746–2752.
- Chiu SL, Cline HT (2010) Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev* 5:7.
- Cone RD (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8:571–578.
- Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, Paradis E, Roy MC, Friedman JM, Ricquier D, Richard D, Horvath TL, Gao XB, Diano S (2007) A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab* 5:21–33.
- Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480–484.
- Crosby KM, Inoue W, Pittman QJ, Bains JS (2011) Endocannabinoids gate state-dependent plasticity of synaptic inhibition in feeding circuits. *Neuron* 71:529–541.
- Diano S, Liu ZW, Jeong JK, Dietrich MO, Ruan HB, Kim E, Suyasa S, Kelly K, Gyengesi E, Arbiser JL, Belsham DD, Sarruf DA, Schwartz MW, Bennett AM, Shanabrough M, Mobbs CV, Yang X, Gao XB, Horvath TL (2011) Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat Med* 17:1121–1127.
- Ebling FJ, Barrett P (2008) The regulation of seasonal changes in food intake and body weight. *J Neuroendocrinol* 20:827–833.
- Eckhardt M, Bukalo O, Chazal G, Wang L, Goridis C, Schachner M, Gerardy-Schahn R, Cremer H, Dityatev A (2000) Mice deficient in the polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 allow discrimination of the roles of neural cell adhesion molecule protein and polysialic acid in neural development and synaptic plasticity. *J Neurosci* 20:5234–5244.
- Enrietti PJ, Evans AE, Sinnayah P, Jobst EE, Tonelli-Lemos L, Billes SK, Glavas MM, Grayson BE, Perello M, Nillni EA, Grove KL, Cowley MA (2007) Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab* 5:181–194.
- Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, Leranth C, Toran-Allerand D, Priest CA, Roberts JL, Gao XB, Mobbs C, Shulman GI, Diano S, Horvath TL (2007) Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med* 13:89–94.
- Gyengesi E, Liu ZW, D'Agostino G, Gan G, Horvath TL, Gao XB, Diano S (2010) Corticosterone regulates synaptic input organization of POMC and NPY/AgRP neurons in adult mice. *Endocrinology* 151:5395–5402.
- Han JC, Liu QR, Jones M, Levinn RL, Menzie CM, Jefferson-George KS, Adler-Wailes DC, Sanford EL, Lacobawan FL, Uhl GR, Rennert OM, Yanovski JA (2008) Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N Engl J Med* 359:918–927.
- Horvath TL, Sarman B, García-Cáceres C, Enrietti PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen JA, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Brönneke HS, Levin BE, Diano S, Cowley MA, Tschöp MH (2010) Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:14875–14880.
- Hübener M, Bonhoeffer T (2010) Searching for engrams. *Neuron* 67:363–371.
- Lafourcade M, Larriou T, Mato S, Duffaud A, Sepers M, Matias I, De Smedt-Peyrusse V, Labrousse VF, Bretillon L, Matute C, Rodriguez-Puertas R, Layé S, Manzoni OJ (2011) Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat Neurosci* 14:345–350.
- McEwen BS (2010) Stress, sex, and neural adaptation to a changing environment: mechanisms of neuronal remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1204 Suppl:E38–E59.
- McNay DE, Briançon N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E, Flier JS (2012) Re-

- modeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest* 122:142–152.
- Mountjoy KG (2010) Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. *Biochem J* 428:305–324.
- Oliet SH (2002) Functional consequences of morphological neuroglial changes in the magnocellular nuclei of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 14:241–246.
- Peinado JR, Castaño JP, Vázquez-Martínez R, Anouar Y, Tonon MC, Vaudry H, Gracia-Navarro F, Malagón MM (2002) Amphibian melanotrophs as a model to analyze the secretory plasticity of endocrine cells. *Gen Comp Endocrinol* 126:4–6.
- Pillot B, Duraffourd C, Bégeot M, Joly A, Luquet S, Houberton I, Naville D, Vigier M, Gautier-Stein A, Magnan C, Mithieux G (2011) Role of hypothalamic melanocortin system in adaptation of food intake to food protein increase in mice. *PLoS One* 6:e19107.
- Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL (2004) Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304:110–115.
- Pocai A, Morgan K, Buettner C, Gutierrez-Juarez R, Obici S, Rossetti L (2005) Central leptin acutely reverses diet-induced hepatic insulin resistance. *Diabetes* 54:3182–3189.
- Pocai A, Lam TK, Obici S, Gutierrez-Juarez R, Muse ED, Arduini A, Rossetti L (2006) Restoration of hypothalamic lipid sensing normalizes energy and glucose homeostasis in overfed rats. *J Clin Invest* 116:1081–1091.
- Prevot V (2002) Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 14:247–255.
- Rutishauser U (2008) Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 9:26–35.
- Sternson SM, Shepherd GM, Friedman JM (2005) Topographic mapping of VMH → arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci* 8:1356–1363.
- Strader AD, Reizes O, Woods SC, Benoit SC, Seeley RJ (2004) Mice lacking the syndecan-3 gene are resistant to diet-induced obesity. *J Clin Invest* 114:1354–1360.
- Theodosios DT, Rougon G, Poulain DA (1991) Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5494–5498.
- Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P, Helgadóttir A, Styrkarsdóttir U, Gretarsdóttir S, Thorlacius S, Jonsdóttir I, Jonsdóttir T, Olafsdóttir EJ, Olafsdóttir GH, Jonsson T, Jonsson F, Borch-Johnsen K, Hansen T, Andersen G, Jorgensen T, Lauritzen T, et al. (2009) Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet* 41:18–24.
- Vimr ER, McCoy RD, Vollger HF, Wilkison NC, Troy FA (1984) Use of prokaryotic-derived probes to identify poly(sialic acid) in neonatal neuronal membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1971–1975.
- Wang J, Obici S, Morgan K, Barzilai N, Feng Z, Rossetti L (2001) Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* 50:2786–2791.
- Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM, Heid IM, Berndt SI, Elliott AL, Jackson AU, Lamina C, Lettre G, Lim N, Lyon HN, McCarroll SA, Papadakis K, Qi L, Randall JC, Roccasecca RM, Sanna S, Scheet P, et al. (2009) Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* 41:25–34.
- Yang Y, Atasoy D, Su HH, Sternson SM (2011) Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 146:992–1003.
- Zhang G, Bai H, Zhang H, Dean C, Wu Q, Li J, Guariglia S, Meng Q, Cai D (2011) Neuropeptide exocytosis involving synaptotagmin-4 and oxytocin in hypothalamic programming of body weight and energy balance. *Neuron* 69:523–535.
- Ziotopeoulou M, Mantzoros CS, Hileman SM, Flier JS (2000) Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E838–E845.

Chapitre 3:

Effet précoce d'un régime gras sur la neurogenèse hypothalamique adulte

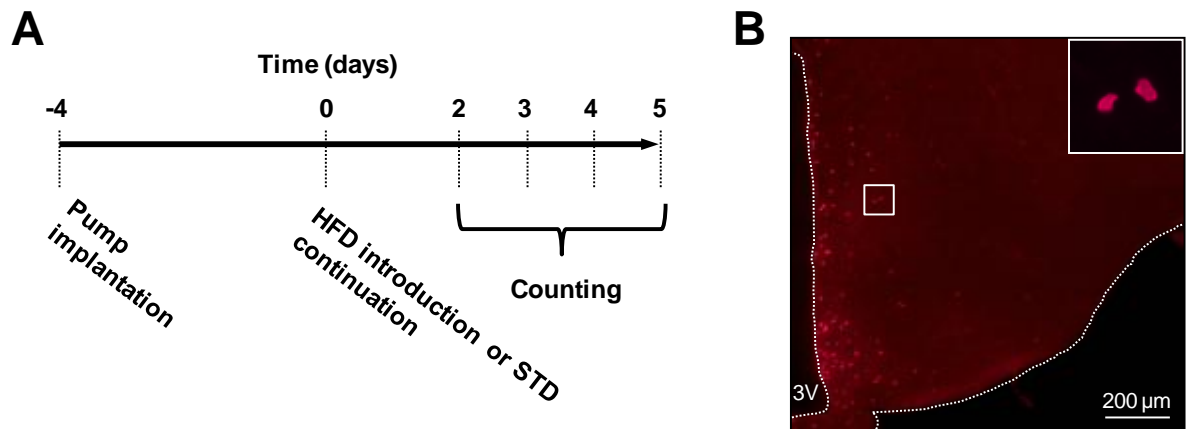


Figure 38: Protocole d'injection du BrdU et immunohistochimie anti-BrdU.

(A) Les mini-pompes reliées à des canules sont implantées à J-4 dans le ventricule latéral droit des souris. La longueur du cathéter entre la mini-pompe et la canule permet d'injecter du NaCl pendant 2 jours, puis 2 jours plus tard, le BrdU a atteint le troisième ventricule et diffuse dans le parenchyme et c'est à ce moment-là que le régime HFD est introduit. Les souris sont sacrifiées ensuite à J2, 3, 4, et 5. (B) Image représentative d'une immunohistochimie contre BrdU (en rouge). Les cellules ayant intégré le BrdU apparaissent en rouge et souvent par deux (voir grossissement). 3V = 3^{ème} ventricule.

Selon Gouazé et al., en soumission.

Le régime gras provoque des défauts métaboliques rapides et transitoires. La réponse homéostatique provoquée par le régime provoque de rapides remaniements synaptiques de manière à stimuler les neurones anorexigènes et rétablir une prise alimentaire normale. Ce phénomène est modulé par la polysialisation de PSA sur NCAM. Néanmoins, PSA-NCAM est aussi impliqué dans les phénomènes de neurogenèse et migration cellulaire. Pour le deuxième axe de ce travail, auquel je me suis particulièrement intéressée, le but était de savoir si le régime gras provoquait des modifications de neurogenèse hypothalamique, et si ces modifications participaient à la régulation de l'homéostasie énergétique.

1- Méthodologie

1-1 Quantification du renouvellement cellulaire

Le but de ce travail était d'étudier la neurogenèse hypothalamique chez l'adulte lors de la réponse homéostatique. La neurogenèse est composée d'une succession d'évènements (**Figure 16**) qui sont la prolifération, la différenciation, la maturation et l'intégration des nouveaux neurones dans le réseau. En première approche, il s'agissait de quantifier le taux de renouvellement cellulaire hypothalamique, c'est-à-dire à l'équilibre entre prolifération et sélection des cellules. Pour ce faire, j'ai mis au point une nouvelle technique au laboratoire, qui consiste à injecter en continu grâce à des mini-pompes osmotiques directement dans le cerveau des souris du bromodeoxyuridine ou BrdU (voir protocole de Kokoeva et al., 2005 et **Figure 38**). Cette molécule, analogue de la thymidine, va s'incorporer à l'ADN lors de sa réplication. Après incorporation, le groupement bromure associé à la déoxyuridine va pouvoir être détecté par

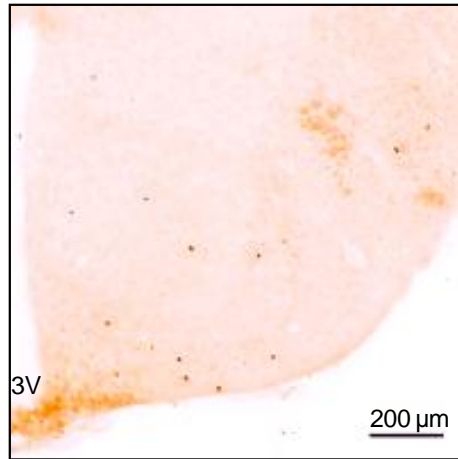


Figure 39: Image représentative d'une immunohistochimie contre Ki67.

Les cellules Ki67+ apparaissent en marron. 3V = 3ème ventricule.

Selon Gouazé et al., en soumission.

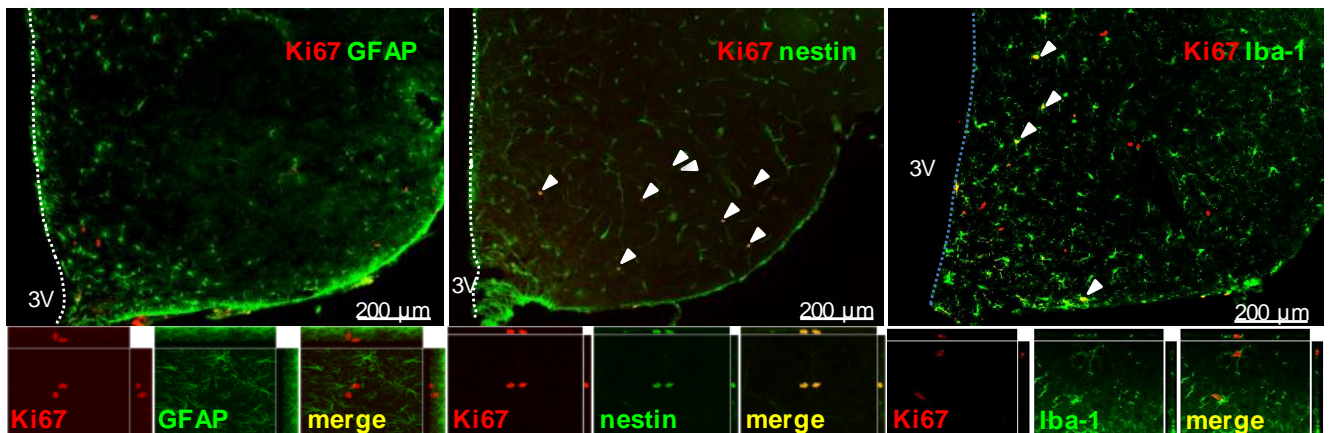


Figure 40: Détermination de l'origine des cellules néoformées.

Images représentatives des doubles immunohistochimies contre Ki67 (en rouge) et trois marqueurs de types cellulaires : GFAP (cellules astrogliales), nestine (précurseurs neuraux) et Iba1 (cellules microgliales) (en vert). 3V = 3^{ème} ventricule.

Selon Gouazé et al., en soumission.

immunohistochimie, et ce jusqu'à la mort de la cellule. L'utilisation de cette technique avait pour but de comptabiliser le nombre de cellules ayant proliféré durant la période de réponse homéostatique au régime.

1-2 Quantification de la prolifération cellulaire

Après avoir évalué le renouvellement global, il s'agissait ensuite de quantifier précisément le pendant prolifératif uniquement. Pour ce faire, des immunomarquages d'un marqueur endogène de prolifération: Ki67, dont le rôle précis n'a pas encore été déterminé, ont été réalisées à J1, J3 et J5 sous régime, dans l'hypothalamus entier des souris STD et HFD (**Figure 39**). Les cellules Ki67+ ont aussi été compté dans 3 noyaux hypothalamiques spécifique : l'ARC, le VMN et le PVN, afin de déterminer si l'effet du régime gras sur la prolifération était le même selon les zones hypothalamiques.

1-3 Origine des cellules néoformées

Plusieurs types cellulaires sont capables de proliférer dans le cerveau. Afin de savoir à quels types cellulaires appartiennent les cellules qui prolifèrent dans l'hypothalamus adulte, trois séries de doubles immunohistochimies contre Ki67 et un marqueur du type cellulaire concerné ont été réalisées au moment où la prolifération est la plus forte, c'est-à-dire à J3 (**Figure 40**). GFAP (glial fibrillary acidic protein) a été utilisé pour marquer les cellules astrogliales, nestine pour les précurseurs neuraux, et Iba1 (ionized calcium binding adaptor molecule 1) pour les cellules microgliales.

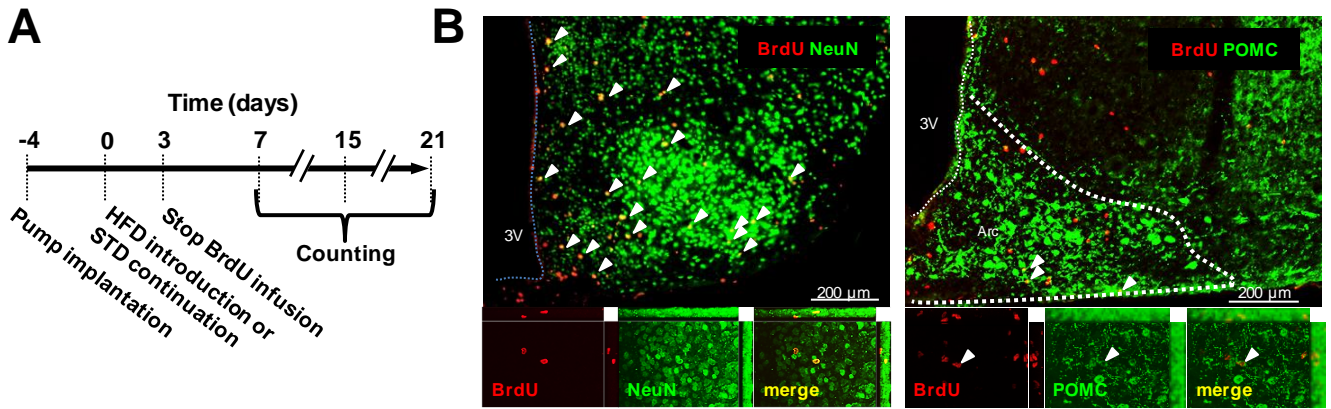


Figure 41: Protocole d'injection BrdU pour évaluation de la survie et différenciation des cellules néoformées.

(A) Le protocole est le même que pour la [figure 38A](#), mais ici l'objectif étant de connaître le taux de survie et le devenir des cellules prolifératives, le BrdU est infusé uniquement pendant la période d'augmentation de la prolifération, c'est-à-dire pendant les 3 premiers jours. A J3 le cathéter est coupé, et les souris sont sacrifiées à J7, J15 et J21. (B) Images représentatives des doubles immunohistochimies contre BrdU (en rouge) et NeuN (marqueur de neurone mature) et POMC (en vert).

Selon Gouazé et al., en soumission.

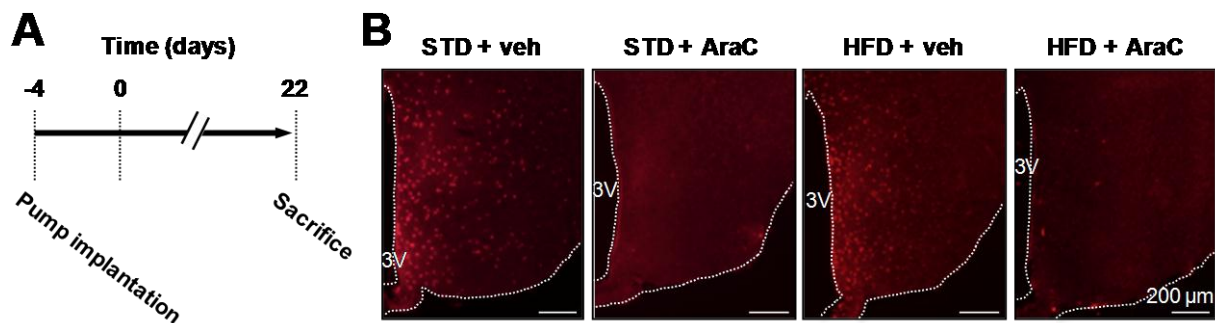


Figure 42: Protocole d'injection BrdU dans le but de connaître le rôle des cellules néoformées.

(A) Même protocole que pour la [figure 38A](#), mais cette fois les mini-pompes contiennent de l'araC en plus du BrdU. Les souris sont sacrifiées à J22. (B) Images représentatives des immunohistochimies BrdU (en rouge) chez les 4 groupes de souris : deux groupes sous régime STD injectés avec ou sans araC, et deux groupes sous régime HFD avec ou sans araC. Les groupes ayant reçu l'araC ne montrent plus de marquage BrdU+.

Selon Gouazé et al., en soumission.

1-4 Sélection, différenciation et maturation des cellules néoformées

Après prolifération les cellules sont sélectionnées et seules certaines cellules se différencient. Selon la littérature, cette différenciation est en grande majorité une différenciation neuronale, et les neurones vont ensuite devenir matures et commencer à synthétiser des neurotransmetteurs spécifiques. Pour connaître le taux de cellules sélectionnées, c'est-à-dire le taux de survie des cellules à long terme, et aussi pour connaître le pourcentage de cellules se différenciant en neurones, un nouveau protocole impliquant les mini-pompes osmotiques a été mis en place (**Figure 41**). Les cellules proliférant pendant les trois premiers jours de régime incorporent du BrdU, et les souris ont été sacrifiées à J3, J7, J15, et J21. A chaque temps, les cellules BrdU+ ont été comptées, ceci permettant d'établir un taux de survie des cellules néoformées et de comparer les groupes STD et HFD. Les temps d'expérience J7, J15, et J21, ont été choisis pour laisser aux nouvelles cellules le temps de se différencier et de maturer. Les doubles immunohistochimies BrdU et NeuN, qui est un marqueur de neurones matures, ont été réalisées au temps J7 et J15. A J15 et J21, ce sont des doubles immunohistochimies BrdU et POMC qui ont été faites, afin de connaître le nombre de neurones de l'ARC mûrissant en neurones anorexigènes, et de savoir si le régime gras avait un impact.

1-4 Rôle des cellules néoformées

Pour connaître le rôle des nouvelles cellules, la prolifération cellulaire a été bloquée en continu pendant 3 semaines grâce à l'arabinoside cytosine ou araC qui est un anti-mitotique. Cette molécule a été injectée en continu grâce à des mini-pompes osmotiques contenant également du BrdU (**Figure 42**). Pendant le traitement, la prise

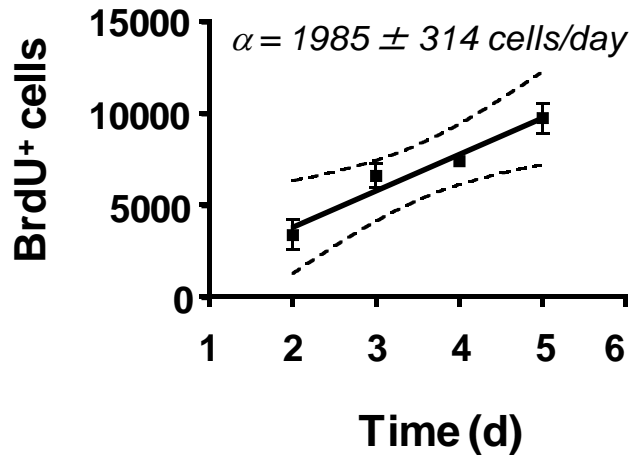


Figure 43: Renouvellement cellulaire basal dans l'hypothalamus adulte.

Selon Gouazé et al., en soumission.

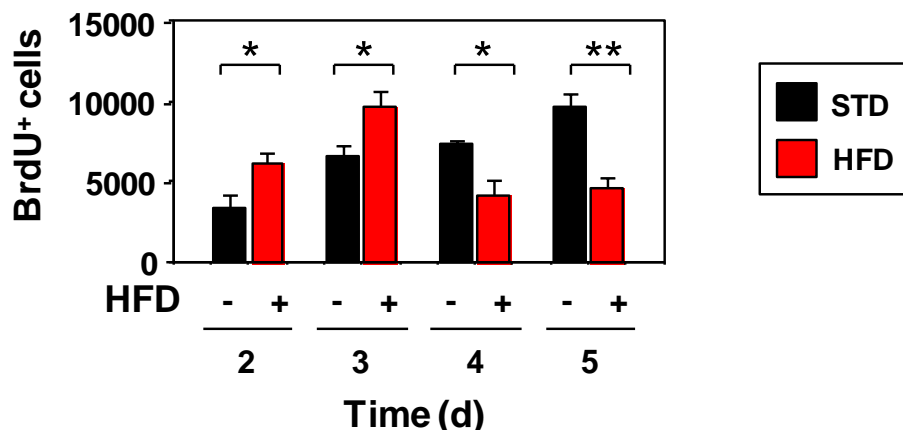


Figure 44: Effets du régime gras sur le renouvellement cellulaire hypothalamique adulte.

Selon Gouazé et al., en soumission.

alimentaire et le poids ont été suivis quotidiennement. Au bout des 22 jours, l'adiposité a été mesurée. UCP-1 (uncoupling protein 1) est une protéine trouvée dans les mitochondries du tissu adipeux brun. C'est une molécule impliquée dans la thermogénèse et son expression peut donc donner un indice indirect de l'état des dépenses énergétiques. L'expression du gène *ucp-1* issu des mitochondries du tissu adipeux brun a été mesurée par PCR dans le but d'avoir un indice indirect sur le rôle éventuel des nouvelles cellules sur la thermogénèse.

2- Résultats

2-1 Environ 2000 cellules se renouvellent en condition basale dans l'hypothalamus adulte

La quantification du nombre de cellules BrdU+ à J2, J3, J4 et J5 sous régime STD a permis de tracer une droite d'accumulation (**Figure 43**). En effet, le BrdU une fois incorporé dans la cellule répliquative va y demeurer tout le long de sa vie et ne disparaîtra qu'à la mort de la cellule, ou éventuellement (et plus rarement) en cas de dilution du BrdU suite à de nombreuses mitoses successives. Le calcul de la pente de cette droite permet d'établir qu'en conditions physiologiques, l'hypothalamus adulte produit environ 2000 nouvelles cellules par jour. Si on regarde la dispersion de ces cellules, on s'aperçoit qu'elles sont localisées à la fois dans la bordure du 3^{ème} ventricule et dans le parenchyme (**Figure 38B**).

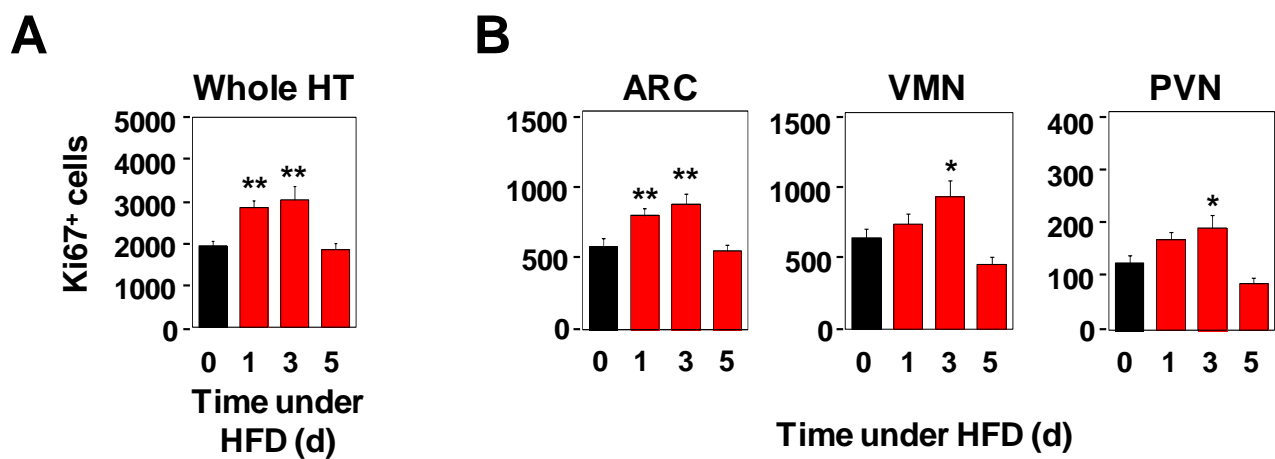


Figure 45: Effet du régime HFD sur la prolifération cellulaire hypothalamique.

(A) Le comptage des cellules Ki67+ a été réalisé dans l'hypothalamus entier. Le temps 0 montre le résultat obtenu en moyennement les groupes des souris STD à tous les temps (J1, 3, 5). (B) Même comptage dans 3 noyaux hypothalamique particulier: l'arqué, le ventromédian et le paraventriculaire.

Selon Gouazé et al., en soumission.

2-2 Le renouvellement cellulaire hypothalamique est rapidement modifié par le régime gras

La quantification des cellules BrdU+ aux mêmes temps que pour le régime STD nous a permis de mettre en évidence deux effets du régime HFD (**Figure 44**). On observe une augmentation du nombre de cellules positives à J2 et J3. A J4 et J5 en revanche, le nombre de cellules positives baisse en dessous du niveau des STD. Cela signifie qu'à partir de J4, on assiste à une disparition d'un certain nombre de cellules ayant été créées pendant les 3 premiers jours.

2-3 Le régime gras stimule rapidement et transitoirement la prolifération cellulaire dans tout l'hypothalamus

Le renouvellement cellulaire reflète l'équilibre entre prolifération et mort cellulaire. Les immunohistochimies avec un marqueur endogène de prolifération nous ont permis de déterminer l'effet du régime gras sur la prolifération hypothalamique adulte. Sous régime STD, environ 2000 cellules par jour sont Ki67+ dans l'hypothalamus adulte entier, ce qui correspond aux résultats obtenus avec le BrdU (**Figure 45A**). Le régime gras provoque une augmentation d'environ 1000 cellules positives par jour à J1 et J3, confirmant les résultats obtenus avec le BrdU. A J5, on retrouve un niveau de 2000 cellules prolifératives, suggérant qu'après trois jours de régime il n'y a plus de stimulation de la prolifération dans l'hypothalamus entier, mais qu'il n'y a pas de blocage de cette prolifération non plus. Cela signifie que la baisse du nombre de cellules BrdU+ observée à partir de J4 est due à une disparition massive des cellules.

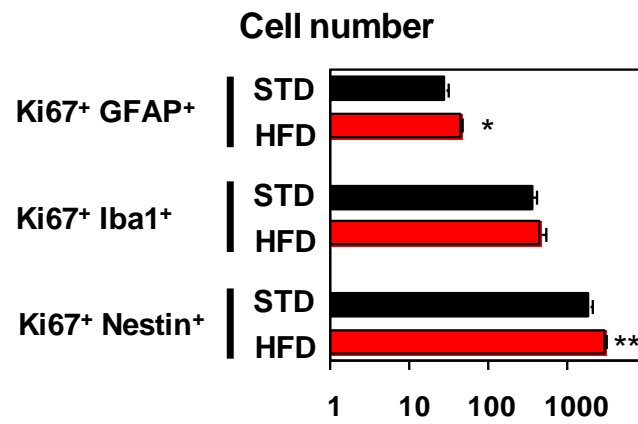


Figure 46: Origines des cellules néoformées.

Comptage des cellules doublement marquées pour Ki67 et GFAP/Iba1/Nestine à J3 dans l'hypothalamus total des souris STD vs HFD.

Selon Gouazé et al., en soumission.

Pour savoir si l'effet du régime gras est spécifique à un noyau hypothalamique en particulier, le comptage des cellules Ki67+ a été réalisé dans trois noyaux hypothalamiques, l'ARC, le VMN et le PVN (**Figure 45B**). Le pattern prolifératif est le même dans les 3 noyaux, suggérant qu'il n'y a pas de régiospécificité et que le régime gras provoque les mêmes changements de prolifération dans tout l'hypothalamus adulte.

2-4 Le régime gras favorise la prolifération des précurseurs neuraux et des cellules astrogliales

Pour connaître le type de cellules qui prolifèrent dans l'hypothalamus adulte, et voir l'effet du régime HFD sur ces populations, des doubles immunohistochimies contre Ki67 et des marqueurs spécifiques aux différents types cellulaires connus pour proliférer dans le cerveau adulte ont été réalisées au jour où la prolifération est la plus forte sous HFD : J3. Le comptage des cellules doublement marquées (**Figure 46**), met en évidence deux faits. Tout d'abord, la majorité des cellules prolifératives (85%), en condition basale comme sous régime gras, sont des cellules très immatures exprimant la nestine, marqueur de précurseurs neuraux. Une proportion des cellules répliquatives sont des cellules microgliales (17%), et une proportion plus faible (1.4%) sont des cellules astrogliales. Le régime gras ne provoque pas de changement au niveau de la proportion des différents types de cellules proliférant, en revanche, on observe une augmentation du nombre de cellules Ki67+/nestine+ et Ki67+/GFAP+. Le régime gras provoque une augmentation ciblée de deux types cellulaires qui sont les précurseurs neuraux et les cellules astrogliales.

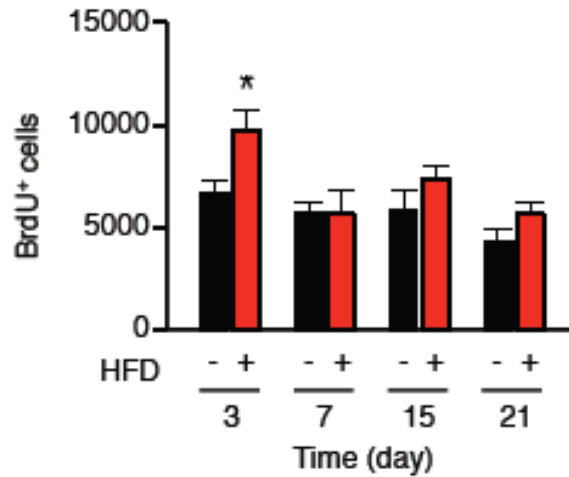


Figure 47: Survie des cellules néoformées.

Comptage des cellules ayant incorporé du BrdU pendant les 3 premiers jours sous régime STD vs HFD. Ce comptage a été réalisé à J3, J7, J15 et J21.

Selon Gouazé et al., en soumission.

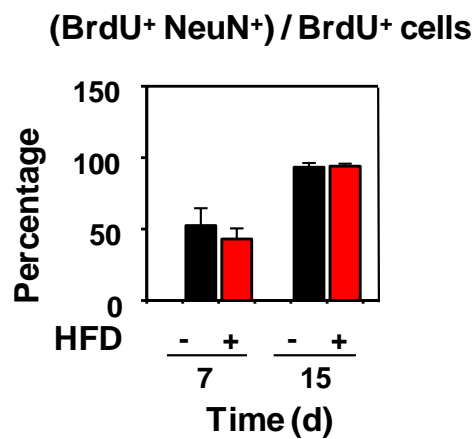


Figure 48: Différenciation neuronale des cellules néoformées.

Les résultats du comptage sont représentés en pourcentage de cellules doublement marquées BrdU+/NeuN+ par rapport au nombre total de cellules BrdU+, dans tous l'hypothalamus. Les cellules BrdU+ ont incorporé le BrdU jusqu'à J3. Le comptage est réalisé à J7 et J15, afin de laisser aux cellules le temps de se différencier.

Selon Gouazé et al., en soumission.

2-5 Le régime gras provoque une sélection rapide des nouvelles cellules mais n'a pas d'impact sur leur survie à long terme

Le régime gras provoque une augmentation du nombre de cellules BrdU+ dans l'hypothalamus à J3 de 2000 à 3000 cellules. Lorsque l'on compte les cellules à J7, J15 et J21, on s'aperçoit qu'il n'y a plus de différence entre les souris STD et les souris HFD. En effet entre J3 et J7, seules 58% des cellules survivent chez les souris HFD, alors que le taux est de 85% chez les STD (**Figure 45**). En revanche, les cellules survivantes à J7 demeurent dans l'hypothalamus au moins jusqu'à J21 dans le groupe STD comme dans le groupe HFD. Le régime gras provoque donc une augmentation importante du nombre de cellules BrdU+ pendant les trois premiers jours, puis les cellules subissent une sélection importante jusqu'à J7. Passé ce délai, le régime gras n'a plus d'effet sur la survie cellulaire.

2-6 Le régime HFD n'a pas d'effet sur la différenciation des nouvelles cellules

Les cellules nées pendant les trois premiers jours de régime deviennent majoritairement des neurones (**Figure 48**). A J7, 50% des cellules BrdU+ sont également NeuN+, chez les STD comme chez les HFD. A J15, toutes les cellules semblent s'être différenciées puisque c'est 93% des cellules BrdU+ qui expriment NeuN+, et ce dans les deux groupes de souris. Deux points sont à noter suite à cette expérience. Premièrement, dans l'hypothalamus adulte en conditions physiologiques les cellules produites sont majoritairement destinées à donner de nouveaux neurones. Deuxièmement, le régime gras

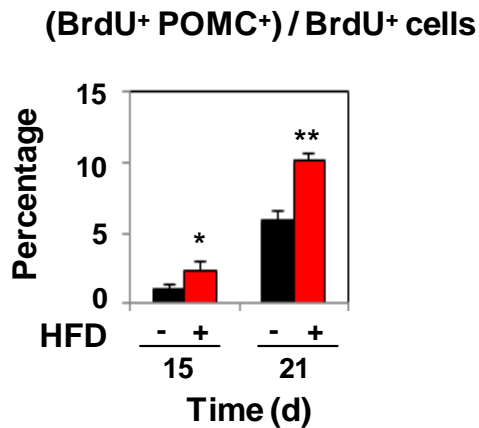


Figure 49: Maturation d'une partie des nouveaux neurones dans le noyau arqué.

Les résultats du comptage sont représentés en pourcentage de cellules doublement marquées BrdU+/POMC+ par rapport au nombre total de cellules BrdU+, uniquement dans l'ARC. Les cellules BrdU+ ont incorporé le BrdU jusqu'à J3. Le comptage est réalisé à J15 et J21, afin de laisser aux neurones le temps de maturer.

Selon Gouazé et al., en soumission.

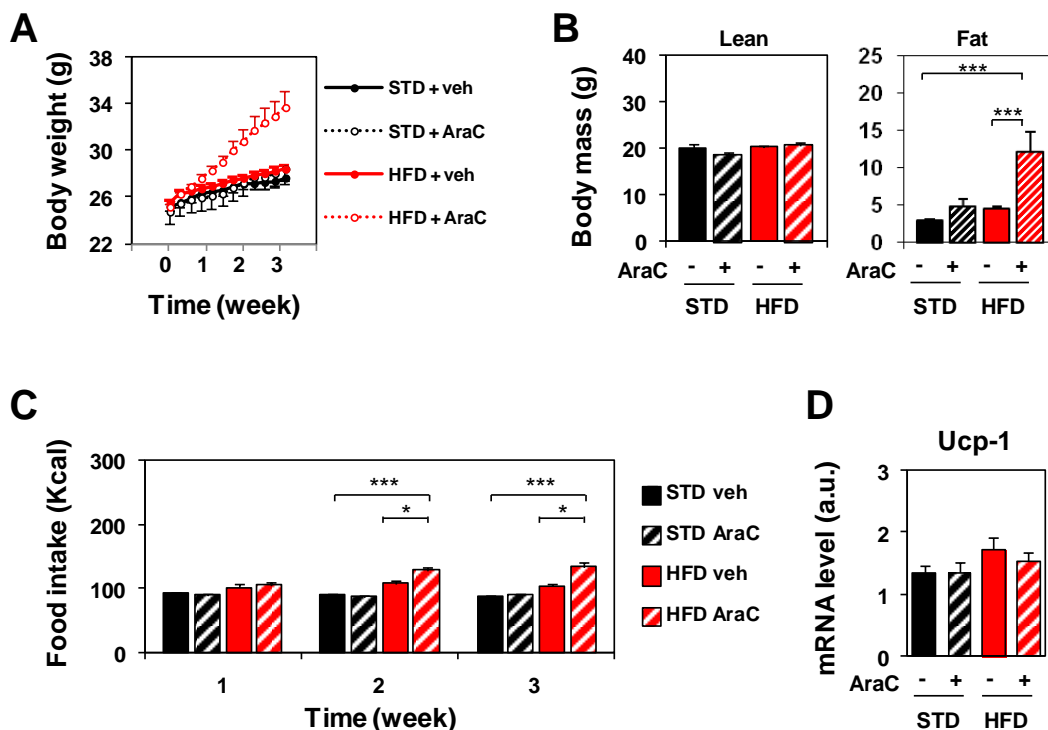


Figure 50: Rôle des cellules néoformées dans le maintien de l'homéostasie énergétique.

Pendant l'injection en continu de l'araC, le poids et la prise alimentaire des 4 groupes de souris ont été mesurés quotidiennement. Au 22^{ème} jour, l'adiposité et l'expression d'ucpl dans le tissu adipeux brun ont été mesurés.

Selon Gouazé et al., en soumission.

n'a aucun impact sur le devenir des nouvelles cellules puisqu'elles deviennent des neurones dans la même proportion que celle observée chez les souris STD.

2-7 Le régime HFD va promouvoir la maturation des neurones anorexigènes

Les neurones POMC font partie des populations cellulaires impliquées dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Les somas de ces neurones se situent exclusivement dans l'ARC. Chez les souris STD, 1.1% des cellules BrdU+ sont également POMC+ dans l'ARC à J15 (**Figure 49**). Ce taux augmente à 6% à J21, temps auquel les cellules sont supposées être devenues matures. Chez les souris HFD, le pourcentage de cellules doublement marquées par rapport au nombre de cellules BrdU+ totales est de 2.3% à J15 et 10.2% à J21, soit deux fois plus que chez les souris STD. Le régime gras a donc un impact sur la maturation des nouveaux neurones en favorisant la création de nouveaux neurones anorexigènes.

2-8 Les cellules néoformées permettent le maintien de l'homéostasie énergétique

Pour connaître le rôle des cellules néoformées sur la régulation de l'homéostasie énergétique, de l'araC qui est un anti-mitotique a été injecté en continu dans le cerveau des souris pendant 22 jours. L'araC n'a aucun effet sur les différentes composantes métaboliques mesurées chez les souris STD (**Figure 50**). Le poids des souris HFD+araC devient significativement plus important par rapport aux autres groupes 8 jours après le début du traitement et du régime (**Figure 50A**). Cette prise de poids s'explique par une

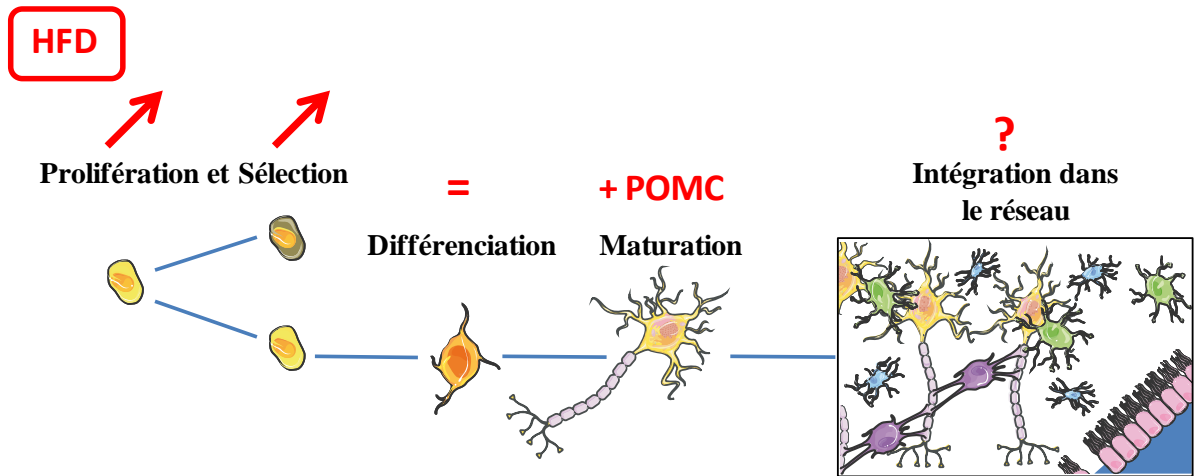


Figure 51: Effets d'un régime HFD sur les différentes étapes de la neurogenèse hypothalamique adulte.

augmentation importante de l'adiposité chez ces souris (**Figure 50B**). Afin de connaître la cause de cette prise de poids, nous avons mesuré la prise alimentaire tout le long de l'expérience, et évalué indirectement les dépenses énergétiques en mesurant l'expression d'*ucp1* dans le tissu adipeux brun. Les résultats montrent que cette prise de poids est due à une augmentation de la prise alimentaire à partir de la deuxième semaine d'expérimentation chez les souris HFD+araC (**Figure 50C**). En revanche, on n'observe pas de changement dans l'expression d'*ucp1* ce qui sous-entend que le traitement n'a pas d'effet sur la thermogénèse. Les cellules néoformées semblent donc essentielles pour maintenir une prise alimentaire normale sous régime HFD, mais ne semblent pas avoir d'impact sur la régulation des dépenses énergétiques.

3- Conclusions

Cette étude a permis de quantifier précisément le taux de renouvellement de ces cellules (2000 cellules/jour) dans l'hypothalamus adulte. Ce taux est plutôt bas en comparaison des autres structures prolifératives du cerveau (10000 cellules dans la SVZ). Ces cellules prolifératives sont majoritairement des précurseurs neuraux qui prolifèrent à la fois dans la bordure du 3^{ème} ventricule et dans tout le parenchyme. Ces cellules après sélection vont se différencier en neurones et une petite partie de ces neurones se situant dans l'ARC vont maturer en neurones POMC.

Sous régime gras, ce renouvellement cellulaire est rapidement modifié (**Figure 51**). La prolifération cellulaire est stimulée pendant les 3 premiers jours, puis il y a une forte sélection des cellules néoformées pendant la première semaine sous régime. Une fois les cellules sélectionnées, le nombre de cellules néoformées est le même que sous régime STD. Les cellules se différencient en neurones dans les mêmes proportions que sous régime STD, ce qui signifie que le régime gras n'a aucun effet

sur la différenciation cellulaire. En revanche, sous HFD, on observe une légère augmentation du nombre de neurones maturant en neurones anorexigènes POMC. Le blocage de la prolifération cellulaire ne provoque pas de changements sur l'équilibre énergétique des souris sous régime STD. En revanche, les souris sous HFD commencent dès la première semaine à développer une obésité et une hyperphagie. Cela sous-entend que les cellules néoformées sont essentielles au maintien de l'homéostasie. A une semaine après la prolifération, les nouvelles cellules ne sont pas encore toutes différenciées et matures. Il est donc possible que ces cellules aient un effet paracrine sur les cellules matures qui les entourent. A deux et trois semaines après leur naissance, une partie des cellules prolifératives de l'ARC deviennent des neurones POMC. Ces nouveaux neurones ne peuvent pas expliquer l'effet rapide du traitement, mais tendent à faire croire que l'éventuel effet paracrine anorexigène des cellules prolifératives immatures serait relayé dans le temps par l'installation de nouveaux neurones anorexigènes. Dans notre étude nous avons montré que la neurogenèse rapide hypothalamique lors de la réponse homéostatique à un régime gras est bénéfique pour le maintien de l'équilibre énergétique.

Article 2 – Soumis dans Journal of Neuroscience

Title

Hypothalamic cell renewal in adult mice is nutritionally regulated and controls the onset of obesity.

Abbreviated title

Food continuously shapes cellularity in feeding circuits

Authors

Gouazé Alexandra¹, Brenachot Xavier¹, Rigault Caroline¹, Krezymon Alice¹, Rauch Camille¹, Nédélec Emmanuelle¹, Lemoine Aleth¹, Gascuel Jean¹, Bauer Sylvian², Pénicaud Luc¹, Benani Alexandre¹

Affiliations

1. Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation; Unité Mixte de Recherche 6265-CNRS, 1324-INRA, Université de Bourgogne; Dijon, France

2. Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED) - INSERM U901, Marseille, France.

Correspondence

Correspondence should be addressed to Alexandre Benani, CSGA, 9E Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France. E-mail: alexandre.benani@u-bourgogne.fr

Acknowledgements

We thank Anne Lefranc for her technical assistance. This work was funded by CNRS, INRA, the Burgundy county (FABER-2009-9201-AAO036S00635 and PARI to L.P and A.B.), and the Société Française de Nutrition (to A.B.).

Manuscript information

Number of pages: 28

Number of figures: 5

Number of words in the abstract: 208

Number of words in the introduction: 483

Number of words in the discussion: 1461

The authors declare no competing financial interests

Abstract

Hypothalamus plays a crucial role in the control of energy balance. Interestingly, this site retains neuroproliferative potency in the adulthood. Recent studies have suggested that the constitutive hypothalamic cell renewal could be involved in the maintenance of energy homeostasis. To study this possibility, we examined hypothalamic cell renewal during the homeostatic response to dietary fat in mice. We found that high-fat diet (HFD) accelerated cell renewal in the hypothalamus through a local, rapid and transient increase in cell proliferation, which peaked after three days. Blocking HFD-induced cell proliferation by central delivery of an antimitotic drug prevented food intake normalization observed after HFD introduction and accelerated the onset of obesity, showing that HFD-induced neofomed brain cells support adaptive anorectic function. Interestingly, the percentage of newly generated neurons adopting a POMC-phenotype in the arcuate nucleus was increased by HFD feeding, indicating that maturation of neurons in feeding circuits is nutritionally regulated to adjust future energy intake. Altogether these results show that adult hypothalamic cell renewal is remarkably responsive to nutritional conditions, and constitutes a physiological trait that is required to prevent severe overweight when consuming HFD. Hence this report highlights the amazing plasticity of feeding circuits and brings new insight in our understanding of the nutritional regulation of energy balance.

Introduction

New neurons are continuously produced in the adult mammalian hypothalamus (Migaud et al., 2010). The ependymal layer surrounding the third ventricle and the median eminence form delimited neurogenic niches (Xu et al., 2005; Perez-Martin et al., 2010; Lee et al., 2012), as originally observed all along the ventricular neuroaxis (Weiss et al.,

1996). The hypothalamic parenchyma also contains scattered mitogenic activity supporting the generation of new functional neurons (Kokoeva et al., 2007; Pierce and Xu, 2010). However, the physiological functions of these newly generated neurons or neuronal progenitors in the adult hypothalamus remain uncertain. Nonetheless, the mitotic activity of hypothalamic progenitors is modulated by changes in environmental and physiological conditions (Huang et al., 1998; Fowler et al., 2002; Matsuzaki et al., 2009; Lee et al., 2012; McNay et al., 2012), and could be artificially stimulated by administration of growth factors or hormones, being thus endogenous mediator candidates of such changes (Pencea et al., 2001; Kokoeva et al., 2005; Xu et al., 2005; Perez-Martin et al., 2010). Hence, constitutive neurogenesis in the adult hypothalamus could play a role in maintaining the long-term stability of the inner milieu, and could serve as an adaptive reservoir that finely adjusts physiological processes to long-lasting environmental changes.

Recent studies have reported a role of hypothalamic neurogenesis in the control of energy homeostasis. Centrally administered Ciliary neurotrophic factor (CNTF) induced cell proliferation in feeding centers of the murine hypothalamus, which is required for the long-term anti-obesity effect of CNTF, suggesting that hypothalamic neurogenesis in adult mice could play a role in energy balance (Kokoeva et al., 2005). Indeed, under progressive neurodegeneration, orexigenic neurons of the hypothalamus spontaneously regenerate to preserve the integrity of feeding circuits and to maintain normal eating behavior (Pierce and Xu, 2010). The permanent turn-over of neurons located in the arcuate nucleus of the hypothalamus is suppressed in obese mice (McNay et al., 2012), suggesting that lack of remodeling in feeding circuits could contribute to the development of obesity. On the other hand, cell proliferation in the ventrobasal hypothalamus supports energy storage during high-fat diet feeding and intensifies weight gain, suggesting that neurogenesis in the hypothalamus exerts specific function depending on its location (Lee et al., 2012).

A better understanding of the nutritionally-regulated turn-over and maturation of newborn neurons in the adult hypothalamus could help finding novel therapeutic strategies to fight against overweight, which is dramatically on the rise in the world, and constitutes a major risk factor for a number of chronic diseases, including diabetes and cardiovascular diseases. Thus, we performed a quantitative mapping of the hypothalamic cell renewal during the time-course of diet-induced obesity in a murine model. We also phenotyped newborn cells and assessed their role in energy balance. Here, we report that high-fat diet rapidly stimulated proliferation of neuronal progenitors in the whole hypothalamus, and drove the fate of newborn neurons, as an homeostatic response in the long-term control of food intake.

Methods

Animals. Seven weeks-old male C57BL/6 mice were obtained from Harlan Laboratories and housed one per cage at 21-22°C on a 12/12-hour light/dark cycle. Before experiments, mice were acclimated for one week. They had with free access to food and water. Food was a standard pelletized rodent diet (#A04; Safe) or high-fat diet (customized semi-synthetic food; Safe). Food was daily renewed at 09h00. All protocols involving animals were reviewed by our local ethic board, and were in strict accordance with European Community guidelines (directive 86/906).

Intracerebroventricular drugs administration. Intracerebroventricular (icv) cannulation and osmotic minipump implantation were performed at the same time. Under isoflurane anesthesia, mice were stereotactically implanted with a cannula (Brain infusion kit III; Charles River) into the right lateral ventricle (anteroposterior -0.2 mm and lateral +1.0 mm to Bregma ; dorsoventral -1.9 below skull). The cannula was connected to an

osmotic minipump (model 1007D for 1 week infusion or less, model 2004 for 1 month infusion or less; Charles River) via vinyl tubing (inner diameter 1.22 mm; Alzet) filled with vehicle (NaCl 9‰; Sigma) as fully described elsewhere (Kokoeva et al., 2005). The 65 mm length of tubing allows 2 days of vehicle infusion after the surgery, before the minipump content reaches the ventricular system. Minipumps were filled either with vehicle, Bromodeoxyuridine (BrdU, 1 µg/µl in vehicle; Sigma), Arabinofuranosyl Cytosine (AraC, 6.66 µg/µl in vehicle; Sigma), or a mix of BrdU and AraC. Before implantation, minipumps were primed overnight at 37°C in NaCl 9‰. After surgery, mice recovered normal food intake within 48 hours (\approx 0.5 kcal/d/g of body weight). Starting time of experiments (T0, e.g. HFD introduction) was set at 4 days post-surgery.

Tissue processing and reagents for immunohistochemistry. For histological analysis, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine/xylazine mix (10 µl/g of mouse; 100/10 mg/kg), and perfused transcardially with 9‰ NaCl containing 250 U Heparin (Sanofi), followed by fixative solution (4% formaldehyde solution; Sigma). Brain were dissected, immersed overnight in fixative solution, transferred to 30% sucrose (Sigma) for 24 or 48 hours, and sectioned with a cryostat (Leica) in the coronal plane (sections thickness = 25 µm). Sections were collected in four series (every fourth in one aliquote) in cryoprotectant (30% v/v glycerol, 30% v/v ethylene glycol, 154 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7.5), and stored at -20°C until use. Free-floating sections were probed using the following primary antibodies and working concentrations: rat anti-BrdU (1:100; #OBT0030; AbD Serotec), rabbit anti-GFAP (1:800; #18-0063; Molecular Probe), rabbit anti-Iba1 (1:4000; CP 290A; Biocare Medical), mouse anti-Ki67 (1:400; 550609; BD Biosciences), mouse anti-Nestin (1:250; ab6142; Abcam), mouse anti-NeuN (1:100; MAB377; Chemicon), rabbit anti-POMC precursor (1:4000; H-029-30; Phoenix Pharmaceuticals). Fluorescent stainings were made with Alexafluor 488 goat anti-mouse

(1:500; #A-11029; Molecular Probe), Alexafluor 488 goat anti-rabbit (1:500; A-11034; Molecular Probe), Alexafluor 555 goat anti-mouse (1:250; #A-21424; Molecular Probe), or Dylight649 donkey anti-rat antibody (1:250; #712-496-153; Jackson Immunoresearch). Ki67 detection was made using biotinylated goat anti-mouse antibody (1:200), peroxidase-conjugated avidin, and diaminobenzidine using the Vectastain[®] ABC kit (Vector Laboratories).

Antigen unmasking procedure and immunolabeling. For BrdU detection, sections were first incubated in 50% formamide/2xSSC at 65°C for 2 hours, rinsed in 2xSSC at room temperature (RT) for 5 minutes, incubated in 2N HCl at 37°C for 30 minutes, and rinsed in 0.1M sodium borate (pH 8.5) at RT for 10 minutes. For Ki67 detection, sections were first incubated in citrate solution at 95°C for 10 minutes. For other antigen detections, no specific unmasking procedure was required. All sections were rinsed in PBS (pH 7.4), and blocked with 3% normal goat serum in PBS containing 0.5% Triton X-100 for 1 hour. For POMC neurons labeling, the blocking solution was 3% normal donkey serum in PBS containing 0.5% Triton X-100. Sections were then incubated overnight with primary antibody diluted in the blocking solution at 4°C, or at RT for Ki67 labeling. Sections were then washed in PBS, and incubated with secondary antibody in the blocking solution at RT for 2 hours. For double-labeling, a two-steps procedure was performed. Sections were finally washed in PBS, mounted on SuperFrost[®] Ultra Plus[®] slides (Thermo-Fisher Scientific), and coverslipped over Fluorescence Mounting Medium (Dako).

Imaging and cell counting. Labeled cells were counted in the whole hypothalamus, from -2.70 mm to +0.58 mm from Bregma, according to a mouse brain

atlas (Franklin and Paxinos, 2007). For Ki67 labeling, cells were also counted in three hypothalamic nuclei: the arcuate nucleus (Arc), the ventromedian nucleus (VMN), and the paraventricular nucleus (PVN). To avoid oversampling, every fourth coronal section (25 μm thickness) throughout the hypothalamus was stained and analyzed with a microscope (Axio Imager 2, Zeiss). The entire hypothalamic area was scanned automatically using a motorized stage, acquired at a x40 magnification, and the mosaic image was generated from individual tiles with the Axiovision software and the MosaiX module (Zeiss). Cell counting was performed manually on mosaic images with the assistance of ImageJ software. To obtain the total cell number of one animal, numbers of all affiliated sections were tallied, and multiplied by 4 according to the section sampling interval. Double fluorescence-labeled sections were also examined under structured illumination with the Apotome, to generate optical sections.

Body composition analysis. For the assessment of adiposity, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine/xylazine mix (10 $\mu\text{l/g}$ of mouse; 100/10 mg/kg) in order to remove stainless steel cannula. Then, animals were placed in the scanner (EchoMRI-700).

Tissues collection. After body composition analysis, animals were killed and dissected to collect brown adipose tissue (BAT), inguinal and retroperitoneal white adipose tissues (subcutaneous and visceral WAT, respectively). BAT was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. WAT depots were weighted.

RNA extraction and processing. BAT were lysed and homogenized in 1 mL lysis buffer (QIAzol, Qiagen) using the TissueLyser system (Qiagen) and 5 mm stainless steel beads (Qiagen). Total RNAs were extracted using a phenol/chloroform isolation procedure, precipitated with isopropanol washed 3 times with 70% ethanol and resuspended with 50 μ l water. Aliquots of each extract were checked for RNA purity and integrity with the Experion electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories) and the Experion RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad Laboratories). RNAs concentrations were determined using the Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific).

Real-time PCR analysis. Reverse transcription was performed with 500 ng of total RNAs, using the High-Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystem), as indicated by the manufacturer. For qPCR, the Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) was used. Each reaction contained 1 μ l of cDNAs diluted 1:10 and 200 nM gene specific intron-spanning primers. The sequences of the primers used for ucp1 amplification were 5'-CAGTGTCCAGCGGGAAGGT-3' and 5'-TCCAAGCCAGGATGGTGAAC-3'. Polr2a was used as an endogenous control. The sequences of the primers were 5'-GCCAAAGACTCCTTCACTCACTGT-3' and 5'-TGTATGTTCCAAGCGGCAAAA-3'. Reaction mixtures were loaded into a 96-wells plate, which was placed in a thermal cycler (model Step-One Plus, Applied Biosystems). PCR conditions were 20 s at 95°C, followed by 40 cycles of 3 s at 95°C and 30 s at 60°C. Raw fluorescence data were collected through the PCR using the SDS 2.3 software (Applied Biosystems), which further generated threshold cycles "Ct" with automatic determination of both baseline and threshold. Data were therefore analyzed with RQ Manager 1.2 software (Applied Biosystems) for relative quantitation. Relative quantitation of gene expression (RQ) was based on the comparative Ct method using the equation $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, where $\Delta\Delta Ct$ for one gene target was its own Ct variation subtracted from a

calibrator sample and normalized with an endogenous control. Precisely, polr2a was defined as the endogenous control, and one control sample was arbitrary chosen as a calibrator. After amplification, a melting curve was plotted to check the specific T_m of each PCR product.

Statistical analysis. All data are expressed as means. Error bars indicate standard errors of the mean (SEM). Multiple comparisons of groups were carried out by a one-way analysis of variance (ANOVA) using Prism 4.0 software (GraphPad Software). Post hoc Newman-Keuls test was used to compare groups when main effects reached significance. Unpaired t test was used when two groups were compared. Significant difference was noted *, **, or *** on the graphic representation when p value was < 0.05, 0.01, and 0.001, respectively.

Results

Constitutive cell renewal in the adult hypothalamus is rapidly modified by HFD feeding.

To detect constitutive cell renewal in the hypothalamus, and explore the effects of HFD feeding on it, we used a very sensitive *in situ* assay of cell proliferation based on central, continuous delivery of the proliferative marker 5'-Bromo-2-deoxyuridine (BrdU), as previously described (Pencea et al., 2001; Kokoeva et al., 2005, 2007). Animals were implanted with 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BrdU-filled osmotic minipump connected to a cannula targeting

the brain ventricular system. BrdU was infused at a rate of 0.5 μ l/h, diffusing through the entire hypothalamic parenchyma after 3-4 days (Kokoeva et al., 2005, 2007). Mice were killed 2, 3, 4 or 5 days after the diffusion period (Fig. 1A), and their brains were collected and processed for BrdU immunohistochemistry (Fig. 1B). In control mice, the number of BrdU-positive cells in the hypothalamus regularly increased over time, from 3374 ± 822 at day 2 to 9726 ± 803 at day 5 (Fig. 1C). Linear regression analysis indicated an increment of 1985 ± 314 cells per day over the period analyzed, confirming the existence of constitutive cell proliferation in the adult hypothalamus. In HFD-fed mice, the number of BrdU-positive cells in the hypothalamus showed dual variation, being first increased over controls at day 2 (STD: 3374 ± 822 vs HFD: 6178 ± 602 ; $p < 0.05$), and day 3 (STD: 6594 ± 662 vs HFD: 9706 ± 934 ; $p < 0.05$) (Fig. 1D), then reduced at day 4 (STD: 7383 ± 249 vs HFD: 4137 ± 908 ; $p < 0.05$), and day 5 (STD: 9726 ± 803 vs HFD: 4649 ± 559 ; $p < 0.01$). Thus, HFD feeding caused rapid and biphasic modification of cell renewal in the murine hypothalamus, with an initial over-production of BrdU-positive cells up to 3 days after HFD introduction, followed by a dramatic 50% reduction.

Short-term HFD feeding stimulates cell proliferation in the hypothalamus.

The increased accumulation of BrdU-positive cells observed in the hypothalamus of adult mice as soon as 2 days after HFD introduction could be the consequence of enhanced cell proliferation. We thus quantified proliferating cells using immunohistochemistry against Ki67, a marker expressed during all phases of the cell cycle except G₀, in animals that were killed at 0, 1, 3 or 5 days after HFD introduction (Fig. 2A). Control mice exhibited 2099 ± 118 Ki67-positive cells in the whole hypothalamus (Fig. 2B), consistent with the value previously calculated with linear regression for accumulation of BrdU-positive cells (see above). In HFD-fed mice the

number of Ki67-positive cells was increased at day 1 (2848 ± 169 ; $p < 0.05$ relative to STD), and at day 3 (3035 ± 323 ; $p < 0.05$ relative to STD), but returned to control values at day 5 (1857 ± 145 ; $p > 0.05$ relative to STD). Therefore, these data indicate that HFD feeding acutely stimulates cell proliferation within the hypothalamus, consistent with the data obtained with BrdU infusion. To test whether HFD-induced cell proliferation occurred in hypothalamic nuclei involved in the control of energy homeostasis, we counted Ki67-positive cells in the arcuate nucleus (Arc), the ventromedian nucleus (VMN), and the paraventricular nucleus (PVN) (Fig. 2C). Number of Ki67-positive cells was increased at day 1 in the Arc of HFD-fed mice (STD: 576 ± 49 vs HFD: 782 ± 51 ; $p < 0.05$). At the same time, Ki67-positive cells were also higher in VMN and PVN of HFD-fed mice, but these effects did not reach significance. Nevertheless, number of Ki67-positive cells was significantly increased in all tested hypothalamic nuclei when mice were fed with HFD for 3 days. No difference was seen at 5 days. Thus, HFD feeding stimulated cell proliferation during the first three days only, an effect that was first detected in the Arc, and later occurred in the VMH and the PVN.

Blocking brain cell proliferation causes overweight during high-fat diet feeding.

To assess the role of neofomed cells on energy homeostasis, we permanently blocked the production of new brain cells in adult mice by central administration of the anti-mitotic Arabinofuranosyl Cytosine (AraC) as detailed elsewhere (Kokoeva et al., 2005). Body weight and food intake were monitored during three weeks in mice kept on standard or high-fat diet (Fig. 3A). AraC ($40 \mu\text{g}/\text{day}$) was continuously delivered by osmotic minipump connected to the brain ventricular system. BrdU ($12 \mu\text{g}/\text{day}$) was co-administered in some animals to check the efficiency of cell proliferation interruption. Post-mortem inspection of brains by immunohistochemistry revealed that AraC treatment totally inhibited the apparition of neofomed BrdU-positive cells in the hypothalamic

parenchyma in standard and high-fat diet fed mice as well (Fig. 3B). Nevertheless, chronic AraC delivery did not alter body weight in control animals (STD+veh: 27.69 ± 0.44 g vs STD+AraC: 29.03 ± 0.73 g after 3 weeks; $p > 0.05$) (Fig. 3C, 3D), suggesting that the dosage and the procedure did not produce toxic effect, as previously reported (Kokoeva et al., 2005). In contrast, body weight of HFD-fed animals treated with AraC was increased compared to others groups, and these mice became significantly heavier as soon as 8 days after HFD introduction compared to HFD-fed mice treated with vehicle (HFD+veh: 26.89 ± 0.29 g vs HFD+AraC: 28.22 ± 0.54 g; $p < 0.05$) (Fig. 3C). After three weeks on HFD, body weight gain of mice treated with AraC was more than 3-times higher relative to vehicle-treated mice (HFD+veh: $+3.06 \pm 0.21$ g vs HFD+AraC: $+10.38 \pm 1.72$ g; $p < 0.05$) (Fig. 3D). No difference was seen regarding the body length of animals (Fig. 3 E). At the end of the AraC treatment, body composition was examined in some animals. AraC treatment increased the fat mass of HFD-fed animals (HFD+veh: $+4.49 \pm 0.26$ g vs HFD+AraC: $+12.27 \pm 2.49$ g after 3 weeks; $p < 0.05$) (Fig. 3 F), affecting both subcutaneous and visceral fat depots (Fig. 3G). Thus, blocking brain cell proliferation accelerates the onset of diet-induced obesity in mice, suggesting that cell renewal in the adult hypothalamus could exert protective functions against excessive body weight gain under detrimental nutritional conditions.

We also examined food intake regulation in AraC-treated mice receiving the standard or the HFD (Fig. 3H). AraC treatment did not affect basal food intake in control mice fed the standard diet at any time point examined, which was around 30 g per week. HFD introduction lead to a decrease in food intake during the first week that was similar in both mice treated or not with AraC, corresponding to an homeostatic response to increased dietary fat in order to restore normal energy intake (Butler et al., 2001; Benani et al., in press). In HFD-fed mice receiving vehicle, food intake was still reduced after 2 or 3 weeks of HFD feeding (Fig. 3H). On the other hand, food intake increased in HFD-fed

mice treated with AraC, reaching levels similar to that observed in control animals. Therefore, AraC treatment prevented the long-term reduction of food intake that normally occurred in animals fed a HFD, suggesting that cell renewal in the adult hypothalamus participates in the long-term regulation of food intake.

We finally examined the expression of Ucp-1 in brown adipose tissue (BAT), taken as a marker of thermogenesis. At the end of the experiment, total RNA were extracted from BAT biopsies and abundance of Ucp-1 mRNA was analyzed by qPCR. Expression of Ucp-1 was similar in all groups, suggesting that increased food intake in AraC-treated HFD-fed mice was not compensated by higher energy expenditure through adaptive thermogenesis.

Proliferating cells in response to HFD feeding are mostly neural precursors.

Numerous cell types exhibit proliferative properties in the adult hypothalamus, including differentiated cells such as astrocytes, tanycytes, microglia, and endothelial cells, and immature cells such as neural progenitors (Alonso et al., 2005; Kokoeva et al., 2007; Matsuzaki et al., 2009; Perez-Martin et al., 2010; Lee et al., 2012). In order to identify the phenotypes of cells that proliferate in response to HFD feeding, we used double immunofluorescence-labeling with antibodies against Ki67, to detect dividing cells, and against GFAP, Iba-1, and Nestin, to detect astrocytes, microglia, and neural progenitors, respectively, in animals killed after 3 days of HFD feeding (Fig. 4A). In the whole hypothalamus of control animals, the number of positive cells was 28 ± 3 for Ki67-GFAP, 354 ± 45 for Ki67-Iba-1, and 1893 ± 170 for Ki67-Nestin (Fig. 4B). Thus, in the adult hypothalamus of naïve mice, proliferative cells are mostly neural precursors, which might likely support the constitutive neurogenesis. In the whole hypothalamus of HFD-fed animals, these numbers were 43 ± 4 for Ki67-GFAP, 459 ± 81 for Ki67-Iba-1, and $2963 \pm$

198 for Ki67-Nestin. A significant increase in the number of Ki67-GFAP-positive and Ki67-Nestin-positive cells was found in HFD-fed mice ($p < 0.05$, relative to control mice), suggesting that proliferating cells in response to HFD feeding were mostly neural precursors, and glia to a lesser extent.

HFD feeding did not alter the neuronal fate of newborn cells in the adult hypothalamus.

We next assessed survival and fate of newborn, BrdU-positive cells in the hypothalamus at 1, 2 and 3 week(s) after HFD introduction (Fig. 5A). Mice were implanted with osmotic minipumps to centrally deliver BrdU, and minipumps were removed three days after HFD introduction. Thus, neofomed cells were labeled with BrdU exclusively during the HFD-induced proliferative period (Fig. 5A). In control mice, the number of BrdU-positive cells in the entire hypothalamus progressively decreased from 6594 ± 662 at day 3, to 4234 ± 654 at day 21 (Fig. 5B). Thus, approximately 35% of the newly generated cells observed at day 3 are eliminated over the subsequent weeks in normal conditions. A similar trend was observed in HFD-fed mice, where the number of BrdU-positive cells decreased from 9706 ± 934 at day 3 to 5644 ± 568 at day 21, reflecting a 40% elimination rate over the 3-week period examined. However, the decline in newly generated cells occurred much more rapidly in HFD fed mice. Indeed, numbers of BrdU-positive cells were already strongly reduced at day 7 compared to day 3 in animals fed a HFD vs control animals (5627 ± 1172 vs 5653 ± 541 BrdU-positive cells at day 7, respectively), representing respectively an elimination rate of 40% vs 15% of the newly generated cells. These data suggest that HFD strongly accelerated hypothalamic cell renewal, without altering long-term survival of newly generated neurons.

The phenotype of BrdU-positive cells was then examined by double immunofluorescence-labeling using an antibody against the Neuronal Nuclei marker (NeuN) to reveal mature neurons (Fig. 5C). After 1 week, $52.6 \pm 12.0\%$ of the BrdU-positive cells were also stained with NeuN in control mice (Fig. 5D). This proportion was $93.4 \pm 2.8\%$ after 2 weeks, indicating that the majority of newly generated cells in the adult hypothalamus differentiate into neurons in control conditions. In HFD-fed mice, NeuN-BrdU-positive cells corresponded to $43.1 \pm 7.4\%$ and $94.0 \pm 1.9\%$ of total BrdU-positive cells, after 1 and 2 week(s) respectively, being thus similar to what occurs in standard conditions. Therefore, these data indicate that HFD does not alter the ability of newly generated cells to differentiate along the neuronal lineage.

HFD augments the production of arcuate POMC neurons in the adult hypothalamus.

Newly generated neurons in the adult hypothalamus could further mature into numerous specialized neuronal subtypes that compose this brain region. Among them, arcuate pro-opiomelanocortin (POMC) neurons plays a fundamental role in the regulation of appetite, and the adaptive metabolic response to excess caloric consumption (Cone, 2005; Butler, 2006). To test whether newborn cells differentiated into POMC neurons, BrdU-positive cells located in the arcuate nucleus were further characterized using an antibody against the POMC precursor peptide (Fig. 5E). Among total arcuate BrdU-positive neofomed cells, POMC-BrdU-positive cells represented $1.1 \pm 0.3\%$ after 2 weeks, and $6.0 \pm 1.1\%$ after 3 weeks in control mice (Fig. 5F). In HFD-fed mice, this proportion was significantly higher ($p < 0.05$ relative to control), reaching $2.3 \pm 0.3\%$ after 2 weeks, and $10.2 \pm 0.6\%$ after 3 weeks. Thus, a greater number of newborn cells mature into POMC neurons in the arcuate nucleus of HFD-fed mice, suggesting that the fate specification of POMC neurons is nutritionally regulated.

Discussion

Using chronic brain delivery of BrdU combined with post-mortem immunohistochemical analysis of BrdU-labeled cells, we characterized cell turn-over of the murine adult hypothalamus. We found that approximately 2,000 new cells are generated every day in the adult hypothalamus. By comparison, cell renewal in neurogenic structures of the adult forebrain is much higher, 5-fold more in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus (Cameron and McKay, 2001), and 15-fold more in the subventricular zone (SVZ) of the lateral ventricles (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). We further found that most of the proliferative cells in the adult hypothalamus are nestin-positive neural progenitors (around 95%), and that the majority of newly generated cells differentiate into NeuN-positive cells, confirming previous studies indicating constitutive neurogenesis in the hypothalamus of adult mice (Kokoeva et al., 2005, 2007; Pierce and Xu, 2010; Lee et al., 2012; McNay et al., 2012). Post-natal neurogenesis in this area appears widely conserved throughout species (Fowler et al., 2002; Rankin et al., 2004; Simmons et al., 2008; Matsuzaki et al., 2009; Migaud et al., 2011). We observed that hypothalamic cell proliferation occurs in the ependymal layer of the third ventricle as finely described (Xu et al., 2005; Lee et al., 2012), and in the parenchyma as well, in agreement with others (Kokoeva et al., 2005, 2007; Pierce and Xu, 2010). Newborn neurons found in the adult hypothalamic parenchyma are thought to derive from tanycytes, the hypothalamic radial glia like-cells located in the ependymal layer (Xu et al., 2005; Lee et al., 2012). Moreover, doublecortin (Dcx), a protein found exclusively in migrating neurons (Gleeson et al., 1999), has been observed in scattered cells in the hypothalamus (Kokoeva et al., 2007; Werner et al., 2012), suggesting that immature neurons could migrate through the hypothalamus before proper maturation. Regarding the fate of adult neoformed hypothalamic cells, we found that nearly all surviving cells after three weeks differentiate into neurons. Constitutive neurogenesis in the adult hypothalamus might

serve to replace degenerative cells (Pierce and Xu, 2010), and to adapt neuronal circuits to ever-changing environmental and physiological conditions (Matsuzaki et al., 2009; Kempermann, 2011).

The main findings of the present study relate to the effects of dietary fat on hypothalamic cell turn-over. We demonstrated that HFD markedly and transiently increases cell proliferation in the hypothalamus after only 24 hours. This results in a massive addition of newly generated cells within 3 days of exposure to HFD. So far, responses to exogenous mitogens were investigated in the hypothalamus after three days or more, but never earlier (Pencea et al., 2001; Kokoeva et al., 2005; Xu et al., 2005; Perez-Martin et al., 2010). Likewise, proliferation of neural progenitors has been evidenced after five days in heat-acclimated rats (Matsuzaki et al., 2009). Our results suggest that physiological regulation of neurogenesis in the hypothalamus exerted by dietary fat is a particularly fast event. The HFD-stimulating effect on cell proliferation is transient, lasting only three days, and is followed by a brutal drop in neoforformed cell number. The rapid disappearance of such high number of newly generated cells is puzzling, and the mechanisms at play here remain to be investigated. A possibility is that many of the newly generated cells undergo apoptotic cell death almost immediately after birth, while others survive. Similar cascade of events leading to the selection of newborn cells has been found during learning and sensory-experience (Yamaguchi and Mori, 2005; Dupret et al., 2007). Collectively, these data suggest that newly generated cells in the hypothalamus are natively under selection pressure, similar to other brain regions subjected to adult neurogenesis (Dupret et al., 2007). Interestingly, HFD seems to strongly accelerate the kinetics of these events compared to control animals, without altering the long-term persistence of BrdU-labeled cells. Thus, in agreement with studies describing adaptive physiological responses to increased dietary fat (Ziotopoulou et al., 2000; Benani et al., in press), this suggests that HFD could acutely mobilize adaptive processes at the cellular level as well.

The HFD-induced stimulation of cell proliferation is visible throughout the hypothalamic parenchyma, even if the arcuate nucleus is affected first. Previous studies have also reported widespread distribution of BrdU-positive cells in the hypothalamus when pharmacologically stimulated (Pencea et al., 2001; Kokoeva et al., 2005; Xu et al., 2005; Perez-Martin et al., 2010). Hence, regulation of neural progenitors proliferation in this area is obviously not restricted to any particular nucleus. Despite this apparent lack of regional specificity within the hypothalamus, the proliferative response to HFD is probably site-specific at the brain scale since the dentate gyrus of the hippocampus, a highly proliferative brain area, was not affected in this time frame.

To assess the function of newborn cells in energy homeostasis, we globally inhibited cell proliferation in the brain using the antimitotic AraC. This drug was administered chronically as previously described (Kokoeva et al., 2005). Remarkably, AraC treatment had no effect in mice under standard diet, but accelerated the onset of obesity when energy balance was disrupted by HFD introduction. This suggests that HFD-induced cell proliferation is involved in the homeostatic response to dietary fat, whereas constitutive cell renewal might not exert a fundamental function in energy balance regulation. On the other hand, long-lasting inhibition of constitutive cell renewal (i.e. more than three weeks) might have impaired energy balance too. Indeed, constitutive cell renewal in the hypothalamus seems to be required to regenerate neuronal networks during neurodegenerescence (Pierce and Xu, 2010). Site-specific manipulation of cell proliferation is technically challenging (Lee et al., 2012), and the intracerebroventricular route that we used to abolish brain cell proliferation makes it hard to determine that the hypothalamus is the only contributor to the observed response. However, our data converge on hypothalamic cell renewal as being chiefly involved in the homeostatic response to HFD, consistent with the well-demonstrated role of the hypothalamus in energy balance regulation.

Mechanisms by which proliferative cells could contribute to the homeostatic response to dietary fat are not established here. Because AraC causes overweight in HFD-fed mice after only one week, this time frame is hardly compatible with an effect requiring functional integration of newly generated neurons into existing neural circuits. Actually, newborn neurons are not integrated into circuits before several weeks (Abrous et al., 2005). Instead, the effects of newly generated cells could be mediated by their secretory activity. Surge of secreted mediators has been recently reported during short-term HFD feeding (Thaler et al., 2012). Interestingly, some extracellular cues that promote neurogenesis such as insulin-like peptides, BDNF, and CNTF, also reduce food intake and body weight (Kokoeva et al., 2005; Noble et al., 2011; Fernandez and Torres-Aleman, 2012). A variety of cytokines share the same functions (Plata-Salaman, 2001; Bauer, 2009; Ekdahl, 2012). Importantly, both the immature neural progenitors (Erlandsson et al., 2006; Lin et al., 2007; Nishimoto et al., 2007) and the reactive glia (Caruso et al., 2012; Thaler et al., 2012) could secrete a variety of diffusible mediators. Reactive glia regulates adult neurogenesis (Ekdahl, 2012) and later selection and integration of newborn neurons (Mathieu et al., 2010; Tremblay et al., 2011; Morrens et al., 2012). Therefore, we propose that limiting HFD-stimulated proliferation could decrease the concentration of secreted factors emitted by newborn cells, thus altering both the amplification of the proliferative response and the acute secretome-dependent homeostatic response.

HFD feeding does not alter the ability of newborn cells to differentiate toward the neuronal lineage, nor does it change their long-term survival. However, twice more POMC neurons are generated during HFD feeding relative to control, suggesting that maturation of hypothalamic neofomed neurons is nutritionally regulated in the adulthood. The time required for functional integration of these new neurons, and whether they are sensitive to metabolic cues remain to be elucidated. Nevertheless, once functional, additional anorexigenic POMC neurons could be an ultimate defense against metabolic

imbalance, to reinforce the HFD-induced up-regulation of POMC expression (Ziotopoulou et al., 2000) and the HFD-induced synaptic plasticity of POMC neurons (Benani et al., in press). These results further confirm that the melanocortin system is highly plastic and adapt to the nutritional conditions by a combinaison of various strategies. However, this physiological process is inhibited when the calorific pressure is sustained (McNay et al., 2012).

Overweight, which is dramatically on the rise in the world, is a major risk factor for a number of chronic diseases, including diabetes, and cardiovascular diseases. A better characterization of the function of adult hypothalamic neurogenesis in the control of energy balance could help finding novel approaches to fight against obesity. In this study, we show that adult hypothalamic neurogenesis is remarkably responsive to the nutritional conditions. We provide precise description of early cellular events engaged in the homeostatic response to dietary fat. Moreover, we show that defect in hypothalamic cell renewal leads to severe overweight, providing new insight into our understanding of nutritional regulation of energy balance.

References

- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiological reviews* 85:523-569.
- Alonso G, Galibert E, Duvoid-Guillou A, Vincent A (2005) Hyperosmotic stimulus induces reversible angiogenesis within the hypothalamic magnocellular nuclei of the adult rat: a potential role for neuronal vascular endothelial growth factor. *BMC Neurosci* 6:20.
- Bauer S (2009) Cytokine control of adult neural stem cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1153:48-56.
- Benani A, Hryhorczuk C, Gouazé A, Fioramonti X, Brenachot X, Guissard C, Krezymon A, Duparc T, Colom A, Nédélec E, Rigault C, Lemoine A, Gascuel J, Gerardy-Schahn R, Valet P, Knauf C, Lorsignol A, Pénicaud L (in press) Food intake adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice. *J Neurosci*.
- Butler AA (2006) The melanocortin system and energy balance. *Peptides* 27:281-290.
- Butler AA, Marks DL, Fan W, Kuhn CM, Bartolome M, Cone RD (2001) Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nature neuroscience* 4:605-611.
- Cameron HA, McKay RD (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 435:406-417.
- Caruso C, Carniglia L, Durand D, Gonzalez PV, Scimonelli TN, Lasaga M (2012) Melanocortin 4 receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor expression in rat astrocytes through cyclic AMP-protein kinase A pathway. *Mol Cell Endocrinol* 348:47-54.
- Cone RD (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8:571-578.
- Dupret D, Fabre A, Dobrossy MD, Panatier A, Rodriguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Olié SH, Piazza PV, Abrous DN (2007) Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS Biol* 5:e214.
- Ekdahl CT (2012) Microglial activation - tuning and pruning adult neurogenesis. *Front Pharmacol* 3:41.
- Erlandsson A, Brannvall K, Gustafsdottir S, Westermark B, Forsberg-Nilsson K (2006) Autocrine/paracrine platelet-derived growth factor regulates proliferation of neural progenitor cells. *Cancer Res* 66:8042-8048.
- Fernandez AM, Torres-Aleman I (2012) The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature reviews Neuroscience* 13:225-239.
- Fowler CD, Liu Y, Ouimet C, Wang Z (2002) The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *Journal of neurobiology* 51:115-128.
- Franklin K, Paxinos G (2007) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press Inc.
- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 23:257-271.

- Huang L, DeVries GJ, Bittman EL (1998) Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *Journal of neurobiology* 36:410-420.
- Kempermann G (2011) Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *The European journal of neuroscience* 33:1018-1024.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310:679-683.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2007) Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus. *J Comp Neurol* 505:209-220.
- Lee DA, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Miranda-Angulo A, Takiar V, Charubhumi V, Balordi F, Takebayashi H, Aja S, Ford E, Fishell G, Blackshaw S (2012) Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nature neuroscience* 15:700-702.
- Lin JH, Takano T, Arcuino G, Wang X, Hu F, Darzynkiewicz Z, Nunes M, Goldman SA, Nedergaard M (2007) Purinergic signaling regulates neural progenitor cell expansion and neurogenesis. *Dev Biol* 302:356-366.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264:1145-1148.
- Mathieu P, Battista D, Depino A, Roca V, Graciarena M, Pitossi F (2010) The more you have, the less you get: the functional role of inflammation on neuronal differentiation of endogenous and transplanted neural stem cells in the adult brain. *Journal of neurochemistry* 112:1368-1385.
- Matsuzaki K, Katakura M, Hara T, Li G, Hashimoto M, Shido O (2009) Proliferation of neuronal progenitor cells and neuronal differentiation in the hypothalamus are enhanced in heat-acclimated rats. *Pflugers Arch* 458:661-673.
- McNay DE, Briancon N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E, Flier JS (2012) Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *The Journal of clinical investigation* 122:142-152.
- Migaud M, Batailler M, Pillon D, Franceschini I, Malpoux B (2011) Seasonal changes in cell proliferation in the adult sheep brain and pars tuberalis. *J Biol Rhythms* 26:486-496.
- Migaud M, Batailler M, Segura S, Duittoz A, Franceschini I, Pillon D (2010) Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *The European journal of neuroscience* 32:2042-2052.
- Morrens J, Van Den Broeck W, Kempermann G (2012) Glial cells in adult neurogenesis. *Glia* 60:159-174.
- Nishimoto M, Furuta A, Aoki S, Kudo Y, Miyakawa H, Wada K (2007) PACAP/PAC1 autocrine system promotes proliferation and astrogenesis in neural progenitor cells. *Glia* 55:317-327.
- Noble EE, Billington CJ, Kotz CM, Wang C (2011) The lighter side of BDNF. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 300:R1053-1069.

- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:6706-6717.
- Perez-Martin M, Cifuentes M, Grondona JM, Lopez-Avalos MD, Gomez-Pinedo U, Garcia-Verdugo JM, Fernandez-Llebrez P (2010) IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. *Eur J Neurosci* 31:1533-1548.
- Pierce AA, Xu AW (2010) De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:723-730.
- Plata-Salaman CR (2001) Cytokines and feeding. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 25 Suppl 5:S48-52.
- Rankin SL, Partlow GD, McCurdy RD, Giles ED, Fisher KR (2004) The use of proliferating cell nuclear antigen immunohistochemistry with a unique functional marker to detect postnatal neurogenesis in paraffin-embedded sections of the mature pig brain. *Brain Res Brain Res Protoc* 13:69-75.
- Simmons AM, Horowitz SS, Brown RA (2008) Cell proliferation in the forebrain and midbrain of the adult bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Brain Behav Evol* 71:41-53.
- Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fischer JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschop MH, Schwartz MW (2012) Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *The Journal of clinical investigation* 122:153-162.
- Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A (2011) The role of microglia in the healthy brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:16064-16069.
- Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson AC, Reynolds BA (1996) Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16:7599-7609.
- Werner L, Muller-Fielitz H, Ritzal M, Werner T, Rossner M, Schwaninger M (2012) Involvement of doublecortin-expressing cells in the arcuate nucleus in body weight regulation. *Endocrinology* 153:2655-2664.
- Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Ide C (2005) Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol* 192:251-264.
- Yamaguchi M, Mori K (2005) Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:9697-9702.
- Ziotopoulou M, Mantzoros CS, Hileman SM, Flier JS (2000) Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 279:E838-845.

Figure legends

Figure 1. High-fat diet causes fast and biphasic variation of cell renewal in the hypothalamus. (A) Schematic of the experimental design. Four days before high-fat diet introduction, BrdU-filled osmotic minipumps were implanted subcutaneously and connected to ventricular system to centrally deliver 12 $\mu\text{g/day}$ BrdU (at 0.5 $\mu\text{l/hr}$). Mice were killed at day 2, 3, 4 and 5 after high-fat diet introduction. (B) Representative image of BrdU-labeled newborn cells immunodetected in the hypothalamus of control mice after 5 days. (C) Linear regression modeling the daily accumulation rate of BrdU-positive cells in the whole hypothalamus of control mice ($n = 3-5$ mice per time-point; $r^2 = 0.952$). (D) Quantification of BrdU-positive cells detected in hypothalamus of mice fed either a standard or high-fat diet ($n = 3-5$ mice per group). Data are means \pm SEM. Groups were compared using unpaired t test. * and ** denotes $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively. 3V: third ventricle; HFD: high-fat diet.

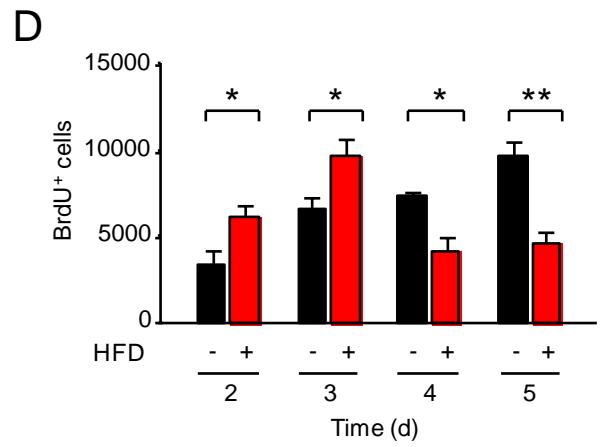
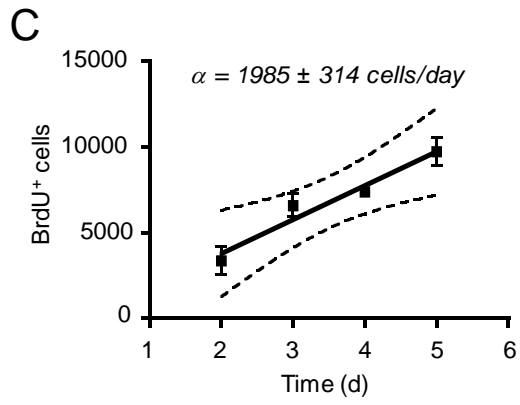
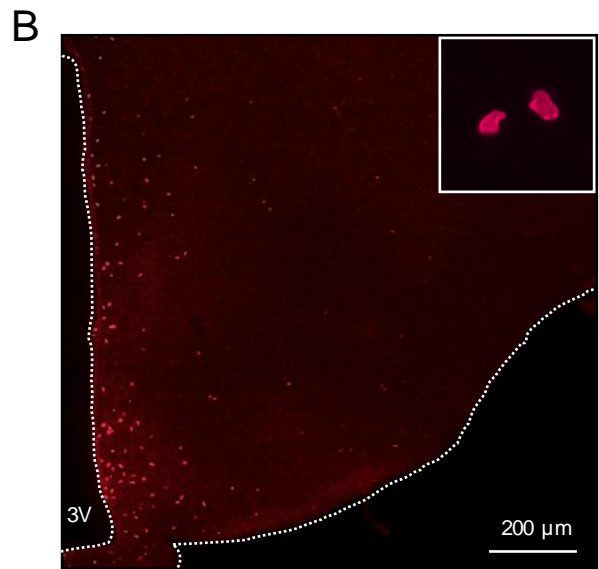
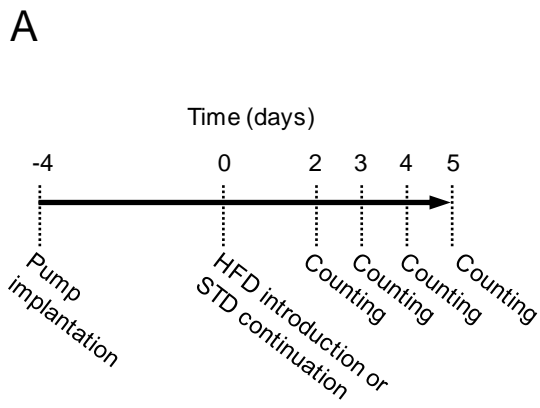
Figure 2. High-fat diet transiently increases cell proliferation in the hypothalamus. (A) Representative image of Ki67-positive proliferating cells immunodetected in the hypothalamus of control mice. (B) Quantification of Ki67-positive cells detected in the whole hypothalamus and in selected hypothalamic areas in mice fed either a standard or high-fat diet for 1, 3 and 5 days. Basal amount of Ki67-expressing cells at day 0 corresponds to the value found in control mice fed a standard diet. Data are means \pm SEM ($n = 12$ at day 0, and $n = 5$ at day 1, 3, and 5). Groups were compared using ANOVA and Newman-Keuls post-hoc test. * and ** denotes $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively. 3V: third ventricle; Arc: arcuate nucleus; HFD: high-fat diet; PVN: paraventricular nucleus; STD: standard diet; VMN: ventromedian nucleus.

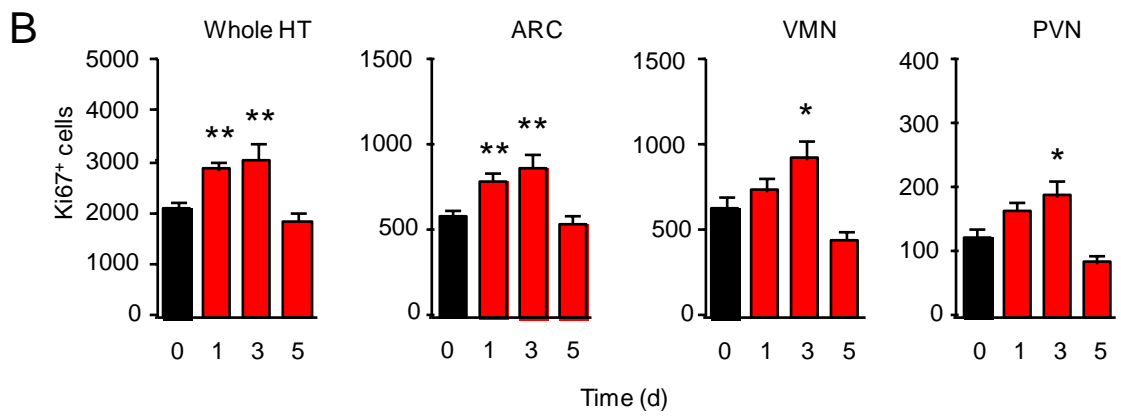
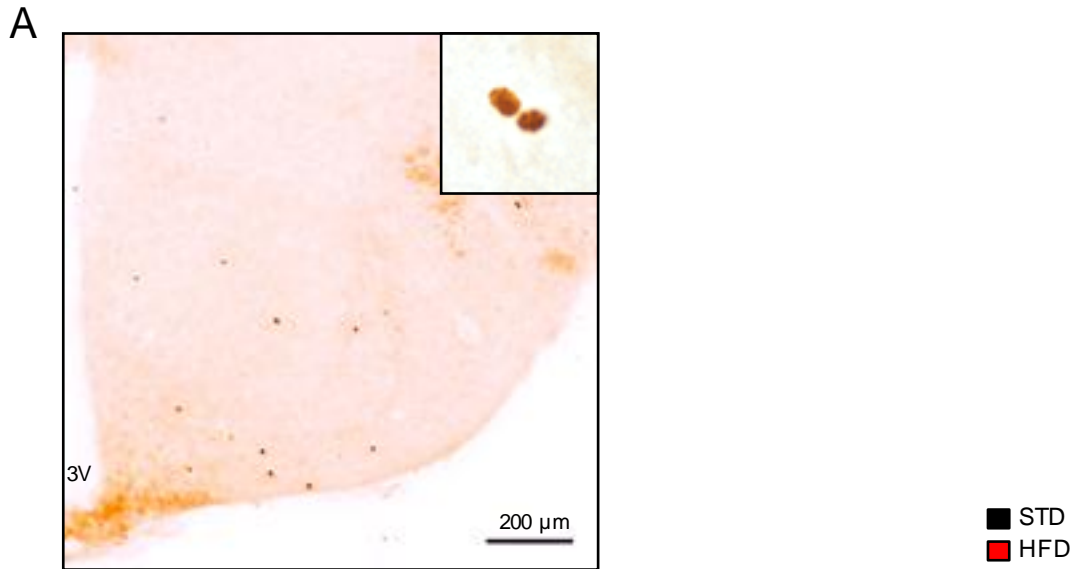
Figure 3. Blocking cell proliferation in the adult hypothalamus abolishes the homeostatic feeding response to dietary fat, and causes dramatic overweight. (A) Protocol used to inhibit cell proliferation in the brain. AraC-filled osmotic minipumps were implanted subcutaneously, and connected to the ventricular system system to centrally deliver 40 $\mu\text{g/day}$ AraC (at 0.25 $\mu\text{l/hr}$) for 3 weeks. Some mice received also BrdU 6 $\mu\text{g/day}$ through the same route. Food intake and body weight were monitored during the time-course of the experiment, whereas body weight gain, oro-anal length, adiposity, mass of fat depots and Ucp-1 expression were determined at the end of the treatment. (B) After 22 days, brains were inspected by immunohistochemistry against BrdU to assess the efficiency of AraC treatment. (C) AraC increased body weight of HFD-fed mice from 8 days and above, compared with that of all others groups. (D-F) AraC dramatically increased body weight gain of mice fed with HFD for 3 weeks compared with that of all others groups, without affecting the growth of mice, but increasing their adiposity. (G) Masses of both subcutaneous (Subcut) and visceral (Visc) fat pads were similarly increased by AraC. (H) From the second week after HFD introduction, AraC inhibited the continuation of the homeostatic reduction of food intake. (I) Levels of Ucp-1 mRNA in the brown adipose tissue assessed by RT-qPCR. No difference were found between groups, suggesting that the higher food intake in AraC-treated HFD-fed mice was not compensated by induced facultative thermogenesis. Data are means \pm SEM (n = 12-15, except for fat pads weighing: n = 5 per group, and for Ucp-1 analysis: n=8-9 per group). Groups were compared using ANOVA and Newman-Keuls post-hoc test. * , ** , *** denotes $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, and $p \leq 0.001$ respectively. 3V: third ventricle. AraC: Arabinofuranosyl Cytosine; HFD: high-fat diet; STD: standard diet; veh: vehicle; WAT: white adipose tissue.

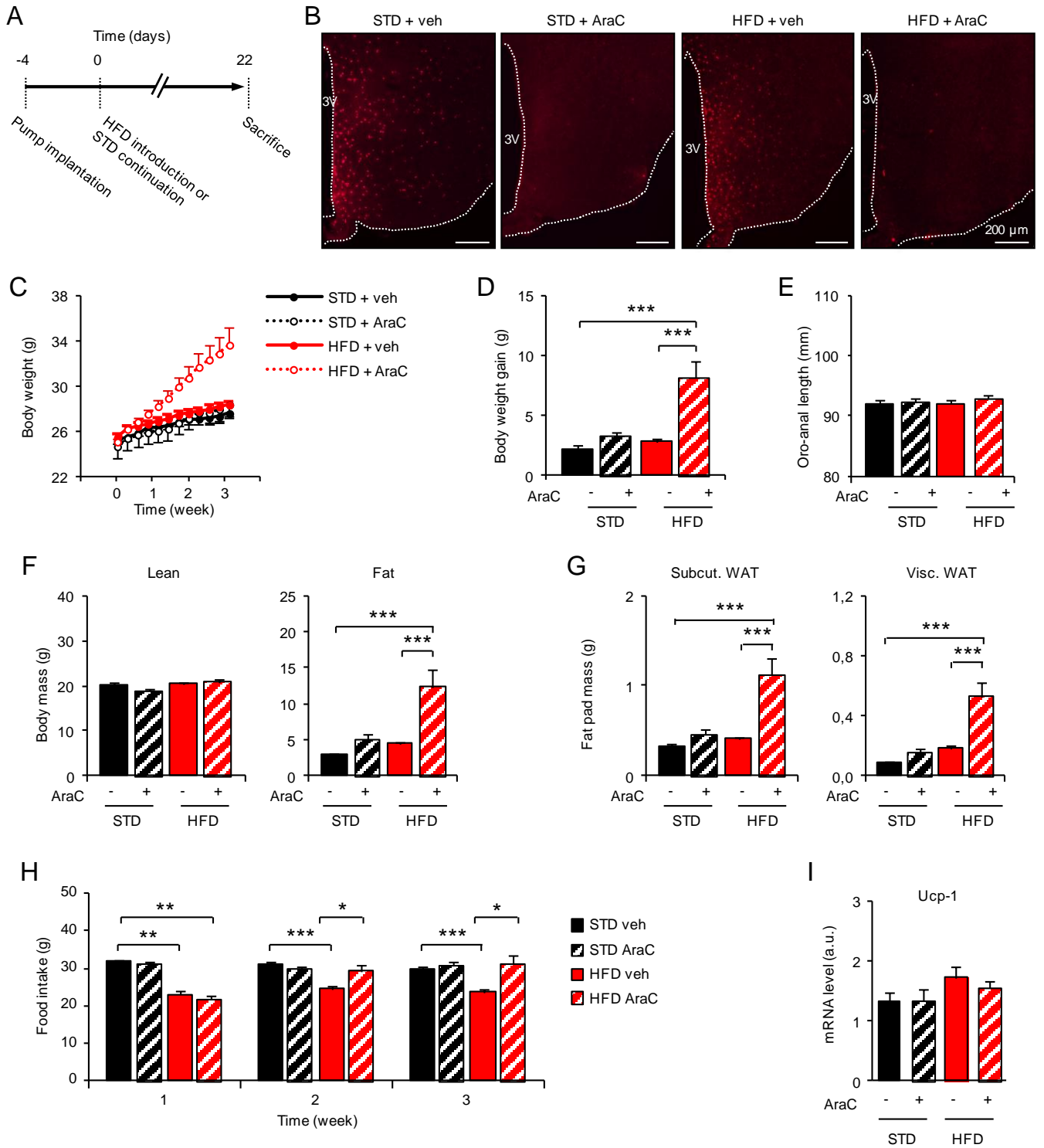
Figure 4. High-fat diet for three days increases the pools of neural progenitors and astroglial cells in the hypothalamus. Mice were kept on standard or high-fat diet for 3 days and were then killed. Brain sections were examined after immunostaining of Ki67-expressing proliferative cells (A) Representative images showing Ki67-positive proliferative cells (in red) detected in the hypothalamus, and phenotyped by the following markers (in green): GFAP (astrocytes), Iba-1 (microglia), Nestin (neural progenitors). (B) Quantification of double-labeled cells in hypothalamus of mice fed standard or high-fat diet. Data are means \pm SEM (n = 4-5 for each group). Groups were compared using unpaired t test. * and ** denotes $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively; 3V: third ventricle. HFD: high-fat diet; STD: standard diet.

Figure 5. High-fat diet does not deviate the neuronal fate rate, but incites new neurons to mature into anorexigenic POMC cells. (A) Schematic of the experimental design. Four days before high-fat diet introduction, BrdU-filled osmotic minipumps were implanted subcutaneously and connected to ventricular system to centrally deliver 12 $\mu\text{g/day}$ BrdU (at 0.5 $\mu\text{l/hr}$). Infusion was stopped at day 3 by cutting the catheter. Mice were kept for an additional 1-3 week(s) period and then killed. Brain sections were examined after immunostaining of BrdU-positive neoformed cells. (B) High-fat diet did not alter the survival rate at 3 weeks of BrdU-labeled neoformed cells in the hypothalamus once selected during the first week of HFD, compared to that in control mice. (C-D) High-fat diet did not alter the differentiation rate into neurons compared to that in control mice, as assessed by double immunohistochemistry against BrdU (in red) and NeuN, a neuronal marker (in green). (E-F) High-fat diet increased the number of arcuate newborn POMC neurons, as assessed by double immunohistochemistry against BrdU (in red) and POMC precursor (in green). Representative images were obtained from control mice at day 21. Data are means \pm SEM (n = 5-6 per group). Groups were compared using unpaired t test.

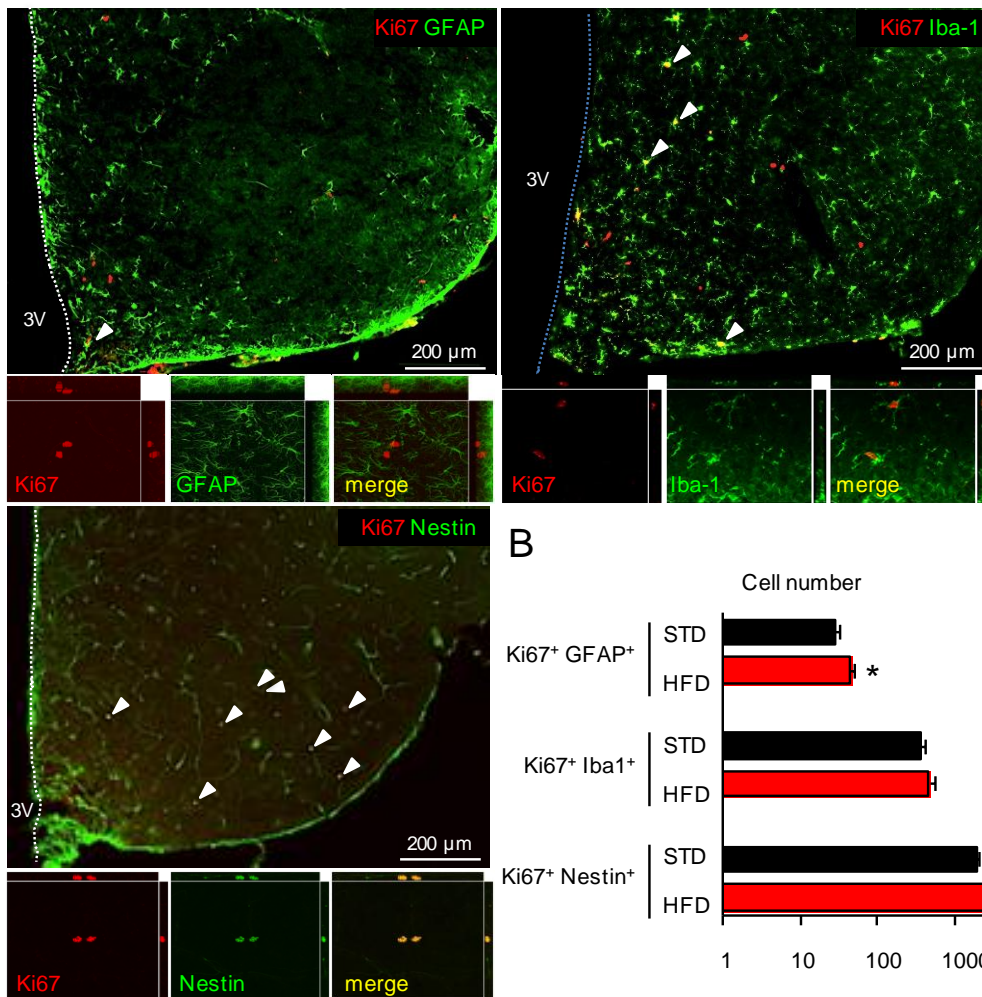
* , ** , denotes $p \leq 0.05$ and $p \leq 0.01$, respectively. 3V: third ventricle; Arc: arcuate nucleus; HFD: high-fat diet.

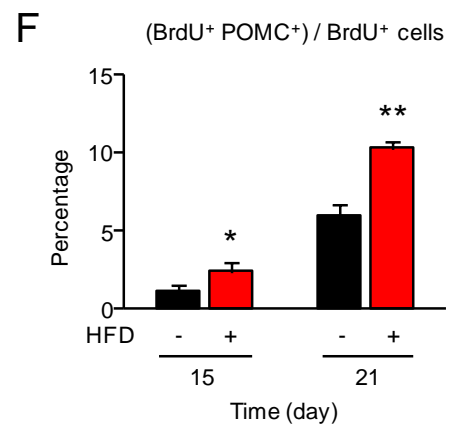
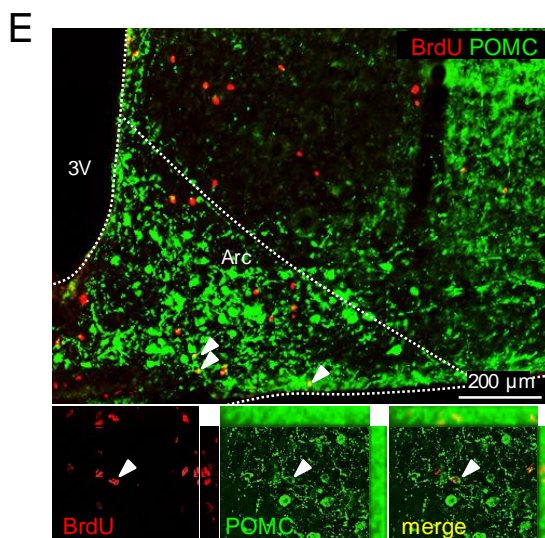
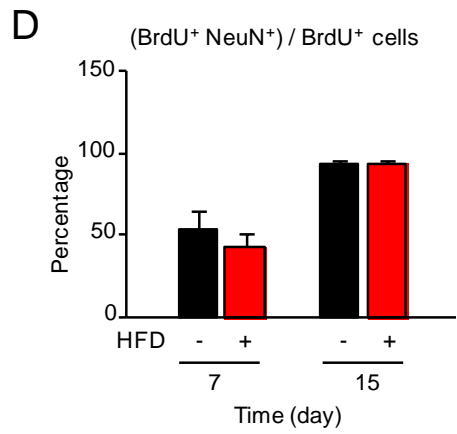
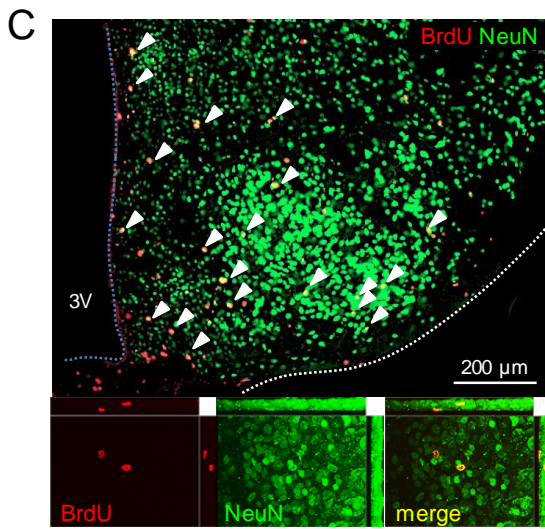
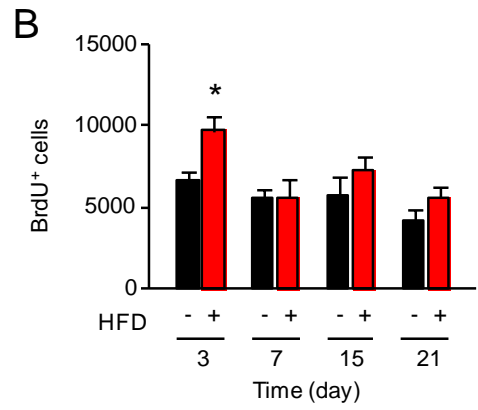
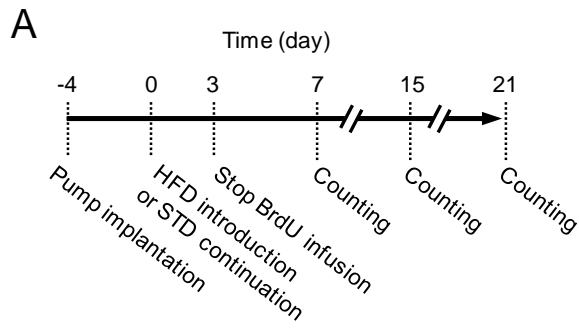






A





Conclusion générale

et

Perspectives

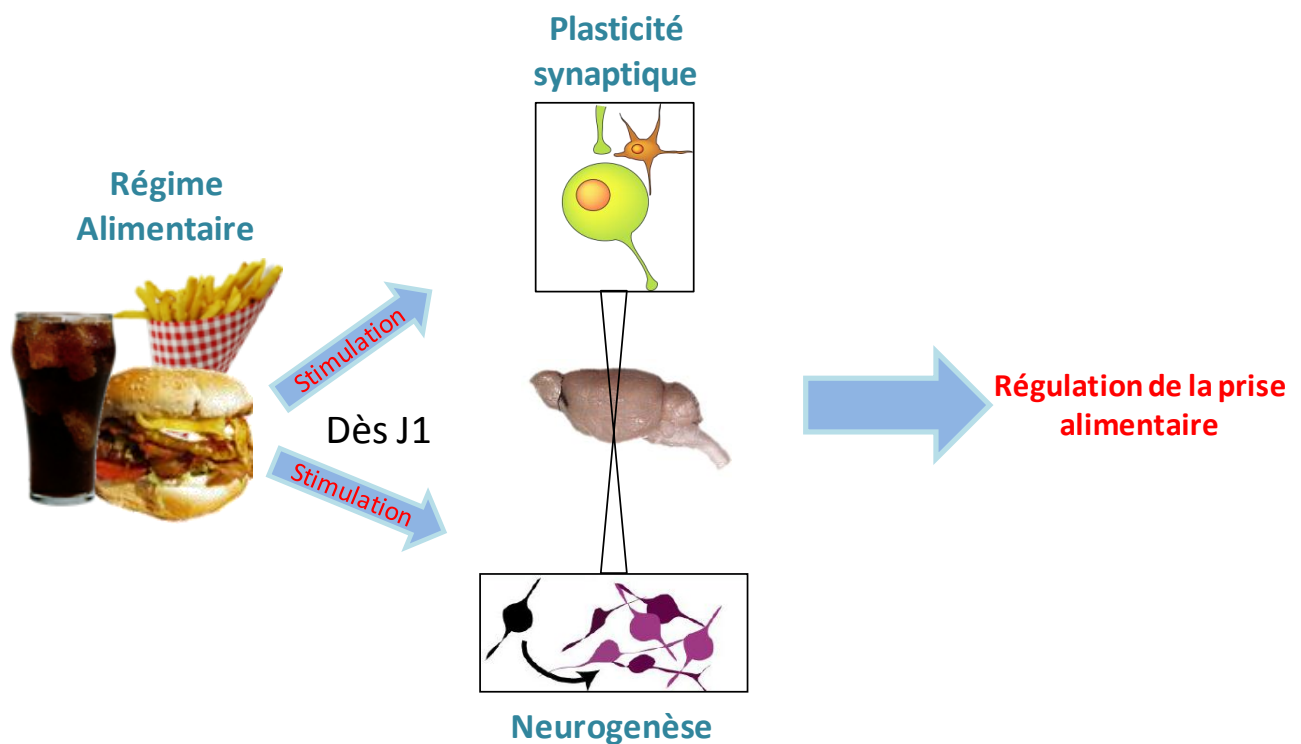


Figure 52: Bilan de l'étude

Le régime gras provoque des modulations rapides (dès J1) de la plasticité hypothalamique. D'une part, on observe une stimulation de la plasticité synaptique PSA-NCAM-dépendante dans l'ARC, qui conduit à une augmentation de la stimulation des neurones POMC. Parallèlement, la neurogenèse hypothalamique est modulée également. La prolifération cellulaire est stimulée et une partie des cellules deviennent des neurones POMC (en plus grand nombre que chez les souris STD). Dans les 2 cas, nous avons démontré que la plasticité hypothalamique sous régime HFD est essentielle pour le maintien de l'homéostasie énergétique.

Conclusions générales

Le but de cette étude était d'explorer les éventuels phénomènes de plasticité activés lors d'une réponse homéostatique à un régime gras. Grâce à notre étude nous avons déterminé que :

- Un régime HFD provoque chez l'individu adulte une réponse homéostatique très rapide.
- Cette réponse homéostatique se traduit au niveau central par une plasticité synaptique PSA-NCAM-dépendante dans le noyau arqué hypothalamique, conduisant à une stimulation des neurones POMC et à une régulation de la prise alimentaire.
- Elle s'accompagne également d'un impact sur la neurogenèse hypothalamique puisqu'on observe une augmentation de la prolifération cellulaire hypothalamique qui semble être essentielle pour le maintien de l'homéostasie énergétique.
- Le régime a également un impact sur la maturation des nouveaux neurones puisque une partie des neurones vont devenir des neurones POMC, et ce en plus grande proportion que pour les souris sous régime STD.

Pour la première fois, nous avons mis en évidence le fait que la plasticité dans l'hypothalamus est un phénomène bénéfique. Dans notre contexte, la plasticité induite rapidement par le régime HFD semble permettre un retour à une prise alimentaire normale et un maintien de l'homéostasie énergétique (**Figure 52**).

Perspectives

Aujourd'hui, dans les pays industrialisés, on assiste à une recrudescence des maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète de type II ou le syndrome métabolique. Le développement de ces maladies est dû en grande partie aux changements d'habitudes alimentaires. En effet, depuis les années 80, les populations de ces pays ont accès à une nourriture dite « de cafétéria » ou « fast-food », riche en calories et en lipides, et souvent la consommation de cette nourriture s'accompagne d'une baisse de l'activité physique. Les incidences de ces pathologies devenant de plus en plus importantes et créant des problèmes de santé publique très importants, il est essentiel de comprendre les mécanismes mis en jeu dans leurs développements. Le cerveau, et plus particulièrement l'hypothalamus, participe à la régulation de l'homéostasie énergétique, et chez les individus obèses on observe des modifications de certains réseaux neuronaux en particulier dans cette structure. Le but de ce travail était de comprendre les mécanismes de plasticité mis en place lors d'une réponse homéostatique provoquée par un régime alimentaire de type « cafétéria » ou « fast-food » sur les réseaux hypothalamiques chez l'adulte, et de connaître l'impact des éventuelles modifications sur la régulation de l'homéostasie énergétique.

Pour répondre à ces questions, nous avons mis en place un modèle de souris recevant un régime gras ayant une composition proche de la nourriture « fast-food » que l'on peut trouver chez l'Homme. Ces souris présentent très rapidement des défauts métaboliques transitoires. L'hyperphagie, la dyslipidémie, l'intolérance au glucose observées pendant les 3 premiers jours de régime HFD se traduisent au niveau central par un remodelage du réseau hypothalamique. En effet, dès le premier jour, le régime gras entraîne une augmentation de l'expression de PSA-NCAM dans le noyau arqué hypothalamique des souris. Chez l'individu adulte, la polysialisation de NCAM est un

évènement lié à un mouvement des cellules pouvant se traduire par un remodelage des connexions synaptiques (Bonfanti, 2006), et dans notre modèle nous pouvons voir qu'effectivement, après trois jours de régime, les afférences pré-synaptiques sont modifiées sur les neurones anorexigènes POMC. Ce remaniement des connexions, qui est PSA-NCAM dépendant, provoque une augmentation du tonus excitateur sur les neurones POMC au troisième jour de régime, ceci pouvant expliquer le retour progressif à une prise alimentaire normale dès J3. Le blocage de PSA-NCAM par l'endoN empêche d'ailleurs ce retour à la normale. Ceci prouve que les reconnections observées sont essentielles pour le maintien de l'homéostasie. Une explication à ce résultat pourrait être que la stimulation PSA-NCAM-dépendante des neurones POMC soit un phénomène régulé par la leptine. En effet, les souris sous HFD présentent une augmentation de la triglycéridémie à J1, et le taux de leptine produite par les adipocytes est corrélé avec le taux de tryglycérides circulants (Hynes and Jones, 2001). De plus, les neurones hypothalamiques à POMC possèdent des récepteurs à la leptine et sont donc en partie régulés par le taux circulant (Cheung et al., 1997). Enfin, chez les souris ob/ob, les reconnections synaptiques sur les neurones POMC sont modulées très rapidement par la leptine (Pinto et al., 2004). Si effectivement la leptine est impliquée dans la plasticité synaptique dans notre modèle, alors une façon de le prouver serait de mettre des souris ob/ob sous régime HFD pendant une semaine. A ce moment-là, les souris devraient présenter un défaut de prise alimentaire similaire à celui observé chez les souris traitées avec l'endoN. On peut également penser qu'il sera impossible de voir l'augmentation d'expression de PSA-NCAM où les changements de connexions et de tonus pendant les 3 premiers jours chez ces souris.

PSA-NCAM est un marqueur de plasticité synaptique, mais également un marqueur de cellules immatures en migration. En effet, dans la zone sous ventriculaire, PSA-NCAM est exprimé par les neuroblastes en migration le long du flux rostral migratoire. Ce marquage est détectable jusqu'à l'arrivée des cellules dans les bulbes

olfactifs, et la perte d'expression coïncide avec la différenciation des neuroblastes en neurones granulaires et périglomérulaires (Bonfanti and Theodosis, 1994; Rousselot et al., 1995; Doetsch et al., 1997; Bonfanti, 2006). Dans ce contexte, l'expression de PSA-NCAM n'est pas essentielle pour la migration des neuroblastes jusqu'aux BO (Hu et al., 1996), en revanche, les cellules en culture issues de souris ko NCAM montrent une neurogenèse très réduite (Vutskits et al., 2006). Ces données prouvent que PSA-NCAM peut également être un marqueur de neurogenèse dans le cerveau adulte. Dans notre modèle, on observe effectivement une augmentation de la prolifération dans l'hypothalamus entier dès les trois premiers jours de régime HFD. Cette augmentation est conséquente puisque 1000 cellules vont proliférer en plus des 2000 qui prolifèrent déjà en conditions basales. Sur les trois types cellulaires que nous avons identifiés dans l'hypothalamus, seule la prolifération de deux types va être stimulée pendant les 3 premiers jours de régime gras : les cellules astrogliales et les précurseurs neuronaux. La microglie, elle, prolifère normalement. Cette absence d'augmentation de prolifération microgliale, alors que tous les autres types cellulaires prolifèrent plus, pourrait être due aux cellules astrogliales. Ces cellules sont présentes en plus grands nombres sous régime gras dans l'hypothalamus et pourraient donc sécréter une plus grande quantité de GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor). Ce facteur trophique est connu pour être sécrété par les astrocytes de la substance noire où elle permet d'empêcher l'activation de la microglie, empêchant ainsi un phénomène d'inflammation (Rocha et al., 2012). Le GDNF serait capable de moduler la prolifération mais aussi la migration et l'adhésion des cellules microgliales en augmentant l'expression de l'enzyme antioxydante HO-1 (Hemeoxygenase-1) (Min et al., 2006). De plus, les effets du GDNF sur les cellules microgliales dépendent du récepteur GRF α 1 (GDNF family receptor alpha 1) (Rocha et al., 2012) qui peut d'ailleurs être associé avec la protéine NCAM (Ibáñez, 2010), ceci pourrait expliquer, en partie, l'augmentation de l'expression de cette protéine lors de la

mise sous régime. Les cellules astrogliales et les précurseurs neuraux voient donc leur prolifération stimulée sous HFD. Lorsque l'on inhibe la prolifération de ces cellules, les effets sur la prise alimentaire et sur le poids sont observés à partir d'une semaine, et ces effets sont radicaux. Ces nouvelles cellules sont donc très importantes pour le maintien de l'équilibre énergétique. Les cellules néoformées ne sont cependant pas matures dès la première semaine après leur naissance. Nous avons démontré que leur différenciation neuronale était complète à J15, et pourtant les effets du régime sont visibles après seulement 1 semaine de traitement à l'araC. Ce phénomène pourrait être dû au fait que les cellules néoformées encore immatures sont capables de sécréter de manière paracrine des facteurs capables de moduler l'activité des cellules environnantes. Plusieurs facteurs ont été identifiés comme médiateurs agissant sur les cellules de leur environnement proche et permettant une régulation rapide de l'homéostasie. Les cellules astrogliales, présentes dans différentes régions cérébrales, sont capables de relarguer plusieurs facteurs lorsqu'elles sont stimulées. Parmi ces facteurs, on trouve des facteurs neurotrophiques comme le GDNF (vu précédemment), le CDNF (Cerebral dopamine neurotrophic factor), le BDNF (Brain derived neurotrophic factor) (Nagatsu and Sawada, 2005; Chang et al., 2006; Lindholm et al., 2007), et des cytokines comme l'Il-6 (Interleukine-6), Il-1 β (Interleukine 1 bêta), et d'autres protéines comme Wnt-3 et IGFBP6 (Insulin-like growth factor binding protein 6) (Barkho et al., 2006; Okamoto et al., 2011). Certains, comme l'Il-6, sont capables de moduler l'homéostasie énergétique. Les souris modifiées génétiquement pour exprimer l'Il-6 spécifiquement dans leurs astrocytes, sont résistantes à l'obésité induite par un régime gras (Hidalgo et al., 2010). Le BDNF est aussi un facteur anorexigène qui a de multiples fonctions. Il a été montré que, *in vitro*, l'activation des récepteurs MC4-R mène à l'expression de BDNF dans les astrocytes hypothalamiques (Caruso et al., 2012). L'expression *in vivo* du BDNF dans le VMH est activée par une augmentation de la prise alimentaire via la signalisation des récepteurs MC4-R, ceci

provoquant une baisse de la prise alimentaire et une augmentation des dépenses énergétiques (Xu et al., 2003). Ces deux molécules sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie énergétique, mais ont également impact sur la neurogenèse hypothalamique. Ainsi, l'infusion de BDNF dans l'hypothalamus de rat provoque une augmentation de la prolifération cellulaire (Pencea et al., 2001). Il-6 ainsi qu'Il-1 β et Wnt-3 agissent comme des régulateurs qui vont permettre la différenciation des cellules prolifératives en neurones dans le DG et la SVZ (Barkho et al., 2006; Okamoto et al., 2011). IGFBP6 va, au contraire, altérer la différenciation de ces cellules dans l'hippocampe (Barkho et al., 2006).

Dans notre modèle, l'augmentation du nombre d'astrocytes pendant les 3 premiers jours de régime pourrait se traduire par une baisse de la prise alimentaire et un maintien du poids corporel via la sécrétion d'Il-6 ou de BDNF. Ces deux facteurs sécrétés par les astrocytes seraient les cibles prioritaires. Leur expression conduit à une augmentation de la prolifération et la différenciation cellulaire dans l'hypothalamus, mais ces molécules ont également un impact direct sur la régulation de l'homéostasie énergétique. Une microdialyse réalisée dans l'hypothalamus des souris HFD à J3 permettrait d'identifier les facteurs sécrétés précocement et de voir la différence avec les souris STD. Une fois identifier, il serait intéressant d'injecter ces facteurs chez une souris STD et de mesurer l'impact sur la prolifération, la différenciation et sur la régulation de l'homéostasie énergétique.

La deuxième population prolifératives dans l'hypothalamus sont les précurseurs neuraux. Pour connaître le type de molécules secrétées par ces cellules immatures, il faudrait identifier plus précisément le type de précurseurs neuraux qui prolifèrent dans nos conditions. En effet, il a été montré que des cellules souches comme des progéniteurs neuronaux sont capables de proliférer dans l'hypothalamus (Xu et al., 2005; Mcnay et al., 2012). Les cellules souches semblent se situer préférentiellement dans la couche

épendymaire du 3^{ème} ventricule alors que les progéniteurs seraient localisés dans le parenchyme. Dans notre modèle, les cellules prolifératives exprimant la nestine se trouvent dans ces deux zones hypothalamiques. Pour connaître leur nature, une mise en culture de ces cellules et une évaluation de la formation des neurosphères semble être la solution adaptée (protocole selon Mcnay et al., 2012).

Le régime gras provoque une augmentation du nombre de cellules prolifératives pendant les trois premiers jours de régime, mais au bout de 7 jours on observe le même nombre de cellules néoformées chez les souris HFD et chez les souris STD. Une explication à ce phénomène serait que le régime gras provoque une rapide prolifération cellulaire afin de créer un stock rapide de cellules pour répondre à la pression environnementale. Mais par la suite, et de manière relativement rapide, il y aurait une sélection des cellules compétentes, parmi les nouvelles cellules produites, par un processus d'apoptose. Ce processus a déjà été observé dans une autre niche neurogénique comme en condition physiologique dans la zone sous-callosale chez la souris où une grande quantité des nouveaux neurones vont subir une apoptose massive (Kim et al., 2011). De même dans l'hippocampe, l'apprentissage spatial en piscine de Morris chez le rat, conduit à une augmentation rapide de la prolifération cellulaire puis à une sélection rapide (quelques jours) toute aussi massive par apoptose (Dupret et al., 2007). Dans notre modèle, un marquage TUNEL ou caspase-3 activé à partir de J3 permettrait de confirmer cette sélection massive des cellules par apoptose.

Nous avons montré, que les cellules prolifératives hypothalamiques se différenciaient essentiellement en neurones durant les 15 jours qui suivent leur naissance. Le régime gras ne provoque pas de changement dans cette étape de différenciation des cellules. En revanche, si l'on s'intéresse à la maturation de ces nouveaux neurones, on s'aperçoit que le régime gras va orienter une partie de ces neurones néoformés située dans l'ARC, vers un phénotype de neurones anorexigènes. Ces nouveaux neurones POMC

permettraient de consolider l'effet anorexigène des cellules immatures à court terme, et expliqueraient éventuellement en partie la régulation de la prise alimentaire à long terme. Si ces nouveaux neurones POMC sont aussi importants pour le maintien de l'homéostasie à long terme, cela signifie qu'ils se sont intégrés au réseau et qu'ils sont fonctionnels en sécrétant des neurotransmetteurs. Pour savoir à quel moment ces neurones deviennent compétents, plusieurs expériences seraient réalisables. Tout d'abord un triple marquage immunohistochimique BrdU/POMC/Synaptophysine permettrait de savoir si les neurones POMC néoformés ont établi des connexions avec les cellules de leur environnement. Ensuite, il suffirait d'injecter en ip avec de la leptine des souris HFD à différents temps de régime, puis de réaliser un marquage immunohistochimique BrdU/POMC/p-Stat3. Cette manipulation permettrait de voir si les nouveaux neurones POMC sont dotés des récepteurs adéquats pour recevoir les informations de la périphérie, et s'ils sont capables de mettre en place la machinerie cellulaire afin de répondre à ces modifications.

Nous avons montré avec ce travail que la plasticité synaptique et la neurogenèse basale hypothalamique chez l'individu adulte peuvent être très rapidement modulées par un changement de régime alimentaire. Ce régime va, en seulement quelques jours, provoquer des changements cellulaires qui semblent complémentaires et bénéfiques pour le maintien de l'homéostasie énergétique. Il semblerait qu'un changement environnemental délétère à long terme provoque à court terme une cascade de réactions très rapide au niveau central ayant pour but de maintenir un équilibre énergétique. Dès le premier jour, des changements synaptiques interviennent dans le but de stimuler le tonus anorexigène dans l'hypothalamus. Dans le même laps de temps, de nouvelles cellules sont produites, mais il semble que la prolifération de la population microgliale ne soit pas stimulée, l'inflammation connue pour être délétère semble donc limitée pendant ces quelques jours. Les nouvelles cellules sont essentielles pour maintenir l'homéostasie, et

agissent de pair avec le remodelage synaptique. Après les premiers jours, on assiste à une consolidation de cette régulation via l'insertion de nouveaux neurones anorexigènes dans le réseau. Cette étude met donc en évidence l'existence d'une régulation rapide et bénéfique dans l'hypothalamus suite à un changement de régime. Il serait intéressant par la suite d'identifier les phénomènes moléculaires activés lors de la mise en place de cette régulation.

Annexes

Protocoles

Immunohistochimie BrdU

Matériels et solutions :

- Solution d'anticorps primaire anti-BrdU au 100^{ème}
- Solution d'anticorps secondaire anti-NeuN au 100^{ème}
- Solution d'anticorps secondaire donkey anti-Rat au 250^{ème}
- Solution d'anticorps secondaire goat anti-Mouse au 500^{ème}
- Solution 50% formamide (Sigma, F9037) /2XSSC
- Solution de 2X SSC
- Solution de 2N HCl
- Borate de sodium 0,1M
- PBS 1X
- Solution Bloquante
- Plaques 24 puits (1 plaque par cerveau)
- Pinceau « petit gris » taille 3
- Lames Superfrost plus, Menzel-Gläser, réf . 631-9483, lot 30495
- Lamelles Diamant Star, Menzel-Gläser , réf. LDS 2460
- Agitateur de plaque
- Etuves (37 °C)
- Bain-marie (65°C)

Protocole :

- 1- Sortir les coupes du cryoprotectant et les déposées 10 min au PBS sur plaque agitante (1 mL)
- 2- Incubation dans 500 µL de la solution 50% formamide/2X SSC à 65°C (bain marie)
- 3- Rinçage dans 500 µL d'une solution de 2X SSC à température normale pendant 5min

- 4- Rinçage 5 min au PBS (1 mL)
- 5- Incubation dans 500 µL de la solution de 2N HCl à 37°C pendant 30min
- 6- Rinçage dans 500 µL de la solution de borate de sodium pendant 10 min à température ambiante
- 7- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 8- Blocage dans 300 µL pendant 1H à température ambiante
- 9- Incubation dans 200 µL de solution d'anticorps primaire overnight à 4°C
- 10- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 11- Incubation dans 200 µL de solution d'anticorps secondaire à température ambiante pendant 2H (se fait dans la pénombre pour éviter d'exciter les anticorps fluo)
- 12- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 13- Montage

Double immunohistochimie BrdU/POMC

Matériels et solutions :

- Solution d'anticorps primaire anti-BrdU au 100^{ème}
- Solution d'anticorps secondaire rabbit anti-POMC au 4000^{ème}
- Solution d'anticorps secondaire donkey anti-Rat au 250^{ème}
- Solution d'anticorps secondaire alexa fluor 488 goat anti rabbit au 100^{ème}
- Solution 50% formamide (Sigma, F9037) /2XSSC
- Solution de 2X SSC
- Solution de 2N HCl
- Borate de sodium 0,1M
- PBS 1X
- Solution Bloquante
- Plaques 24 puits (1 plaque par cerveau)
- Pinceau « petit gris » taille 3
- Lames Superfrost plus, Menzel-Gläser, réf . 631-9483, lot 30495
- Lamelles Diamant Star, Menzel-Gläser , réf. LDS 2460
- Agitateur de plaque
- Etuves (37 °C)
- Bain-marie (65°C)

Protocole :

- 1- Sortir les coupes du cryoprotectant et les déposées 10 min au PBS sur plaque agitante (1 mL)
- 2- Incubation dans 500 µL de la solution 50% formamide/2X SSC à 65°C (bain marie)
- 3- Rinçage dans 500 µL d'une solution de 2X SSC à température normale pendant 5min
- 4- Rinçage 5 min au PBS (1 mL)

- 5- Incubation dans 500 μ L de la solution de 2N HCl à 37°C pendant 30min
- 6- Rinçage dans 500 μ L de la solution de borate de sodium pendant 10 min à température ambiante
- 7- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 8- Blocage dans 300 μ L pendant 1H à température ambiante
- 9- Incubation dans 200 μ L de solution d'anticorps primaire anti-BrdU overnight à 4°C
- 10- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 11- Incubation dans 200 μ L de solution d'anticorps secondaire donkey anti-Rat à température ambiante pendant 2H (se fait dans la pénombre pour éviter d'exciter les anticorps fluo)
- 12- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 13- Blocage dans 300 μ L pendant 1H à température ambiante
- 14- Incubation dans 200 μ L de solution d'anticorps primaire anti-POMC overnight à 4°C
- 15- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 16- Incubation dans 200 μ L de solution d'anticorps secondaire à température ambiante pendant 1H (se fait dans la pénombre pour éviter d'exciter les anticorps fluo)
- 17- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 18- Montage

Double immunohistochimie BrdU/NeuN

Matériels et solutions :

- Solution d'anticorps primaire anti-BrdU au 100^{ème}
- Solution d'anticorps secondaire anti-NeuN au 100^{ème}
- Solution d'anticorps secondaire donkey anti-Rat au 250^{ème}
- Solution d'anticorps secondaire goat anti-Mouse au 500^{ème}
- Solution 50% formamide (Sigma, F9037) /2XSSC
- Solution de 2X SSC
- Solution de 2N HCl
- Borate de sodium 0,1M
- PBS 1X
- Solution Bloquante
- Plaques 24 puits (1 plaque par cerveau)
- Pinceau « petit gris » taille 3
- Lames Superfrost plus, Menzel-Gläser, réf . 631-9483, lot 3049
- Lamelles Diamant Star, Menzel-Gläser , réf. LDS 2460
- Agitateur de plaque
- Etuves (37 °C)
- Bain-marie (65°C)

Protocole :

- 1- Sortir les coupes du cryoprotectant et les déposées 10 min au PBS sur plaque agitante (1 mL)
- 2- Incubation dans 500 µL de la solution 50% formamide/2X SSC à 65°C (bain marie)
- 3- Rinçage dans 500 µL d'une solution de 2X SSC à température normale pendant 5min
- 4- Rinçage 5 min au PBS (1 mL)

- 5- Incubation dans 500 μ L de la solution de 2N HCl à 37°C pendant 30min
- 6- Rinçage dans 500 μ L de la solution de borate de sodium pendant 10 min à température ambiante
- 7- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 8- Blocage dans 300 μ L pendant 1H à température ambiante
- 9- Incubation dans 200 μ L de solution d'anticorps primaire anti-BrdU overnight à 4°C
- 10- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 11- Incubation dans 200 μ L de solution d'anticorps secondaire anti-Rat à température ambiante pendant 2H (se fait dans la pénombre pour éviter d'exciter les anticorps fluo)
- 12- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 13- Blocage dans 300 μ L pendant 1H à température ambiante
- 14- Incubation dans 200 μ L de solution d'anticorps primaire anti-NeuN overnight à 4°C
- 15- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 16- Incubation dans 200 μ L de solution d'anticorps secondaire anti-Mouse à température ambiante pendant 2H (se fait dans la pénombre pour éviter d'exciter les anticorps fluo)
- 17- Rinçage 3x5 min au PBS (1 mL)
- 18- Montage

Immunohistochimie Ki67

Solutions et matériels :

- Solution d'anticorps primaire Mouse anti-Human Ki67
- *Solution d'anticorps visible secondaire Goat anti-Mouse* **ou** Alexa Fluor 555 goat anti-mouse
- *Kit Vectastain ABC (Mouse IgG)*
- *DAB substrate kit for peroxydase*
- PBS 1X
- Solution bloquante
- *Eau distillée*
- *H₂O₂ 3%*
- Tampon citrate, 20 mM, pH 6.0
- *Dako Faramount aqueous mounting medium, Dako, réf. S3025* **ou** Dako fluorescent mounting medium (Dako, réf.S3023)
- Un pap-pen ou Dako-pen
- Agitateur de plaque
- Boite humide hermétique
- Bacs d'incubation en verre
- Plaques 24 puits
- Pinceaux « petits gris » taille n°3
- Un bécher en Pyrex de 2000 mL
- Un coplin jar avec son couvercle
- Une plaque chauffante (Stuart, réf. CB162)
- Un thermomètre + 100°C
- Aluminium pour recouvrir le becher
- Lames Superfrost plus, Menzel-Gläser, réf. 631-9483, lot 30495
- Lamelles Diamant Star, Menzel-Gläser, réf. LDS 2460

Protocole : (les volumes de solutions déposées directement sur coupes sont de 60 µL et les volumes de bain dans les cuves sont de 200 mL) :

- 1- Couper le cerveau à 25 µm et monter les coupes sur lames après récupération dans du PBS 1X
- 2- Les faire sécher à température ambiante overnight si utilisation le lendemain, ou à -20°C dans une boîte hermétique pour une utilisation ultérieure
- 3- Entourer les coupes d'un trait de Pap-pen
- 4- Réhydrater les lames dans du PBS
- 5- Remplir le bécher d'eau du robinet (environ 750 mL) et placé le coplin jar rempli avec 70 mL le tampon citrate à l'intérieur
- 6- Chauffer pour atteindre 98°C à l'intérieur du coplin jar (thermostat 400°C pendant 20 min environ), recouvrir le bécher d'une feuille d'aluminium

(!Attention : faire chauffer le coplin jar dans l'eau froide, ne pas mettre dans l'eau déjà chaude sinon il explose !)

- 7- Une fois à 98°C, sortir le coplin jar et y placer les lames (la température dans le récipient redescend à 80°C environ)
- 8- Replacer le coplin jar dans le bécher et attendre environ 5 min que la température du tampon ré-atteigne 98°C
- 9- Incubation 10 min dans un tampon maintenu à 98°C
- 10- Laisser refroidir le coplin jar avec les lames au moins 15 min hors du bain-marie
- 11- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS
- 12- *Incubation 10 min en chambre humide avec de l'H₂O₂ 3%*
- 13- *Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS*
- 14- Blocage 1h dans le sérum de blocage (pas celui du kit)
- 15- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS
- 16- Incubation avec la solution d'anticorps primaire au 400^{ème} overnight à température ambiante
- 17- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS
- 18- *Incubation 1h avec la solution d'anticorps secondaire biotinylé ou la solution d'anticorps secondaire fluo alexa 555 à température ambiante et dans la pénombre si fluo*

19- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS

20- *Incubation 1h avec la solution de réactifs ABC*

21- *Préparer la solution de DAB selon le protocole*

22- *Un rinçage rapide + 1 lavage de 5 min dans PBS 1X*

23- *Incubation avec la solution DAB (Kit DAB) jusqu'à obtenir la couleur voulue (environ 2 min)*

24- *Un rinçage rapide + 1 lavage de 5 min dans de l'eau distillée*

25- Montage

Double immunohistochimie Ki67/GFAP

Solutions et matériels :

- Solution d'anticorps primaire Rabbit anti-GFAP
- Solution d'anticorps primaire Mouse anti-Human Ki67
- Alexa Fluor 555 goat anti-mouse
- Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit
- PBS 1X
- Solution bloquante
- Tampon citrate, 20 mM, pH 6.0
- Dako fluorescent Mounting Medium (Dako, réf. S3023)
- Un pap-pen ou Dako-pen
- Un bécher en Pyrex de 2000 mL
- Un coplin jar avec son couvercle
- Une plaque chauffante (Stuart, réf. CB162)
- Un thermomètre + 100°C
- Feuille d'aluminium pour recouvrir le becher
- Lames Superfrost plus, Menzel-Gläser, réf. 631-9483, lot 30495
- Lamelles Diamant Star, Menzel-Gläser, réf. LDS 2460
- Agitateur de plaque
- Boîte humide hermétique
- Bacs d'incubation en verre
- Plaques 24 puits
- Pinceaux « petits gris » taille n°3

Protocole : (les volumes de solutions déposées directement sur coupes sont de 50 μ L et les volumes de bain dans les cuves sont d'environ 200 mL) :

- 1- Couper le cerveau à 25 μ m et monter les coupes sur lames après récupération dans du PBS 1X
- 2- Les faire sécher à température ambiante overnight si utilisation le lendemain, au moins 1h si utilisation le jour même, ou conserver à -20°C dans une boîte hermétique pour une utilisation ultérieure
- 3- Entourer les coupes d'un trait de Pap-pen
- 4- Réhydrater les lames dans du PBS
- 5- Remplir le bécher d'eau du robinet (environ 750 mL) et placé le coplin jar rempli avec 70 mL de tampon citrate à l'intérieur
- 6- Chauffer pour atteindre 98°C à l'intérieur du coplin jar (thermostat 400°C pendant 20 min environ), recouvrir le bécher d'une feuille d'aluminium

(!Attention : faire chauffer le coplin jar dans l'eau froide, ne pas mettre dans l'eau déjà chaude sinon il explose !)
- 7- Une fois à 98°C, sortir le coplin jar et y placer les lames (la température dans le récipient redescend à 80°C environ)
- 8- Replacer le coplin jar dans le bécher et attendre environ 5 min que la température du tampon ré-atteigne 98°C
- 9- Incubation 10 min dans un tampon maintenu à 98°C
- 10- Laisser refroidir le coplin jar avec les lames au moins 15 min hors du bain-marie
- 11- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 12- Blocage 1h dans la solution bloquante
- 13- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 14- Incubation avec la solution d'anticorps primaire Ki67 au 400^{ème} overnight à température ambiante dans boîte hermétique humide
- 15- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 16- Incubation 1h à température ambiante avec la solution d'anticorps fluo Alexa 555 au 250^{ème}, dans la pénombre
- 17- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X

- 18- Incubation avec la solution d'anticorps primaire GFAP au 800^{ème} overnight à 4°C dans boîte hermétique humide dans la pénombre
- 19- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 20- Incubation 1h à température ambiante avec la solution d'anticorps fluo Alexa 488 au 1000^{ème}, dans la pénombre
- 21- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 22- Montage

Double immunohistochimie Ki67/Nestine

Solutions et matériels :

- Solution d'anticorps primaire Mouse anti-Nestine
- Solution d'anticorps primaire Mouse anti-Human Ki67
- Alexa Fluor 555 goat anti-mouse
- Alexa Fluor 488 goat anti-mouse
- PBS 1X
- Solution bloquante
- Tampon citrate, 20 mM, pH 6.0
- Dako fluorescent Mounting Medium (Dako, réf. S3023)
- Un pap-pen ou Dako-pen
- Un bécher en Pyrex de 2000 mL
- Un coplin jar avec son couvercle
- Une plaque chauffante (Stuart, réf. CB162)
- Un thermomètre + 100°C
- Feuille d'aluminium pour recouvrir le becher
- Lames Superfrost plus, Menzel-Gläser, réf. 631-9483, lot 30495
- Lamelles Diamant Star, Menzel-Gläser, réf. LDS 2460
- Agitateur de plaque
- Boîte humide hermétique
- Bacs d'incubation en verre
- Plaques 24 puits
- Pinceaux « petits gris » taille n°3

Protocole : (les volumes de solutions déposées directement sur coupes sont de 50 µL et les volumes de bain dans les cuves sont d'environ 200 mL) :

- 1- Couper le cerveau à 25 µm et monter les coupes sur lames après récupération dans du PBS 1X
- 2- Les faire sécher à température ambiante overnight si utilisation le lendemain, au moins 1h si utilisation le jour même, ou conserver à -20°C dans une boîte hermétique pour une utilisation ultérieure
- 3- Entourer les coupes d'un trait de Pap-pen
- 4- Réhydrater les lames dans du PBS
- 5- Remplir le bécher d'eau du robinet (environ 750 mL) et placé le coplin jar rempli avec 70 mL de tampon citrate à l'intérieur
- 6- Chauffer pour atteindre 98°C à l'intérieur du coplin jar (thermostat 400°C pendant 20 min environ), recouvrir le bécher d'une feuille d'aluminium

(!Attention : faire chauffer le coplin jar dans l'eau froide, ne pas mettre dans l'eau déjà chaude sinon il explose !)
- 7- Une fois à 98°C, sortir le coplin jar et y placer les lames (la température dans le récipient redescend à 80°C environ)
- 8- Replacer le coplin jar dans le bécher et attendre environ 5 min que la température du tampon ré-atteigne 98°C
- 9- Incubation 10 min dans un tampon maintenu à 98°C
- 10- Laisser refroidir le coplin jar avec les lames au moins 15 min hors du bain-marie
- 11- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 12- Blocage 1h dans la solution bloquante
- 13- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 14- Incubation avec la solution d'anticorps primaire Ki67 au 400^{ème} overnight à température ambiante dans boîte hermétique humide
- 15- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 16- Incubation 1h à température ambiante avec la solution d'anticorps fluo Alexa 555 au 250^{ème}, dans la pénombre
- 17- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X

- 18- Incubation avec la solution d'anticorps primaire Nestine au 250^{ème} overnight à 4°C dans boîte hermétique humide dans la pénombre
- 19- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 20- Incubation 1h à température ambiante avec la solution d'anticorps fluo Alexa 488 au 500^{ème}, dans la pénombre
- 21- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 22- Montage

Double immunohistochimie Ki67/Iba-1

Solutions et matériels :

- Solution d'anticorps primaire Rabbit anti-Iba-1
- Solution d'anticorps primaire Mouse anti-Human Ki67
- Alexa Fluor 555 goat anti-mouse
- Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit
- PBS 1X
- Solution bloquante
- Tampon citrate, 20 mM, pH 6.0
- Dako fluorescent Mounting Medium (Dako, réf. S3023)
- Un pap-pen ou Dako-pen
- Un bécher en Pyrex de 2000 mL
- Un coplin jar avec son couvercle
- Une plaque chauffante (Stuart, réf. CB162)
- Un thermomètre + 100°C
- Feuille d'aluminium pour recouvrir le becher
- Lames Superfrost plus, Menzel-Gläser, réf. 631-9483, lot 30495
- Lamelles Diamant Star, Menzel-Gläser, réf. LDS 2460
- Agitateur de plaque
- Boîte humide hermétique
- Bacs d'incubation en verre
- Plaques 24 puits
- Pinceaux « petits gris » taille n°3

Protocole : (les volumes de solutions déposées directement sur coupes sont de 50 µL et les volumes de bain dans les cuves sont d'environ 200 mL) :

- 1- Couper le cerveau à 25 µm et monter les coupes sur lames après récupération dans du PBS 1X
- 2- Les faire sécher à température ambiante overnight si utilisation le lendemain, au moins 1h si utilisation le jour même, ou conserver à -20°C dans une boîte hermétique pour une utilisation ultérieure
- 3- Entourer les coupes d'un trait de Pap-pen
- 4- Réhydrater les lames dans du PBS
- 5- Remplir le bécher d'eau du robinet (environ 750 mL) et placé le coplin jar rempli avec 70 mL de tampon citrate à l'intérieur
- 6- Chauffer pour atteindre 98°C à l'intérieur du coplin jar (thermostat 400°C pendant 20 min environ), recouvrir le bécher d'une feuille d'aluminium

(!Attention : faire chauffer le coplin jar dans l'eau froide, ne pas mettre dans l'eau déjà chaude sinon il explose !)
- 7- Une fois à 98°C, sortir le coplin jar et y placer les lames (la température dans le récipient redescend à 80°C environ)
- 8- Replacer le coplin jar dans le bécher et attendre environ 5 min que la température du tampon ré-atteigne 98°C
- 9- Incubation 10 min dans un tampon maintenu à 98°C
- 10- Laisser refroidir le coplin jar avec les lames au moins 15 min hors du bain-marie
- 11- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 12- Blocage 1h dans la solution bloquante
- 13- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 14- Incubation avec la solution d'anticorps primaire Ki67 au 400^{ème} overnight à température ambiante dans boîte hermétique humide
- 15- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 16- Incubation 1h à température ambiante avec la solution d'anticorps fluo Alexa 555 au 250^{ème}, dans la pénombre
- 17- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X

- 18- Incubation avec la solution d'anticorps primaire Iba-1 au 4000^{ème} overnight à 4°C dans boîte hermétique humide dans la pénombre
- 19- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 20- Incubation 1h à température ambiante avec la solution d'anticorps fluo Alexa 488 au 1000^{ème}, dans la pénombre
- 21- Rinçage rapide puis lavage 5 min au PBS 1X
- 22- Montage

Protocole ICV (canules simples et avec mini-pompes osmotiques BrdU)

Matériel :

- Isoflurane, Forene – Abbott
- Appareil à stéréotaxie
- Appareil à anesthésie (Minerve)
- Adaptateur souris
- Plaque chauffante
- Barres d'oreilles
- Micro-perceuse
- Cathéter long de 65mm, Microtube Tygon S-54HL Bioblock, ref. 71162, diam. Int. 0.51, diam. Ext. 1.52, 30m
- Canules, Brain Infusion Kit 3, 1-3 mm, Alzet (Charles River), pour icv dans ventricules latéraux
- Mini-pompes osmotiques Alzet (ref. selon protocole, voir le site Alzet, revendeur : Charles River)
- BrdU Sigma Ultra – Sigma, réf. B9285 – 1G
- Pincés
- Ciseaux
- Super Glue-3 cyanoacrylate - Loctite
- Vétadine, MediVet
- Cotons tiges
- Fil de suture non-résorbable 6-0
- NaCl



Protocole :

- 1- Amorçage des mini-pompes à 37°C dans du NaCl le jour d'avant
- 2- Placer les souris dans le bac à anesthésie gazeuse
- 3- Une fois endormie, prendre une souris et la placer sur l'adaptateur souris de l'appareil à stéréotaxie, sur le ventre, les dents de devant caler sur le cale dents, et le masque délivrant le gaz placé au-dessus du nez
- 4- Placer les barres d'oreilles et bien les caler sur 0, en faisant attention de bien placer la tête de la souris
- 5- Remonter la cale sur le museau afin que la tête de la souris soit immobile

- 6- Une fois la souris immobilisée, commencé par faire une boutonnière aux ciseaux au niveau du dessus du cou, et remonter jusqu'entre les deux yeux (un peu avant)
- 7- Bien dégager la peau, les muscles, et tout ce qui empêche d'accéder à la boîte crânienne
- 8- Percer un léger trou à la perceuse en bas, à gauche (éviter la zone d'intérêt)
- 9- Placer la canule dans l'appareil de stéréotaxie et positionner selon les coordonnées voulues (AP : -0.2 ; L : -1 ; P : -1.9)
- 10- Placer un point au marqueur (en marquant la canule avec un gros marqueur) sur le crâne à l'endroit où devra pénétrer la canule
- 11- Eloigner la canule de cet endroit (en gardant les coordonnées) et percer un trou à cet endroit avec la perceuse
- 12- Placer la canule à la profondeur voulue (la mesure aura été faite précédemment pour savoir de combien de mm il faut descendre la canule)
- 13- (pour mini-pompes seulement) Dégager la peau du dos des muscles avec une pince jusqu'en bas du dos*
- 14- Placer la mini-pompe en bas du dos et faire rentrer le cathéter en entier sous la peau*
- 15- Maintenir la canule avec de la glue et refermer la peau avec du fil de suture
- 16- Laisser sécher quelques minutes
- 17- Sortir la souris de l'appareil et la mettre au chaud jusqu'au réveil (plutôt rapide)

Bibliographie

- Abbott CR (2003) Identification of Hypothalamic Nuclei Involved in the Orexigenic Effect of Melanin-Concentrating Hormone. *Endocrinology* 144:3943–3949.
- Abrous D, Koehl M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiological reviews*:523–569.
- Ahima R, Bjorbaek C, Osei S (1999) Regulation of neuronal and glial proteins by leptin: implications for brain development. *Endocrinology* 140:2755–2762.
- Ahima RS, Hileman SM (2000) Postnatal regulation of hypothalamic neuropeptide expression by leptin: implications for energy balance and body weight regulation. *Regulatory peptides* 92:1–7.
- Ahima RS, Prabakaran D, Flier JS (1998) Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *The Journal of clinical investigation* 101:1020–1027.
- Altman J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135:1127–1128.
- Altman J (1963) Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec* 145:573–591.
- Anand B, Brobeck J (1951) Localization of a “feeding center” in the hypothalamus of the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 77:323–324.
- Anand B, Dua S (1955) Feeding responses induced by electrical stimulation of the hypothalamus in cat. *Indian Journal of Medicine Research* 43:113–122.
- Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience* 14:351–355
- Aravich P, Sclafani A (1983) Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behavioral Neuroscience* 97:970–983.
- Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS, Watson SJ (1999a) Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:RC26.
- Barkho B, Song H, Aimone J, Smrt R, Kuwabara T, Nakashima K, Gage F, Zhao X (2006) Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem cells development* 15:407–421
- Barsh GS, Schwartz MW (2002) Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature reviews Genetics* 3:589–600

- Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A, Moysé E (2005) In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130:75–90.
- Benson DL, Schnapp LM, Shapiro L, Huntley GW (2000) Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends in cell biology* 10:473–482
- Bergen HT, Mizuno TM, Taylor J, Mobbs CV (1998) Hyperphagia and weight gain after gold-thioglucose: relation to hypothalamic neuropeptide Y and proopiomelanocortin. *Endocrinology* 139:4483–4488.
- Bernier PJ, Bedard A, Vinet J, Levesque M, Parent A (2002) Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:11464–11469.
- Berthoud H-R (2002) Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 26:393–428.
- Berthoud H-R, Patterson LM, Sutton GM, Morrison C, Zheng H (2005) Orexin inputs to caudal raphe neurons involved in thermal, cardiovascular, and gastrointestinal regulation. *Histochemistry and cell biology* 123:147–156.
- Berthoud H-R, Sutton GM, Townsend RL, Patterson LM, Zheng H (2006) Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiology & behavior* 89:517–524.
- Biebermann H, Kühnen P, Kleinau G, Krude H (2012) The Neuroendocrine Circuitry Controlled by POMC, MSH, and AGRP. *Handbook of experimental pharmacology* 209:47–75.
- Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine a S (1991) Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *The American journal of physiology* 260:R321–7.
- Bingham NC, Anderson KK, Reuter AL, Stallings NR, Parker KL (2008) Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. *Endocrinology* 149:2138–2148.
- Blevins JE, Eakin TJ, Murphy J a, Schwartz MW, Baskin DG (2003) Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. *Brain Research* 993:30–41.
- Bliss T, Lomo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology*:331–356.
- Bonfanti L (2006) PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Progress in neurobiology* 80:129–164.
- Bonfanti L, Olive S, Poulain D, Theodosios D (1992) Mapping of the distribution of polysialylated neural cell adhesion molecule throughout the central nervous system of the adult rat: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 49

- Bonfanti L, Theodosis DT (1994) Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat, in its rostral extension and in the olfactory bulb. *Neuroscience* 62:291–305
- Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004) Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science (New York, NY)* 304:108–110.
- Bouret SG, Gorski JN, Patterson CM, Chen S, Levin BE, Simerly RB (2008) Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. *Cell metabolism* 7:179–185.
- Brobeck J, Tepperman J, Long C (1943) Experimental hypothalamic hyperphagia in the albino rat. *The Yale Journal of Biology*.
- Burd G, Nottebohm F (1985) Ultrastructural characterization of synaptic terminals formed on newly generated neurons in a song control nucleus of the adult canary forebrain. *Journal of comparative neurology* 240:143–152.
- Butler A, Kesterson R, Khong K, Cullen M (2000) A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 141.
- Bédard A, Cossette M, Lévesque M, Parent A (2002) Proliferating cells can differentiate into neurons in the striatum of normal adult monkey. *Neuroscience letters* 328:213–216.
- Bédard A, Gravel C, Parent A (2006) Chemical characterization of newly generated neurons in the striatum of adult primates. *Experimental brain research Experimentelle Hirnforschung Expérimentation cérébrale* 170:501–512.
- Carrer H, Aoki A (1982) Ultrastructural changes in the hypothalamic ventromedial nucleus of ovariectomized rats after estrogen treatment. *Brain research* 240:221–233.
- Cameron H, McKay R (2001) Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *Journal of comparative neurology* 435:406–417.
- Canteras N, Simerly R, Swanson L (1994) Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *Journal of comparative neurology* 348:41–79.
- Caruso C, Carniglia L, Durand D, Gonzalez PV, Scimonelli TN, Lasaga M (2012) Melanocortin 4 receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor expression in rat astrocytes through cyclic AMP-protein kinase A pathway. *Molecular and cellular endocrinology* 348:47–54.
- Chang G-Q, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF (2008) Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:12107–12119.
- Chang Y-P, Fang K-M, Lee T-I, Tzeng S-F (2006) Regulation of microglial activities by glial cell line derived neurotrophic factor. *Journal of cellular biochemistry* 97:501–511

- Cheung C, Clifton D, Steiner R (1997) Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* 138.
- Chigr F, Rachidi F, Segura S, Mahaut S, Tardivel C, Jean A, Najimi M, Moyse E (2009) Neurogenesis inhibition in the dorsal vagal complex by chronic immobilization stress in the adult rat. *Neuroscience* 158:524–536.
- Cone RD (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nature neuroscience* 8:571–578.
- Cone RD, Cowley M a, Butler a a, Fan W, Marks DL, Low MJ (2001) The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 25 Suppl 5:S63–7.
- Cowley M a, Smart JL, Rubinstein M, Cerdán MG, Diano S, Horvath TL, Cone RD, Low MJ (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411:480–484.
- Cremer H, Chazal G (1997) NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Molecular and Cellular* 335:323–335
- Cremer H, Chazal G, Lledo PM, Rougon G, Montaron MF, Mayo W, Le Moal M, Abrous DN (2000) PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 18:213–220
- Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, Kraemer P, Scheff S, Barthels D, Rajewsky K, Wille W (1994) Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Letters to Nature* 367:455–459.
- Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron H a (2005) New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *The Journal of cell biology* 168:415–427.
- DeFalco J, Tomishima M, Liu H, Zhao C, Cai X, Marth JD, Enquist L, Friedman JM (2001) Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in the hypothalamus. *Science (New York, NY)* 291:2608–2613.
- Doetsch F, Caillé I, Lim D a, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97:703–716.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:5046–5061.
- Doherty P, Walsh F (1992) Cell adhesion molecules, second messengers and axonal growth. *Current Opinion Neurobiology* 2:595–601.

- Dryden S, Pickavance L, Henderson L, Williams G (1998) Hyperphagia induced by hypoglycemia in rats is independent of leptin and hypothalamic neuropeptide Y (NPY). *Peptides* 19:1549–1555.
- Dupret D, Fabre A, Döbrössy MD, Panatier A, Rodríguez JJ, Lamarque S, Lemaire V, Olié SHR, Piazza P-V, Abrous DN (2007) Spatial learning depends on both the addition and removal of new hippocampal neurons. *PLoS biology* 5:e214.
- Edelman G, Jones F (1995) Developmental Control of N-CAM Expression by Hox and Pax Gene Products. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349:305–312.
- Edelman G, Jones F (1997) Gene regulation of cell adhesion molecules in neural morphogenesis. *Acta Paediatr Suppl* 422:12–19.
- Elias C, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima R (1998) Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* 21:1375–1385.
- Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD (1996) Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science (New York, NY)* 274:1704–1707.
- Fan W, Boston B, Kesterson R, Hruby V (1997) Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385:165–168.
- Fekete C, Légrádi G, Mihály E, Huang QH, Tatro JB, Rand WM, Emerson CH, Lechan RM (2000) alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:1550–1558.
- Fernandez AM, Torres-Alemán I (2012) The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nature reviews Neuroscience* 13:225–239
- Fields RD, Itoh K (1996) Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends in neurosciences* 19:473–480
- Fowler C, Liu Y, Ouimet C (2002) The Effects of Social Environment on Adult Neurogenesis in the Female Prairie Vole. *Journal of neurobiology*.
- Frankfurt M, Gould A, Woolley C, McEwen B (1990) Gonadal steroids modify dendritic spine density in ventromedial hypothalamic neurons: a Golgi study in the adult rat. *Endocrinology* 51:530–535.
- Frankfurt M, McEwen B (1991) Estrogen increases axodendritic synapses in the VMN of rats after ovariectomy. *Neuroreport* 2:380–382.
- Ganong WF (2000) Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 27:422–427.

- Garthe A, Behr J, Kempermann G (2009) Adult-generated hippocampal neurons allow the flexible use of spatially precise learning strategies. *PloS one* 4:e5464.
- Glowa J, Barrett J, Russel J, Gold P (1992) Effects of corticotropin releasing hormone on appetitive behaviors. *Peptides* 13:609–621.
- Goldman S a, Nottebohm F (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:2390–2394.
- Gould E (1999) Neurogenesis in the Neocortex of Adult Primates. *Science* 286:548–552.
- Gould E, Vail N, Wagers M, Gross CG (2001) Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:10910–10917.
- Grill HJ, Kaplan JM (2002) The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Frontiers in neuroendocrinology* 23:2–40.
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW (1998) Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature neuroscience* 1:271–272.
- Hall H, Walsh F, Doherty P (1996) Review: a role for the FGF receptor in the axonal growth response stimulated by cell adhesion molecules? *Cell Adhes Commun* 3:441–450.
- Hatton G (1997) Function-related plasticity in hypothalamus. *Annual review of neuroscience*.
- Hebb D (1949) *The organization of behavior*.
- Hetherington AW, Ranson SW (1940) Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record* 78:149–172.
- Hidalgo J, Florit S, Giralt M, Ferrer B, Keller C, Pilegaard H (2010) Transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-6 are resistant to high-fat diet-induced increases in body weight and body fat. *Brain, behavior, and immunity* 24:119–126.
- Hildebrandt H, Becker C, Glüer S (1998) Polysialic acid on the neural cell adhesion molecule correlates with expression of polysialyltransferases and promotes neuroblastoma cell growth. *Cancer research*:779–784.
- Hillebrand JJG, de Wied D, Adan R a H (2002) Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. *Peptides* 23:2283–2306.
- Horvath T (2005) Input organization and plasticity of hypocretin neurons: possible clues to obesity's association with insomnia. *Cell metabolism* 1:279–286.
- Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranath C (1997) Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain research* 756:283–286.

- Horvath TL, Sarman B, García-Cáceres C, Enriori PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen J a, Perez-Tilve D, Pfluger PT, Brönneke HS, Levin BE, Diano S, Cowley M a, Tschöp MH (2010) Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:14875–14880.
- Hoyk Z, Parducz a, Theodosis DT (2001) The highly sialylated isoform of the neural cell adhesion molecule is required for estradiol-induced morphological synaptic plasticity in the adult arcuate nucleus. *The European journal of neuroscience* 13:649–656.
- Hu H, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U (1996) The role of polysialic acid in migration of olfactory bulb interneuron precursors in the subventricular zone. *Neuron* 16:735–743.
- Huang L, Devries GJ, Bittman EL (1998) Bromodeoxyuridine Labeling in the Brain of a Seasonally Breeding Mammal. *Journal of neurobiology*.
- Huszar D, Lynch C a, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson R a, Boston B a, Cone RD, Smith FJ, Campfield L a, Burn P, Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88:131–141.
- Hynes GR, Jones PJ (2001) Leptin and its role in lipid metabolism. *Current opinion in lipidology* 12:321–327.
- Ibáñez CF (2010) Beyond the cell surface: new mechanisms of receptor function. *Biochemical and biophysical research communications* 396:24–27.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nature neuroscience* 11:1153–1161.
- Jankovski A, Sotelo C (1996) Subventricular zone-olfactory bulb migratory pathway in the adult mouse: cellular composition and specificity as determined by heterochronic and heterotopic transplantation. *Journal of comparative neurology* 1 371:376–396.
- Johnstone LE, Fong TM, Leng G (2006) Neuronal activation in the hypothalamus and brainstem during feeding in rats. *Cell metabolism* 4:313–321.
- Keilhauer G, Faissner A, Schachner M (1985) Differential inhibition of neurone–neurone, neurone–astrocyte and astrocyte–astrocyte adhesion by L1, L2 and N-CAM antibodies. *Letters to Nature* 316:728–730.
- Kempermann G (2003) Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130:391–399.
- Kennedy G (1950) The hypothalamic control of food intake in rats. *proc r soc lond b biol sci* 137:535–549.

- Kim KW, Zhao L, Parker KL (2009) Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1. *Molecular and cellular endocrinology* 300:132–136.
- Kim WR, Chun SK, Kim TW, Kim H, Ono K, Takebayashi H, Ikenaka K, Oppenheim RW, Sun W (2011) Evidence for the spontaneous production but massive programmed cell death of new neurons in the subcallosal zone of the postnatal mouse brain. *The European journal of neuroscience* 33:599–611.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005a) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science (New York, NY)* 310:679–683.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2005b) Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science (New York, NY)* 310:679–683.
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS (2007) Evidence for Constitutive Neural Cell Proliferation in the Adult Murine. *Comparative and General Pharmacology* 220:209–220.
- Kow L, Pfaff D (1991) The effects of the TRH metabolite cyclo(His-Pro) and its analogs on feeding. *Pharmacology biochemistry behavior* 38:359–364.
- Kristensen P, Judge M, Thim L, Ribel U (1998) Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393:72–76.
- Kuhn H, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996) Neurogenesis in the Dentate Gyrus of the Adult Decrease of Neuronal Progenitor Proliferation Rat : Age-Related. *the journal of the neuroscience* 76:2027–2033.
- Kushi a, Sasai H, Koizumi H, Takeda N, Yokoyama M, Nakamura M (1998) Obesity and mild hyperinsulinemia found in neuropeptide Y-Y1 receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:15659–15664.
- Lambert D (2004) Comment les pattes viennent au serpent. *Essai sur l'étonnante plasticité du vivant.*
- Lee D a, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Miranda-Angulo A, Takiar V, Charubhumi V, Balordi F, Takebayashi H, Aja S, Ford E, Fishell G, Blackshaw S (2012) Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nature Neuroscience* 15.
- Legradi G, Lechan RM (1998) The Arcuate Nucleus Is the Major Source for Hormone Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Endocrinology* 139:3262–3270.
- Lehman M, Karsch F, Robinson J, Silverman A (1988) Ultrastructure and synaptic organization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons in the anestrous ewe. *Journal of comparative neurology* 273:447–458.
- Li C, Chen P, Smith MS (1999) Identification of neuronal input to the arcuate nucleus (ARH) activated during lactation: implications in the activation of neuropeptide Y neurons. *Brain research* 824:267–276.

- Li C, Chen P, Smith MS (2000) Corticotropin releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus are direct targets for neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus: an anterograde tracing study. *Brain research* 854:122–129.
- Li L, Xie T (2005) Stem cell niche: structure and function. *Annual review of cell and developmental biology* 21:605–631.
- Lindholm P, Voutilainen MH, Laurén J, Peränen J, Leppänen V-M, Andressoo J-O, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M (2007) Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature* 448:73–77.
- Lledo P-M, Alonso M, Grubb MS (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews Neuroscience* 7:179–193.
- Lois C, Alvarez-Buylla A (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science (New York, NY)* 264:1145–1148.
- Lu X-Y, Barsh GS, Akil H, Watson SJ (2003) Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:7863–7872.
- Ludwig DS, Tritos N a, Mastaitis JW, Kulkarni R, Kokkotou E, Elmquist J, Lowell B, Flier JS, Maratos-Flier E (2001) Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 107:379–386.
- Luiten PGM, Horst GJTER, Ens ABS (1987) The hypothalamus intrinsic connection and outflow pathways to the endocrine system and metabolism. *Progress in neurobiology* 28:1–54.
- Lyons WE, Mamounas L a, Ricaurte G a, Coppola V, Reid SW, Bora SH, Wihler C, Koliatsos VE, Tessarollo L (1999) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:15239–15244.
- Ma X, Zubcevic L, Brüning JC, Ashcroft FM, Burdakov D (2007) Electrical inhibition of identified anorexigenic POMC neurons by orexin/hypocretin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:1529–1533.
- Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E, Anderson P, Szczepaniak LS, Dobbins RL, McGarry JD, Parker KL (2002) Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 143:607–614.
- Mandaïron N, Sacquet J, Garcia S, Ravel N, Jourdan F, Didier A (2006) Neurogenic correlates of an olfactory discrimination task in the adult olfactory bulb. *The European journal of neuroscience* 24:3578–3588.

- Markakis E, Gage F (1999) Adult-generated neurons in the dentate gyrus send axonal projections to field CA3 and are surrounded by synaptic vesicles. *Journal of comparative neurology* 406:449–460.
- Marzban F, Tweedle CD, Hatton GI (1992) Reevaluation of the plasticity in the rat supraoptic nucleus after chronic dehydration using immunogold for oxytocin and vasopressin at the ultrastructural level. *Brain research bulletin* 28:757–766.
- Matsuzaki K, Katakura M, Hara T, Li G, Hashimoto M, Shido O (2009) Proliferation of neuronal progenitor cells and neuronal differentiation in the hypothalamus are enhanced in heat-acclimated rats. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 458:661–673.
- McClellan KM, Calver a R, Tobet S a (2008) GABAB receptors role in cell migration and positioning within the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience* 151:1119–1131.
- Mcnay DEG, Briançon N, Kokoeva MV, Maratos-flier E, Flier JS (2012) Remodeling of the arcuate nucleus energy- balance circuit is inhibited in obese mice. *Journal of clinical investigation* 122.
- Meister B, Ceccatelli S, Hokfelt T, Anden N, Anden M, Theodorsson E (1989) Neurotransmitters, neuropeptides and binding sites in the rat mediobasal hypothalamus: effects of monosodium glutamate (MSG) lesions. *Experimental Brain Research* 76:343–368.
- Migaud M, Batailler M, Segura S, Duittoz A, Franceschini I, Pilon D (2010) Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *The European journal of neuroscience* 32:2042–2052.
- Min K-J, Yang M, Kim S-U, Jou I, Joe E (2006) Astrocytes induce hemeoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26:1880–1887.
- Modney B, Hatton G (1989) Multiple synapse formation: a possible compensatory mechanism for increased cell size in rat supraoptic nucleus. *Journal of neuroendocrinology*:21–27.
- Moran TH, Ladenheim EE, Schwartz GJ (2001) Within-meal gut feedback signaling. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 25 Suppl 5:S39–41.
- Moreno M, Linster C, Escanilla O, Sacquet J, Didier A, Mandairon N (2009) Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *PNAS* 106:17980–17985.
- Morrison SJ, Spradling AC (2008) Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132:598–611.

- Mounien L, Bizet P, Boutelet I, Vaudry H, Jéjou S (2005) Expression of melanocortin MC3 and MC4 receptor mRNAs by neuropeptide Y neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* 82:164–170.
- Mountjoy K, Mortrud M, Low M, Simerly R, Cone R (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular endocrinology* 8:1298–1308.
- Mouret A, Gheusi G, Gabellec M-M, de Chaumont F, Olivo-Marin J-C, Lledo P-M (2008) Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:11511–11516.
- Mouret A, Lepousez G, Gras J, Gabellec M-M, Lledo P-M (2009) Turnover of newborn olfactory bulb neurons optimizes olfaction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29:12302–12314.
- Muroya S, Funahashi H, Yamanaka A, Kohno D, Uramura K, Nambu T, Shibahara M, Kuramochi M, Takigawa M, Yanagisawa M, Sakurai T, Shioda S, Yada T (2004) Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *The European journal of neuroscience* 19:1524–1534.
- Nagatsu T, Sawada M (2005) Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. *Curr Pharm Des* 11:999–1016.
- Okamoto M, Inoue K, Iwamura H, Terashima K, Soya H, Asashima M, Kuwabara T (2011) Reduction in paracrine Wnt3 factors during aging causes impaired adult neurogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25:3570–3582.
- Olgiate V, Netti C, Guidobono F, Pecile A (1980) The central GABAergic system and control of food intake under different experimental conditions. *Psychopharmacology* 68:163–137.
- Ollmann M, Wilson B, Yang Y, Kerns J, Chen Y, Gantz I, Barsh G (1997) Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278:135–138.
- Olmos G, Naftolin F, Perez J, Tranque P, Garcia-Segura LM (1989) Synaptic remodeling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience* 32:663–667.
- Olson B, Drutarosky M, Chow M, Hruby V, Stricker E, Verbalis J (1991a) Oxytocin and an oxytocin agonist administered centrally decrease food intake in rats. *Peptides* 12:113–118.
- Olson B, Drutarosky M, Stricker E, Verbalis J (1991b) Brain oxytocin receptors mediate corticotropin-releasing hormone-induced anorexia. *American journal of physiology* 260:R448–452.

- Olszewski PK et al. (2001) Role of α -MSH in the regulation of consummatory behavior : immunohistochemical evidence. *American journal of physiology* 281:R673–R680.
- Paillard J (1976) Réflexions sur l'usage du concept de plasticité.. *Journal de Psychologie Normale et Pathologique* 1:33–47.
- Palkovits M (1999) Interconnections between the Neuroendocrine Hypothalamus and the Central Autonomic System. *Frontiers in neuroendocrinology* 295:270–295.
- Parker RM, Herzog H (1999) Regional distribution of Y-receptor subtype mRNAs in rat brain. *The European journal of neuroscience* 11:1431–1448.
- Parry D, Goldsmith A (1993) Ultrastructural evidence for changes in synaptic input to the hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone neurons in photosensitive and photorefractory starlings. *Journal of neuroendocrinology*:387–395.
- Paton J a, Nottebohm FN (1984) Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science (New York, NY)* 225:1046–1048.
- Pekcec A, Löscher W, Potschka H (2006) Neurogenesis in the adult rat piriform cortex. *Neuroreport* 17:571–574.
- Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:6706–6717.
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:6106–6113.
- Picard-Riera N, Decker L, Nait-Oumesmar B (2003) cellules souches neurales adultes de la zone sous-ventriculaire et réparation des maladies démyélinisantes.
- Pierce A a, Xu AW (2010) De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:723–730.
- Pierre K, Bonhomme R, Dupouy B, Poulain D a, Theodosis DT (2001) The polysialylated neural cell adhesion molecule reaches cell surfaces of hypothalamic neurons and astrocytes via the constitutive pathway. *Neuroscience* 103:133–142.
- Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, Friedman JM, Horvath TL (2004) Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science (New York, NY)* 304:110–115.
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415:1030–1034.

- Pu S, Jain MR, Horvath TL, Diano S, Kalra PS, Kalra SP (1999) Interactions between neuropeptide Y and gamma-aminobutyric acid in stimulation of feeding: a morphological and pharmacological analysis. *Endocrinology* 140:933–940.
- Ramón y Cajal S, May R (1928) Degeneration and regeneration of the nervous system.
- Rocha SM, Cristovão AC, Campos FL, Fonseca CP, Baltazar G (2012) Astrocyte-derived GDNF is a potent inhibitor of microglial activation. *Neurobiology of disease*.
- Roseberry AG, Liu H, Jackson AC, Cai X, Friedman JM (2004) Neuropeptide Y-mediated inhibition of proopiomelanocortin neurons in the arcuate nucleus shows enhanced desensitization in ob/ob mice. *Neuron* 41:711–722.
- Rousselot P, Lois C, Alvarez-Buylla A (1995) Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *Journal of comparative neurology* 351:51–61.
- Rutishauser U, Watanabe M (1985) Specific alteration of NCAM-mediated cell adhesion by an endoneuraminidase. *The Journal of cell* 101.
- Rønn LC, Doherty P, Holm a, Berezin V, Bock E (2000) Neurite outgrowth induced by a synthetic peptide ligand of neural cell adhesion molecule requires fibroblast growth factor receptor activation. *Journal of neurochemistry* 75:665–671.
- Sakurai T et al. (1998) Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92:573–585.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science (New York, NY)* 301:805–809.
- Sawchenko P (1987) Evidence for differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivities in parvocellular neurosecretory and autonomic-related projections of the paraventricular nucleus. *Brain research* 437:253–263.
- Schaffhauser A, Stricker-Krongrad A, Brunner L, Cumin F, Gerald C, Whitebread S, Criscione L, Hofbauer K (1997) Inhibition of food intake by neuropeptide Y Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides. *Diabetes* 46:1792–1798.
- Schwartz M, Baskin D, Bukowski T, Kuijper J, Foster D, Lasser G, Prunkard D, Porte DJ, Woods S, Seeley R, Weigle D (1996) Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* 45:531–535.
- Sclafani A, Berner C, Maul G (1975) Multiple knife cuts between the medial and lateral hypothalamus in the rat: a reevaluation of hypothalamic feeding circuitry. *Journal of comparative physiology and psychology* 88:201–207.
- Segal-Lieberman G, Bradley RL, Kokkotou E, Carlson M, Trombly DJ, Wang X, Bates S, Myers MG, Flier JS, Maratos-Flier E (2003) Melanin-concentrating hormone is a critical

- mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10085–10090.
- Shors TJ, Miesegaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T, Gould E (2001) Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410:372–376.
- Smith M a, Hisadome K, Al-Qassab H, Heffron H, Withers DJ, Ashford MLJ (2007) Melanocortins and agouti-related protein modulate the excitability of two arcuate nucleus neuron populations by alteration of resting potassium conductances. *The Journal of physiology* 578:425–438.
- Stanfield B, Trice J (1988) Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Experimental Brain Research* 72:399–406.
- Stanley B, Kyrkouli S, Lampert S, Leibowitz S (1986) Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 7:1189–1192.
- Steppan CM, Swick a G (1999) A role for leptin in brain development. *Biochemical and biophysical research communications* 256:600–602.
- Sternson SM, Shepherd GMG, Friedman JM (2005) Topographic mapping of VMH → arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nature Neuroscience* 8:1356–1363.
- Theodosios D, Montagnese C, Rodriguez F (1986) Oxytocin induces morphological plasticity in the adult hypothalamo-neurohypophysial system. *Nature* 322:738–740.
- Theodosios D, Poulain D (1993) Activity-dependent neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience* 57:501–535.
- Theodosios D, Poulain D (1999) Contribution of astrocytes to activity-dependent structural plasticity in the adult brain. *Adv Exp Med Biol* 468:175–182.
- Theodosios D, Poulain D (2008) Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological reviews*:983–1008.
- Theodosios D, Rougon G, Poulain D (1991) Retention of embryonic features by an adult neuronal system capable of plasticity: polysialylated neural cell adhesion molecule in the hypothalamo-neurohypophysial. *Proceedings of the ...* 88:5494–5498.
- Theodosios DT, Piet R, Poulain D a, Olier SHR (2004) Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. *Neurochemistry international* 45:491–501.
- Thuret S, Toni N, Aigner S, Yeo GW, Gage FH (2009) Hippocampus-dependent learning is associated with adult neurogenesis in MRL/MpJ mice. *Hippocampus* 19:658–669.
- Tighilet B, Manrique C, Lacour M (2009) Stress axis plasticity during vestibular compensation in the adult cat. *Neuroscience* 160:716–730.

- van den Top M, Lee K, Whyment AD, Blanks AM, Spanswick D (2004) Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nature neuroscience* 7:493–494.
- Tweedle C, Hatton G (1977) Ultrastructural changes in rat hypothalamic neurosecretory cells and their associated glia during minimal dehydration and rehydration. *Cell tissue research* 181:59–72.
- Unger TJ, Calderon G a, Bradley LC, Sena-Esteves M, Rios M (2007) Selective deletion of *Bdnf* in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:14265–14274.
- Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B (1998) A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature* 20:113–114.
- Valenstein ES, Cox VC, Kakolewski JW (1968) Modification of motivated behavior elicited by electrical stimulation of the hypothalamus. *Science (New York, NY)* 159:1119–1121.
- Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S, Lowell BB (2011) Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron* 71:142–154.
- Vutskits L, Gascon E, Zraggen E, Kiss JZ (2006) The polysialylated neural cell adhesion molecule promotes neurogenesis in vitro. *Neurochemical research* 31:215–225.
- Walmod P, Kolkova K (2004) Zippers make signals: NCAM-mediated molecular interactions and signal transduction. *Neurochemical research* 29:2015–2035.
- Wang C, Bomberg E, Levine A, Billington C, Kotz CM (2007) Brain-derived neurotrophic factor in the ventromedial nucleus of the hypothalamus reduces energy intake. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 293:R1037–45.
- Williams G, Cai XJ, Elliott JC, Harrold J a (2004) Anabolic neuropeptides. *Physiology & behavior* 81:211–222.
- Witkin J, Ferin M, Popilskis S, Silverman A (1991) Effects of gonadal steroids on the ultrastructure of GnRH neurons in the rhesus monkey: synaptic input and glial apposition. *Endocrinology* 129:1083–1092.
- Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nature neuroscience* 6:736–742.
- Xu Y, Tamamaki N, Noda T, Kimura K, Itokazu Y, Matsumoto N, Dezawa M, Ide C (2005) Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Experimental neurology* 192:251–264.

- Yamaguchi M, Mori K (2005) Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:9697–9702.
- Yamanaka A, Beuckmann CT, Willie JT, Hara J, Tsujino N, Mieda M, Tominaga M, Yagami KI, Sugiyama F, Goto K, Yanagisawa M, Sakurai T (2003) Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron* 38:701–713.
- Yeo GSH, Connie Hung C-C, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, O’Rahilly S, Farooqi IS (2004) A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nature neuroscience* 7:1187–1189.
- Zarjevski N, Cusin I, Vettor R, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B (1993) Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 133:1753–1758.
- Zhang R, Dhillon H, Yin H, Yoshimura A, Lowell BB, Maratos-Flier E, Flier JS (2008) Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. *Endocrinology* 149:5654–5661.
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:7925–7930.
- Zheng H, Patterson LM, Morrison C, Banfield BW, Randall J a, Browning KN, Travagli R a, Berthoud H-R (2005) Melanin concentrating hormone innervation of caudal brainstem areas involved in gastrointestinal functions and energy balance. *Neuroscience* 135:611–625.