



HAL
open science

Etude de l'interface sang-noyau arqué hypothalamique au cours d'un déséquilibre énergétique : plasticité de l'éminence médiane et impact sur la régulation de la prise alimentaire

Fanny Langlet

► **To cite this version:**

Fanny Langlet. Etude de l'interface sang-noyau arqué hypothalamique au cours d'un déséquilibre énergétique : plasticité de l'éminence médiane et impact sur la régulation de la prise alimentaire. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S012 . tel-00965922

HAL Id: tel-00965922

<https://theses.hal.science/tel-00965922>

Submitted on 25 Mar 2014

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.

Université du Droit et de la Santé - Lille II

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille

THESE SCIENTIFIQUE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Spécialité : Neurosciences

Présentée par

FANNY LANGLET

**Etude de l'interface Sang-Noyau Arqué Hypothalamique
au cours d'un déséquilibre énergétique :
Plasticité de l'éminence médiane et impact sur la
régulation de la prise alimentaire**

Soutenue le 20 septembre 2013

<u>Rapporteurs</u>	Philippe Ciofi	Chargé de Recherche INSERM, Bordeaux
	Jean-François Gherzi-Egea	Chargé de Recherche INSERM, Lyon
<u>Examineurs</u>	Marie-Pierre Junier	Directeur de Recherche INSERM, Paris
	Luc Pénicaud	Directeur de Recherche CNRS, Dijon
	Serge Luquet	Chargé de Recherche CNRS, Paris
	Vincent Prévot	Directeur de Recherche INSERM, Lille
<u>Directeur de thèse</u>	Bénédicte Dehouck	Maître de Conférence, Artois

J'exprime tous mes remerciements à :

Messieurs les Docteurs Philippe Ciofi et Jean-François Gherzi-Egea qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci de prendre de votre temps afin d'évaluer et d'apporter des remarques judicieuses à ce manuscrit.

Madame le Docteur Marie-Pierre Junier et Monsieur le Docteur Luc Pénicaud pour leur présence en tant qu'examineur.

Monsieur le Docteur Serge Luquet d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Merci pour le temps que tu as consacré à ma recherche. Cela a été un réel plaisir de travailler et discuter science avec toi. J'ai hâte de pouvoir remettre ça sur de futurs projets communs.

Je tiens à remercier vivement :

Monsieur le Docteur Vincent Prévot pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir fait confiance durant ces cinq dernières années. Merci de m'avoir apporté les moyens scientifiques, techniques, et financiers nécessaires à la réalisation de mes travaux. Ta passion pour la Science et ton optimisme nous poussent toujours à aller plus loin. Je te suis également très reconnaissante de m'avoir « exportée » du laboratoire et offert l'opportunité de participer à de nombreux congrès et collaborations.

Madame le Docteur Bénédicte Dehouck pour m'avoir encadrée et guidée pendant ces cinq années au laboratoire. Tu as toujours été là pour moi malgré tes cours, qui te prenaient beaucoup de temps, ou ta famille, qui s'est agrandie depuis mon arrivée au labo, et je t'en suis très reconnaissante. Merci aussi pour l'autonomie que tu m'as laissée pour mener à bien mes projets, tout en restant disponible dans les moments où j'en avais besoin : c'est là tout l'art d'un bon directeur de thèse. Outre ta présence scientifique, tu as aussi su me soutenir dans les moments de doute et de « ras-le-bol ». Tout cela m'a permis de réaliser une thèse dans d'excellentes conditions et j'en garderai, malgré toutes les difficultés auxquelles nous avons dû faire face..., un très bon souvenir. Ca sera un réel plaisir de continuer à travailler ensemble les quelques mois avant mon post-doc... mais aussi dans l'avenir.

Monsieur le Docteur Jean-Claude Beauvillain pour votre grande gentillesse, votre écoute et vos précieux conseils. Merci d'être encore là pour nous malgré votre retraite : vous nous êtes d'une grande aide.

Monsieur le Docteur Sébastien Bouret, pour ses conseils avisés sur la régulation de la prise alimentaire et ses commentaires pertinents à propos de mes études.

Je remercie sincèrement :

Le Docteur Eglantine Balland... et oui docteur maintenant. Nous sommes arrivées en même temps au laboratoire et nous allons le quitter plus ou moins en même temps. Merci pour nos papotages, nos rigolades, nos nombreux cancons, nos soirées médisances autour de cocktails... et bien d'autres choses. Je te souhaite le meilleur pour ton post-doc et ta vie future... et n'oublie pas : toujours l'esprit tancyte girl power !!!!

Remerciements

Mademoiselle le Docteur Ariane Sharif, ma voisine de bureau depuis toujours, pour ton écoute, et nos petites discussions toujours très sympathiques. J'ai beaucoup apprécié ta compagnie et nos échanges au cours de ces 5 années. Je garderai également de très bon souvenir de mon week-end chez toi à Paris...

Mes deux miss, Sarah et Charlotte, pour le bon temps passé ensemble et nos fous rires. A nos soirées « aspirateur » à l'Irlandais ou nos soirées « milk shake » au Tam Tam... Je vous attends à New York pour aller faire la fête...

Mademoiselle le Docteur Emilie Caron pour ton écoute, ta gentillesse et ta disponibilité. On peut toujours compter sur toi pour n'importe quoi et à n'importe quel moment (genre panne de batterie sur le parking du labo un dimanche soir à 21h). Il y a très peu de gens comme toi, surtout ne change rien ! J'espère que tu obtiendras finalement ce poste qui tu mérites tant...

Madame le Docteur Odile Viltart et Mathieu. Merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Petite dédicace à Mathieu : désolée de t'avoir autant harcelé et taquiné durant ma thèse... mais j'y étais contraint, tu étais le petit nouveau après moi...

A toute la « Paolo team », JP, Filippo et Irene. Merci pour tous les bons moments au laboratoire (les dangereuses bombes de carboglace ...), mais aussi en dehors du labo (les après-midis barbecue, les repas indiens ou les soirées bowling ratées ...).

Mesdames Danièle Mazur, et Anne Loyens pour leur présence au quotidien. Je vous remercie pour votre accueil au sein de l'équipe, pour le partage de vos connaissances expérimentales et également pour nos pauses détente : je garde d'ailleurs quelques bonnes photos de ces moments...

Nadia pour ta sympathie. Je te souhaite beaucoup de plaisir et de belles découvertes scientifiques au sein du laboratoire.

Je tiens également à remercier Aurélie, Rémi, Julien, Bérengère, Sophie C, Gustav pour tous les bons moments passés au laboratoire.

Je remercie également tous ceux qui sont déjà partis :

Notamment Sophie S, Naresh, Nicole, Christelle, Céline... Même si le temps en votre compagnie fut court pour certains, j'en garde de très bons souvenirs et espère qu'on se reverra prochainement.

J'adresse un merci tout particulier au docteur Amandine Mullier. C'était toi qui présentais au premier Labmeeting auquel j'ai participé et tu m'as refilé tout de suite ta passion pour les tanocytes. Merci de m'avoir permis de reprendre ton sujet et de m'avoir formée aux techniques d'immunohistochimie et de microscopie. Merci également pour nos petits ateliers culinaires...

Je n'oublie pas non plus :

Madame Françoise Martin et Audrey Helleboy pour m'avoir fait confiance et formée à l'enseignement.

Tous les chercheurs, étudiants, ingénieurs et techniciens du centre de recherche Jean-Pierre Aubert pour leur accueil. Un merci également à l'équipe animalerie et aux membres du secrétariat pour leur grande aide. Un merci tout particulier à Sophie Lesage pour ton sourire, ta gentillesse et les innombrables ordres de mission que tu as dû faire pour moi ;)

Enfin je dédie ce travail :

A mes parents, Maman, Papa, JP et Cathy pour votre soutien. Vous avez toujours cru en moi et été là dans les bons et les mauvais moments, à m'épauler et à m'aider à me relever pour avancer toujours un peu plus. C'est en grande partie grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui.

A mes sœurs, Margox et Loulou, même si ça n'a pas toujours été très facile entre sœurs (enfin, j'me comprin' ...). Merci d'être là quand j'ai besoin de décompresser et de m'amuser. Vous allez devoir venir avec moi à New York pour me faire évacuer le stress du post-doc... Je vous aime très fort mes sœurs chéries ♥♥♥ ;)

A Papi et Mamie de Ronchin ... pour vous être occupés de moi durant ma thèse quand ça n'allait pas fort. J'ai passé de très bonnes soirées en votre compagnie et c'est promis, je viens bientôt manger à la maison ... Je vous remercie de tout mon cœur pour le soutien moral que vous m'avez apporté.

A toute ma famille qui est toujours là pour me soutenir. Tous ceux qui sont venus aujourd'hui assister à ma soutenance (et même du sud de la France) ainsi que tous ceux qui n'ont pas pu faire le déplacement.

A mes amis, en particulier à Lolo et Flo, pour tous les bons moments passés ensemble et pour leur soutien sans faille.

A Audrey ... C'est toi qui m'as donné envie de faire de la recherche et j'y suis finalement arrivée... Où que je sois, tu seras toujours dans mes pensées... Je ne t'oublierai jamais...

Enfin, je voudrais remercier de tout mon cœur Andrea. Merci de m'avoir soutenue dans cette dernière année de thèse qui n'a pas toujours été facile. Tu m'as été d'une grande aide aussi bien scientifiquement que moralement. Tu as su me donner confiance et force en moi durant les révisions du papier ... mais aussi me faire décompresser et oublier le labo avec tes bons petits plats italiens. Enfin, je te remercie d'avoir confiance en moi et de rester auprès de moi, malgré mon sale caractère (surtout ces derniers temps, j'en suis consciente) et mon côté « sable » ...

Le travail que j'ai réalisé au cours de ma thèse a donné lieu aux communications scientifiques suivantes :

ARTICLES SCIENTIFIQUES

1- Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Carmeliet P, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. **Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting.** Cell Metab. 2013 Apr 2; 17(4):607-17.

2- Schaeffer M*, Langlet F*, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, Lamarque L, Verdié P, Bourrier E, Dehouck B, Banères JL, Martinez J, Méry PF, Marie J, Trinquet E, Fehrentz JA, Prévot V, Mollard P. **Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons.** Proc Natl Acad Sci. USA 2013 Jan 22; 110(4):1512-7. * These authors contributed equally to this work.

3- Langlet F, Mullier A, Bouret SG, Prévot V, Dehouck B. **Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain.** J Comp Neurol. 2013 May 4.

4- Conductier G*, Brau F*, Viola A*, Langlet F, Ramkumar N, Dehouck B, Lemaire T, Chapot R, Lucas L, Rovère C, Maitre P, Hosseiny S, Petit-Paitel A, Adamantidis A, Lakaye B, Risold PY, Prévot V, Meste O, Nahon JL, Guyon A. **Melanin-concentrating hormone regulates beat frequency of ependymal cilia and ventricular volume.** Nat Neurosci. 2013 May 26. doi: 10.1038/nn.3401. * These authors contributed equally to this work.

5- Prevot V, Langlet F, Dehouck B. **Flipping the tanycyte switch: how circulating signals gain direct access to the metabolic brain.** Aging. 2013 May 11.

6- Giacobini P*, Campagne C*, Parkash J, Vanacker C, Casoni F, Langlet F, Cagnoni G, Hanchate NK, Mazur D, Verhaagen J, Ciofi P, Bouret SG, Tamagnone T and Prevot V. **The Endothelial-Cell-Derived Factor Semaphorin3A controls GnRH Axon Plasticity in the Adult Brain.** En revision dans Nature Neuroscience. * These authors contributed equally to this work.

7- Balland E, Dam J* , Steculorum S*, Langlet F*, Falluel-Morel A, Anouar Y, Dehouck B, Trinquet E, Jockers R, Bouret SG, Prévot V. **Tanycytes: a X-gated conduit for leptin into the hypothalamus.** En revision dans Cell Metab. * These authors contributed equally to this work.

8- Shirazi R, Palsdottir V, Collander J, Anesten F, Vogel H, Langlet F, Prevot V, Shao R, Jansson JO, Skibicka KP. **Glucagon-like peptide 1 receptor induced suppression of food intake and body weight is mediated by central IL-1 and IL-6.** Soumis dans PNAS

REVUE SCIENTIFIQUE

1- Méquinion M, Langlet F, Zgheib S, Dickson S, Dehouck B, Chauveau C, Viltart O. **Ghrelin: Central and Peripheral Implications in Anorexia Nervosa.** Front Endocrinol (Lausanne). 2013; 4:15.

ARTICLES SCIENTIFIQUES EN PREPARATION

1- Parkash J, Langlet F, Messina A, Cimino I, Loyens A, Mazur D, Gallet S, Balland E, Pralong F, Cagnoni G, Tamagnone L, Schellino R, De Marchis S, Mazzone M, Pasterkamp J, Prevot V, Giacobini P. **Functional Role for Semaphorin7A Signaling in Neuro-Glial Plasticity of the Hypothalamic Median Eminence.** *En préparation*

2- Osterstock G, El Yandouzi T, Romano N, Carmignac D, Langlet F, Coutry N, Schaeffer M, Chauvet N, Galibert E, Duvoid-Guillou A, Dehouck B, Robinson I, Prévot V, Mollard P, Plesnila N, Mery PF. **Sustained Alterations of hypothalamic tanycytes during post traumatic hypopituitarism in mice.** *En préparation*

COMMUNICATIONS DANS LE CADRE DE CONGRES NATIONAUX ET INTERNATIONAUX

Communications orales

2013 Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Carmeliet P, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. **Blood-brain interface in the metabolic brain is reorganized by tanycyte-derived VEGF-A during hypoglycemia resulting in the improved access of metabolic substrates to the arcuate nucleus.** Joint Franco-Belgian-British multinational meeting on blood-brain interfaces (SEISC), Arras, France.

2012 Langlet F, Levin BE, Luquet S, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Bouret SG, Prevot V & Dehouck B. **Fasting-induced hypoglycemia modulates blood-brain interface in the metabolic brain to ameliorate the access of peripheral feeding signals to the arcuate nucleus.** 38^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie (SNE), Banyuls-sur-Mer, France.

Communications affichées

2013 Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Carmeliet P, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. **Blood-brain interface in the metabolic brain is reorganized by tanycyte-derived VEGF-A during hypoglycemia resulting in the improved access of metabolic substrates to the arcuate nucleus.** Keystone symposium. Banff, Canada.

2012 Langlet F, Levin BE, Luquet S, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Bouret SG, Prevot V & Dehouck B. **Fasting-induced hypoglycemia modulates blood-brain interface in the metabolic brain to ameliorate the access of peripheral feeding signals to the arcuate nucleus.** 16th annual meeting of the LARC-neuroscience network. Portsmouth, England.

Langlet F, Luquet S., Lacombe A., Bouret S.G., Prévot V. & Dehouck B. **Fasting-induced hypoglycemia induces acute and reversible reorganization of the tanycytic barrier in the metabolic brain via VEGF signaling pathway activation.** Keystone symposium. Santa Fe, USA.

- 2011 Langlet F, Bouret S.G., Prévot V. & Dehouck B. **VEGF induces reversible plasticity of the tanycytic barrier in the median eminence in fasted mice.** Society for neuroscience 2011 (SFN). Washington, USA.
- Langlet F, Bouret S.G., Prévot V. & Dehouck B. **Fasting induces acute and reversible reorganization of the tanycytic barrier in the metabolic brain via VEGF signalling pathway activation.** 15th annual meeting of the LARC-neuroscience network. Rennes, France.
- Langlet F, Bouret S.G., Prévot V. & Dehouck B. **Fasting induces reversible plasticity of the tanycytic barrier in the median eminence.** 37^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie (SNE). Québec, Canada.
- 2010 Langlet F, Bouret S.G., Prévot V. & Dehouck B. **Fasting induces reversible plasticity of the tanycytic barrier in the median eminence.** 14th annual meeting of the LARC-neuroscience network. Lille, France.
- Langlet F, Bouret S.G., Prévot V. & Dehouck B., **Fasting induces plasticity of the capillary plexus in the median eminence by increasing the surface area of blood/brain exchanges.** 7th International Congress of Neuroendocrinology (ICN). Rouen, France.
- Langlet F, Bouret S.G., Prévot V. & Dehouck B., **Nutritional status influences plasticity in blood-hypothalamus barrier permeability.** Satellite symposia, 7th International Congress of Neuroendocrinology (ICN). Rouen, France.

Etude de l'interface Sang-Noyau Arqué Hypothalamique au cours d'un déséquilibre énergétique : Plasticité de l'éminence médiane et impact sur la régulation de la prise alimentaire

L'hypothalamus médiobasal contient de nombreux noyaux régulant l'homéostasie énergétique en réponse aux variations des signaux métaboliques périphériques, tels que les nutriments et les hormones, l'informant de l'état énergétique de l'individu. Parmi ces noyaux, le **noyau arqué hypothalamique (NA)** est considéré comme le noyau clé de la régulation de la prise alimentaire. En effet, il est capable de recevoir et d'intégrer les informations métaboliques périphériques, pour ensuite les relayer vers les autres noyaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire. Dans ce contexte, l'accès des molécules périphériques au NA est une étape importante dans la régulation de la prise alimentaire. L'organisation des interfaces sang/cerveau à ce niveau est d'ailleurs très particulière, suggérant une régulation spécifique de l'accès des molécules périphériques vers le NA. En effet, deux types de vaisseaux sont retrouvés dans cette région cérébrale : 1- les vaisseaux de la barrière hématoencéphalique (BHE) dans le NA et 2- les vaisseaux fenêtrés dans l'éminence médiane (EM), un organe circumventriculaire (OCV) adjacent au NA. Alors que les vaisseaux de la BHE présentent des propriétés de barrière et régulent les échanges sang/NA, les vaisseaux de l'EM possèdent de nombreuses fenestrations facilitant les échanges sang/EM. Ces deux types de vaisseaux ont la particularité d'être contactés par des cellules épendymaires hautement spécialisées formant le bas du 3^{ème} ventricule. Ces cellules, appelées « tanocytes », expriment des protéines de jonctions serrées suggérant leur participation à la régulation des échanges sang/cerveau dans cette région cérébrale. En effet, des études menées au sein du laboratoire ont montré que les tanocytes de l'EM, contactant les vaisseaux fenêtrés, expriment des protéines de jonctions serrées (JS) organisées en ceinture continue autour de leur pôle apical. Ces JS créent ainsi un épendyme étanche qui limite les échanges EM/LCR. A l'inverse, les tanocytes du NA, contactant les vaisseaux de la BHE, expriment des protéines de JS non organisées en leur pôle apical. L'épendyme du NA est ainsi perméable et favorise les échanges LCR/NA.

Le but de mon travail de thèse a donc été de comprendre, en prenant en compte tous ces éléments -c'est-à-dire la présence de **vaisseaux fenêtrés**, de **vaisseaux de la BHE** et des **tanocytes** -, comment est organisé l'accès des signaux métaboliques périphériques vers le NA et si cet accès pouvait être modulé afin de contrôler l'homéostasie énergétique. Nos expériences ont montré que, chez la souris mâle adulte, une glucopénie induite par le jeûne ou

par le 2-désoxyglucose induisait une réorganisation structurale des vaisseaux et de l'épendyme au niveau de l'EM et du NA, modifiant ainsi les échanges sang/cerveau. En effet, chez ces souris, nous avons observé une augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés au niveau de l'EM et du NA, ainsi qu'une réorganisation fonctionnelle des protéines de JS au niveau du ventricule : les tanocytes du NA, contactant des vaisseaux fenêtrés à présent, réorganisent leurs protéines de jonctions serrées (JS) afin d'assurer l'homéostasie cérébrale. Ces réorganisations induisent alors un meilleur accès des molécules périphériques vers le NA. De plus, nos résultats ont montré que cette plasticité est induite par le VEGF-A, produit localement par les tanocytes. En effet, la neutralisation du VEGF-A bloque la plasticité de l'EM/NA induite par l'hypoglycémie et perturbe la réponse physiologique hyperphagique lors de la réalimentation. Enfin, nos données supplémentaires indiquent que cette plasticité de l'EM/NA se produit également au cours de la journée, suggérant son implication dans le contrôle circadien de la prise alimentaire. En revanche, la plasticité de l'EM/NA est absente chez les animaux rendus obèses par une alimentation riche en graisse, un phénomène qui pourrait être à l'origine des problèmes d'hormonorésistance observés chez ces animaux.

Nos résultats apportent donc un nouveau concept dans la régulation de la prise alimentaire dans lequel les niveaux périphériques de glucose sont capables de moduler l'interface sang/NA afin de moduler l'accès des signaux métaboliques vers ce noyau hypothalamique. De plus, les autres OCV possédant une organisation similaire à l'EM (associant vaisseaux fenêtrés et barrière tanocytaire), mes résultats de thèse ouvrent aussi la voie à d'autres travaux en neuroendocrinologie destinés à élucider la présence d'un remaniement structural de ces interfaces nécessaire à la régulation d'autres fonctions physiologiques.

**« Il est aussi noble de tendre à l'équilibre qu'à la perfection ; car c'est
une perfection que de garder l'équilibre. »**

Jean Grenier

Liste des abréviations -----	p.1
Liste des figures -----	p.5
Avant-propos -----	p.7

Introduction -----	p.9
---------------------------	------------

Chapitre 1. Régulation hypothalamique de la prise alimentaire

1.1 Les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire -----	p.9
1.1.1 Importance de l'hypothalamus -----	p.9
1.1.2 Le noyau arqué hypothalamique -----	p.9
1.1.3 Le noyau ventromédian -----	p.13
1.1.4 Le noyau dorsomédian -----	p.13
1.1.5 Le noyau paraventriculaire -----	p.14
1.1.6 L'aire hypothalamique latérale -----	p.14
1.2 Les signaux périphériques régulant la prise alimentaire -----	p.15
1.2.1 Les hormones -----	p.15
A) <i>Les hormones d'adiposité</i> -----	p.15
<i>Leptine</i>	
<i>Adiponectine</i>	
<i>Résistine</i>	
<i>FGF21</i>	
B) <i>Les hormones pancréatiques</i> -----	p.19
<i>Insuline</i>	
<i>Glucagon</i>	
<i>Amyline</i>	
<i>Peptide pancréatique</i>	
C) <i>Les hormones du tractus gastro-intestinal</i> -----	p.21
<i>Ghréline</i>	
<i>Cholécystokinine</i>	
<i>Peptide YY</i>	
<i>Les peptides dérivés du proglucagon</i>	
<i>Obestatine</i>	
<i>Entérostatine</i>	
1.2.2 Les nutriments -----	p.23
A) <i>Glucose</i> -----	p.23
B) <i>Acides gras libres</i> -----	p.25
C) <i>Les acides aminés</i> -----	p.25

1.2.3 Modulation de la détection des signaux métaboliques -----	p.26
1.3 Les déséquilibres de la balance énergétique -----	p.27
1.3.1 Le jeûne -----	p.27
1.3.2 La prise alimentaire : une dérive vers l'obésité -----	p.29

Chapitre 2. Les interfaces sang-cerveau

2.1 Organisation neuroanatomique des barrières sang/cerveau -----	p.31
2.1.1 La barrière hémato-encéphalique -----	p.31
A) Présentation -----	p.31
B) Anatomie -----	p.32
<i>Les cellules endothéliales</i>	
<i>La lame basale</i>	
<i>Les péricytes</i>	
<i>Les astrocytes</i>	
C) Fonctions -----	p.34
2.1.2 Les plexus choroïdes -----	p.35
A) Présentation -----	p.35
B) Anatomie -----	p.35
<i>Le noyau fibro-vasculaire</i>	
<i>Les cellules épithéliales</i>	
C) Fonctions -----	p.36
2.1.3 Les organes circumventriculaires -----	p.37
A) Présentation -----	p.37
B) Anatomie de l'OVL, de l'OSF, de l'AP et de l'EM -----	p.38
<i>Les cellules épendymaires</i>	
<i>La couche interne</i>	
<i>La couche externe</i>	
C) Anatomie de l'organe subcommissural -----	p.39
D) Fonctions des organes circumventriculaires -----	p.40
2.2 Les jonctions serrées : régulateur des barrières sang/cerveau -----	p.41
2.2.1 Les protéines des jonctions serrées -----	p.41
2.2.2 Les fonctions des jonctions serrées -----	p.43
2.3 Accès des signaux métaboliques périphériques régulant la prise alimentaire vers le système nerveux central via les interfaces sang/cerveau -----	p.44
2.3.1 Transport transendothélial via les Transporteurs/Récepteurs -----	p.44
A) <i>Les transporteurs : le passage des nutriments</i> -----	p.45
B) <i>Transcytose médiée par les récepteurs : le passage des hormones</i> -----	p.46

2.3.2 Transfert d'information via les messagers de la barrière hémato-encéphalique -----	p.47
2.3.3 Transfert d'information via les influx nerveux -----	p.48
2.3.4 Accès facilité via les organes circumventriculaires -----	p.48
2.4 Développement et plasticité des interfaces sang-cerveau -----	p.49
2.4.1 Les cellules endothéliales -----	p.49
A) Développement et angiogenèse -----	p.49
B) Plasticité vasculaire à l'âge adulte -----	p.50
2.4.2 Les jonctions serrées -----	p.50
A) Développement et mise en place des propriétés de barrière -----	p.51
B) Plasticité des jonctions serrées à l'âge adulte -----	p.52
2.4.3 Plasticité des interfaces sang/cerveau lors de déséquilibres énergétiques -----	p.54
A) Le jeûne -----	p.54
B) Hyperphagie : Obésité et Diabète -----	p.55
<u>Chapitre 3. L'éminence médiane, une interface sang/liquide céphalorachidien/ noyau arqué dans l'hypothalamus médiobasal</u>	
3.1 La vasculature de l'hypothalamus médiobasal -----	p.57
3.1.1 Vascularisation de l'EM/NA et circulation sanguine -----	p.57
3.1.2 Les vaisseaux fenêtrés de l'éminence médiane -----	p.59
A) Morphologie d'une fenestration -----	p.59
B) Perméabilité des vaisseaux -----	p.61
3.1.3 Les vaisseaux de la barrière hémato-encéphalique du noyau arqué -----	p.62
3.2 L'épendyme de la région tubérale de l'hypothalamus -----	p.63
3.2.1 L'épendyme de la partie dorsale du 3 ^{ème} ventricule -----	p.63
3.2.2 L'épendyme de la partie ventrale du 3 ^{ème} ventricule -----	p.63
A) L'épendyme du noyau arqué -----	p.65
B) L'épendyme de l'éminence médiane -----	p.65
3.3 Des cellules épendymaires spécialisées, les tanocytes -----	p.66
3.3.1 Le tanocyte : une cellule bipolaire -----	p.66
3.3.2 Les tanocytes : une population hétérogène -----	p.66
3.3.3 Les tanocytes : une barrière épendymaire -----	p.67
3.4 Les tanocytes : une interface sang/cerveau -----	p.69
3.4.1 La barrière tanocytaire : régulation de la voie paracellulaire -----	p.69
3.4.2 Le transport tanocytaire : régulation de la voie transcellulaire -----	p.70

A) <i>La pinocytose</i>	p.70
B) <i>L'endocytose médiée par récepteur</i>	p.70
3.4.3 Accès des molécules périphériques vers le noyau arqué	p.72
A) <i>La diffusion de l'éminence médiane vers le noyau arqué</i>	p.73
B) <i>L'hypothèse du transport tanycytaire</i>	p.73
3.5 Rôle des tanocytes dans le contrôle de la prise alimentaire	p.74
3.5.1 Les tanocytes, des cellules glucosensibles	p.74
3.5.2 Les tanocytes expriment le GPR50	p.75
3.5.3 Les tanocytes et le système thyroïdien	p.76
3.5.4 Les tanocytes, des progéniteurs au service du contrôle de la prise alimentaire	p.76
3.6 L'EM : une interface hautement plastique	p.78
3.6.1 Plasticité dans la fonction de reproduction	p.78
3.6.2 Plasticité selon des rythmes saisonniers	p.79
3.6.3 Plasticité dans la régulation du métabolisme	p.80
Objectifs	p. 83
Résultats	p. 85
ARTICLE 1	
ARTICLE 2	
ARTICLE 3	
Résultats supplémentaires	p.91
Discussion	p.109
1. Extension des caractéristiques structurales de l'éminence médiane au noyau arqué	
1.1 Plasticité vasculaire : l'augmentation de la perméabilité vasculaire	
a) <i>Des vaisseaux fenêtrés dans le noyau arqué</i>	
b) <i>Les tanocytes à l'origine de la modulation de la perméabilité vasculaire</i>	
1.2 Plasticité des jonctions serrées : renforcement de la barrière tanycytaire	
a) <i>La claudine 1 : protéine clé dans la formation de jonctions serrées efficaces ?</i>	
b) <i>Mécanismes à l'origine de la réorganisation des protéines de jonctions serrées</i>	
c) <i>But de la réorganisation des protéines de jonctions serrées</i>	
2. Impact de la plasticité de l'éminence médiane sur les échanges sang/cerveau	

2.1 L'accès des molécules périphériques au noyau arqué

a) Un accès via les vaisseaux fenêtrés de l'éminence médiane et du noyau arqué

b) Un accès modifié par le remodelage de la barrière tanycytaire

c) L'accès des signaux métaboliques au noyau arqué

2.2 Impact sur la prise alimentaire

2.3 Autres conséquences de la plasticité de l'EM/NA sur des échanges sang/cerveau

a) Augmentation de la neurosécrétion dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire ?

b) Augmentation du transport transcellulaire tanycytaire ?

3. Problème d'accès des signaux métaboliques vers le noyau arqué chez les souris obèses

3.1 Les hormonorésistances

3.2 Organisation structurale perturbée au niveau de l'EM/NA

4. Le cas des autres organes circumventriculaires

Conclusion-Perspectives ----- p.125

Bibliographie ----- p.127

Annexes ----- p.163

EDITORIAL 1

ARTICLE 4

REVUE 1

Composition des nourritures utilisées au cours de mes études

2-DG	2-désoxyglucose
3 ^{ème}	troisième
4 ^{ème}	quatrième
AA	acide aminé
Adipo-R	récepteur à l'adiponectine
ADP	adénosine diphosphate
AGL	acide gras libre
AgRP	agouti-gene related peptide
AHL	aire hypothalamique latérale
Akt	protéine kinase B
AMP	adénosine monophosphate
AMPK	kinase activée par l'AMP
AP	area postrema
ARF	facteur de ribosylation de l'ADP
ATP	adénosine triphosphate
BCRP	protéine de résistance au cancer du sein
BDNF	facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BHE	barrière hémato-encéphalique
BrDU	bromodéoxyuridine
CART	cocaïne and amphetamine regulated transcript
CCK	cholécystokinine
CCK1/CCK2	récepteurs à la cholécystokinine 1 et 2
CNTF	ciliary neurotrophic factor
CRH	corticolibérine
DARPP32	dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein
DIO	diet-induced obesity
DIO1/DIO2/DIO3	déiodinases 1 à 3
DMH	noyau dorsomédian
EBA	endothelial barrier antigen
EM	éminence médiane
FGF	facteur de croissance des fibroblastes
FOXO	Forkhead box O
GABA	acide gamma-aminobutyrique
GDNF	facteur neurotrophe dérivé de la glie
GE	neurones excités par le glucose
GHS-R	récepteur à la ghréline
GI	neurones inhibés par le glucose
GLP	glucagon-like peptide
GLUT	transporteur au glucose
GnRH	gonadolibérine
GPR	G-protein-coupled receptor
HGE	neurones excités par de haute concentration en glucose
HGI	neurones inhibés par de haute concentration en glucose
HIF	facteur induit par l'hypoxie
icv	intraventriculaire

Ig	immunoglobuline
IGF	facteur de croissance apparenté à l'insuline
IL6	interleukine 6
Ins-R	récepteur à l'insuline
IRS	insulin receptor substrate
iv	intraveineuse
JAK	Janus kinase
JAM	junctional adhesion molecule
JS	jonction serrée
KO	knockout
LCR	liquide céphalorachidien
LDL	lipoprotéine de faible densité
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCH	hormone de mélano-concentration
MCH-R	récepteur à la MCH
MC-R	récepteur aux mélanocortines
MCT	monocarboxylate transporter
MRP	protéine de multirésistance aux médicaments
MECA-32	mouse panendothelial cell antigen
MMP	métalloprotéinases
MRP	protéines associées à la résistance multidrogue
MSH	mélanocortine
MT1/MT2	récepteurs à la mélatonine 1 et 2
mTor	mammalian target of rapamycin
NA	noyau arqué
NCAM	neural cell adhesion molecule
NOS	oxyde nitrique synthase
NO	monoxyde d'azote
NPY	neuropeptide Y
NTS	noyau du tractus solitaire
Ob-R	récepteur à la leptine
OCV	organe circumventriculaire
OSC	organe subcommissural
OSF	organe subfornical
OVLT	organe vasculaire de la lame terminale
OX-R	récepteur à l'orexine
PC	plexus choroïde
PC1/PC2	convertases des prohormones 1 et 2
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes
PGE2	prostaglandine E2
Pgp	glycoprotéine P
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PIP3	phosphatidylinositol triphosphate
PK	protéine kinase
POMC	pro-opiomélanocortine

PP	phosphatase
PV-1	protéine associée aux vésicules du plasmalemme 1
PVH	noyau paraventriculaire
Rab	ras-related protein
RALDH	retinaldehyde dehydrogenase
ROR	RAR-related orphan receptor
SGLT	transporteur au glucose dépendant du sodium
SNC	système nerveux central
SSeCKS	Src-suppressed C Kinase Substrate
STAT	signal transducers and activators of transcription
T1R	taste receptor type 1
T3	Tri-iodothyronine
T4	thyroxine
TEER	résistance électrique trans-épithéliale
TGF	facteur de croissance de transformation
TLR	toll-like receptor
TRH	hormone thyroïdienne
TRP	transient receptor potentiel
UCP2	Uncoupling Protein-2
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGF-R	récepteur au VEGF
VMH	noyau ventromédian
ZO	zonula occludens

Chapitre 1

- Figure 1** : Schéma représentant les circuits neuronaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire ----- **p.12**
- Tableau 1** : Accès et action des signaux métaboliques périphériques sur les neurones du noyau arqué ----- **p.18-19**
- Figure 2** : Variations des signaux métaboliques périphériques lors de déséquilibres énergétiques et effet sur les neurones du noyau arqué ----- **p.29**

Chapitre 2

- Tableau 1** : Accès et action des signaux métaboliques périphériques sur les neurones du noyau arqué ----- **p.18-19**
- Figure 3** : Schéma représentant le système ventriculaire et la circulation du LCR chez le rongeur ----- **p.37**
- Tableau 2** : Localisation, fonctions et projections des différents organes circumventriculaires ----- **p.40**
- Figure 4** : Représentation schématique des différentes barrières sang/cerveau ----- **p.43**

Chapitre 3

- Figure 5** : Vascularisation de l'éminence médiane et du noyau arqué ----- **p.58**
- Figure 6** : Organisation d'une fenestration ----- **p.62**
- Figure 7** : Les différents types d'épendyme au niveau du 3^{ème} ventricule de la région tubérale de l'hypothalamus ----- **p.64**
- Figure 8** : Schéma représentant l'organisation de l'interface sang/cerveau au niveau de l'hypothalamus médiobasal ----- **p.68**
- Figure 9** : Photographies montrant l'internalisation de la ghréline et de la leptine fluorescentes par les tanocytes de l'éminence médiane ----- **p.72**
- Figure 10** : Schéma représentant les mécanismes potentiels de détection du glucose par les tanocytes ----- **p.75**

Discussion

- Figure 11** : Photographie montrant un vaisseau qui s'étend de l'éminence médiane vers le noyau arqué ----- **p.110**
- Figure 12** : Schéma résumant les différents accès hypothétiques des molécules périphériques vers le noyau arqué en condition nourrie et à jeun ----- **p.118**

Un organisme vivant est capable de maintenir un état de stabilité relative de son milieu interne, et cela en dépit des changements constants de son environnement externe. Cette capacité qui lui permet de rester en vie a été introduite en biologie pour la première fois par Claude Bernard au début du 20^{ème} siècle et est résumée sous le terme d'**homéostasie**. L'organisme maintient son homéostasie principalement grâce à des *barrières* situées au niveau des interfaces entre son milieu interne et son environnement externe. Cependant, cette homéostasie n'est pas statique : en effet, il s'agit plutôt d'un état d'« équilibre dynamique » où les conditions du milieu interne varient sans cesse. La *barrière* séparant l'organisme de son environnement externe peut s'ouvrir à certains endroits créant ainsi des *fenêtres* sur l'extérieur et facilitant les échanges avec celui-ci. De ce fait, le milieu interne est le siège d'innombrables et continus changements oscillant autour d'un point d'équilibre.

Ce processus est notamment observé dans le contexte du contrôle de l'état énergétique de l'organisme. L'homéostasie énergétique, souvent représentée par une balance entre la prise alimentaire et la dépense énergétique, est un état d'équilibre dynamique permettant le maintien d'un poids corporel relativement stable à l'échelle d'une vie. Le comportement alimentaire permet alors de fournir la quantité d'énergie suffisante à la survie de l'individu et alterne des phases de prise alimentaire et des phases de satiété. Ainsi, bien que l'apport alimentaire varie considérablement d'un repas à l'autre, il contrebalance néanmoins assez bien la dépense énergétique à long terme. Ce phénomène reflète les processus de régulation que l'organisme peut mettre en place en réponse aux variations de son état énergétique. L'homéostasie énergétique est majoritairement contrôlée par le système nerveux central (SNC) via des circuits neuronaux, reliant à la fois des noyaux hypothalamiques et des noyaux du tronc cérébral. Ces noyaux intègrent des informations portées par des signaux métaboliques périphériques indiquant l'état de satiété et l'état des réserves énergétiques de l'individu, mais également des informations centrales d'ordre émotionnel, cognitif ou social.

Au sein de l'hypothalamus, le noyau arqué (NA) joue un rôle primordial dans la régulation de l'homéostasie énergétique : en effet, il est capable d'intégrer l'information portée par les signaux métaboliques périphériques et de la relayer ensuite aux autres noyaux régulant la prise alimentaire. Cette intégration d'information implique donc que les signaux périphériques accèdent au NA. Cependant, le cerveau est lui-même contraint de préserver son homéostasie afin d'assurer le bon fonctionnement neuronal et possède donc des *barrières* au niveau des interfaces sang/cerveau. Dans ce cas, comment le NA peut-il recevoir un rapport précis de l'état énergétique de l'organisme via les signaux périphériques ? Malgré la présence

d'une *barrière* entre le cerveau et la périphérie, il existe toutefois des *fenêtres* permettant des échanges facilités : celles-ci sont appelées les **organes circumventriculaires (OCV)**. Ces régions cérébrales sont impliquées dans la régulation de grandes fonctions physiologiques telles que la reproduction, la soif ou la prise alimentaire, et permettent un accès facilité dans leur parenchyme grâce à leurs vaisseaux fenêtrés. Dans le contexte de la régulation de la prise alimentaire, l'éminence médiane (EM) est un OCV à la position avantageuse, puisqu'elle se situe à proximité du NA : de nombreuses hypothèses suggèrent alors qu'elle pourrait constituer une porte d'entrée vers le NA pour les signaux métaboliques périphériques. Cependant, une *barrière* est tout de même présente dans cette région cérébrale : elle est localisée au niveau de cellules épendymaires spécialisées, appelées **tanycytes**, qui bordent le plancher du 3^{ème} ventricule et restreignent la diffusion des molécules périphériques vers le reste du cerveau.

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'accès des molécules périphériques au NA via l'EM. Pour cela, nous avons étudié l'organisation de l'EM/NA en prenant en compte à la fois les vaisseaux fenêtrés et la barrière tanycytaire. L'étude de ces deux constituants nous a permis de découvrir qu'ils communiquent entre eux, et régulent l'accès de signaux métaboliques vers le NA en fonction de l'état énergétique de la souris.

Avant de présenter l'ensemble de mes résultats, l'introduction de cette thèse présentera dans un premier temps les noyaux hypothalamiques et les signaux métaboliques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Ce chapitre aura pour but de montrer l'importance d'un des noyaux hypothalamiques, le noyau arqué, en tant que cible des signaux métaboliques périphériques. Dans un second temps, les interfaces sang/cerveau seront examinées : dans ce chapitre, nous verrons que ces interfaces sont le siège d'une barrière sang/cerveau régulant l'accès des signaux périphériques vers le SNC. Enfin, le troisième chapitre se focalisera sur l'organisation particulière de l'interface sang/cerveau/liquide céphalorachidien dans la région de l'éminence médiane et du noyau arqué hypothalamique.

Chapitre 1. Régulation hypothalamique de la prise alimentaire

1.1 Les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

1.1.1 Importance de l'hypothalamus

Des expériences réalisées dans les années 1940 ont montré toute l'importance de l'hypothalamus dans le contrôle de la prise alimentaire. En effet, des lésions ou des stimulations électriques de régions spécifiques de l'hypothalamus induisent des modifications de la prise alimentaire (Elmquist et al., 1999). Une lésion du noyau ventromédian hypothalamique (VMH) que l'on peut étendre au noyau arqué (NA) et au noyau dorsomédian (DMH) en raison du manque de précision de la technique, induit une hyperphagie et une prise de poids rapide (Hetherington and Ranson, 1940). A l'inverse, une lésion de l'aire hypothalamique latérale (AHL) provoque une diminution spontanée de la prise alimentaire (Anand and Brobeck, 1951; Hetherington and Ranson, 1940). De plus, des stimulations électriques dans l'AHL induisent une prise alimentaire même chez des animaux à satiété (Anand and Brobeck, 1951; Wyrwicka and Dobrzecka, 1960). Ces expériences ont donc conduit à identifier le VMH comme le «centre de la satiété» et l'AHL comme le «centre de la faim». En 1969, Olney découvre que la destruction sélective du NA est suffisante pour provoquer une obésité et un diabète, mettant en avant l'importance de ce noyau dans le contrôle de la prise alimentaire. Cependant, ces lésions n'étaient pas d'une grande précision, car elles détruisaient également les fibres connectant les noyaux les uns aux autres. De fait, Gold *et coll.* ont montré que des lésions détruisant les connections au noyau paraventriculaire (PVH) hypothalamique étaient souvent plus efficaces pour induire une hyperphagie que des lésions du VMH lui-même (1973). Cette étude marque donc pour la première fois l'importance des réseaux neuronaux dans la régulation de la prise alimentaire (Figure 1).

Les travaux de recherche de ces dernières années ont permis de mettre en évidence, chez l'animal, les noyaux hypothalamiques et leurs populations neuronales impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Ces populations neuronales reçoivent des informations portées par des signaux métaboliques périphériques renseignant le cerveau de l'état nutritionnel de l'individu. L'importance fonctionnelle de chacun de ces noyaux et leurs interactions mutuelles, en particulier chez l'homme, restent cependant loin d'être définies.

1.1.2 Le noyau arqué hypothalamique

Le noyau arqué (NA) est situé dans l'hypothalamus médiobasal, de chaque côté du 3^{ème} ventricule, à proximité de l'éminence médiane (EM), un organe circumventriculaire où les échanges sang/cerveau sont facilités par la présence de vaisseaux fenêtrés (Figure 1). Le NA

peut être divisé en deux sous-régions : la partie dorsomédiale et la partie ventrolatérale. En tenant compte de sa localisation et son organisation, le NA est considéré comme le noyau phare de la régulation de la prise alimentaire. En effet, il contient des populations neuronales sensibles aux signaux périphériques et serait par conséquent le premier noyau à intégrer leurs informations afin de les relayer vers les autres noyaux hypothalamiques.

Parmi les populations neuronales du NA, deux ont été particulièrement décrites dans la littérature en temps que populations clés de la régulation de la prise alimentaire. La 1^{ère} population co-exprime deux puissants stimulants de la prise alimentaire et inhibiteurs de la dépense énergétique : le **neuropeptide Y (NPY)** et **agouti-gene related peptide (AgRP)**. Leur effet orexigène a été montré grâce à des injections au niveau central ou par l'utilisation de souris transgéniques. En effet, l'injection intraventriculaire (icv) de NPY (Levine and Morley, 1984) ou d'AgRP (Rossi et al., 1998) stimule la prise alimentaire et la prise de poids. De plus, les souris transgéniques surexprimant le NPY mises sous alimentation riche en sucre (Kaga et al., 2001), ou celles surexprimant l'AgRP mises sous régime standard (Ollmann et al., 1997) sont hyperphagiques et développent une obésité. Une étude récente basée sur la technique d'optogénétique a également montré que la stimulation optique d'une petite population de neurones à AgRP était suffisante pour déclencher une prise alimentaire (AponTE et al., 2011). Par ailleurs, l'ablation des neurones AgRP à l'âge adulte chez la souris induit une forte baisse de la prise alimentaire (Gropp et al., 2005; Luquet et al., 2005). Cependant, des souris knockout (KO) soit pour *npy* (Erickson et al., 1996), soit pour *agrp*, ou pour les deux gènes (Qian et al., 2002) ne présentent pas de problèmes de prise alimentaire ou de poids. De même, des souris ayant subi une ablation des neurones AgRP en néonatal ou progressive (Bewick et al., 2005; Luquet et al., 2005; Xu et al., 2005a) n'ont pas non plus d'anomalies majeures de l'homéostasie énergétique (juste une légère perte de poids). Ces derniers résultats suggèrent la mise en place de systèmes compensatoires pouvant corriger l'absence d'un ou plusieurs neuropeptides orexigènes (Pierce and Xu, 2010). La 2^{nde} population neuronale co-exprime la **pro-opiomélanocortine (POMC)** et la **Cocaïne and Amphetamine Regulated Transcript (CART)**. La POMC est le précurseur des mélanocortines (α -MSH, β -MSH), synthétisées suite au clivage du POMC par les convertases des prohormones (PC1, PC2). Des injections icv de α -MSH ont montré son pouvoir anorexigène (Edwards et al., 2000). De plus, un KO *pomc* chez la souris (Yaswen et al., 1999) ou l'ablation des neurones à POMC (Xu et al., 2005a) induisent une obésité sévère. De même, chez l'homme, des mutations du gène *pomc* ont été détectées et provoquent une obésité importante (Krude et al., 1998). Concernant CART, son injection icv diminue la prise alimentaire (Aja et al., 2001; Kristensen et al., 1998) tandis que des souris KO *cart* développent, avec l'âge, un surpoids sous régime normal (Wierup et al., 2005).

Ainsi, selon l'état énergétique de l'individu, les deux populations neuronales du NA vont réagir différemment en réponse à ce qui se passe en périphérie. Lors d'une prise alimentaire, l'activité électrique des neurones anorexigènes et l'expression de la POMC/CART augmentent, tandis que l'activité électrique des neurones orexigènes et l'expression du NPY/AgRP diminuent. Cela induit une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense énergétique. A l'inverse, lors du jeûne, l'activité des neurones anorexigènes diminue, tandis que celle des neurones orexigènes augmente. Cela induit une augmentation de la prise alimentaire et une diminution de la dépense énergétique (Figure 2).

Les neurones à NPY/AgRP et à POMC/CART sont à l'origine des circuits neuronaux majeurs régulant la prise alimentaire. En effet, ces deux populations neuronales projettent vers tous les autres noyaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire, à savoir le PVH, le VMH, le DMH et l'AhL : ces noyaux seront décrits dans la suite de ce paragraphe (Figure 1) (Arora and Anubhuti, 2006). De façon générale, les neurones du NA sont qualifiés de neurones de 1^{er} ordre capables d'intégrer l'information portée par les signaux périphériques et envoyant des projections vers des neurones de 2nd ordre situés dans le PVH, le VMH, le DMH et l'AhL, afin de relayer cette information. Le NPY exerce son effet orexigène via les récepteurs Y1 et Y5, exprimés notamment dans le PVH (Nguyen et al., 2012). L' α -MSH inhibe la prise alimentaire via les récepteurs à la mélanocortine 3 et 4 (MC3-R, MC4-R), exprimés dans le PVH, l'AhL, le VMH et le DMH (Mountjoy et al., 1994). Une délétion de MC3-R chez la souris induit une augmentation de la masse grasse (Chen et al., 2000), tandis que la délétion de MC4-R provoque une hyperphagie, une diminution de la dépense énergétique et une obésité (Huszar et al., 1997). De même, une mutation de ces récepteurs chez l'homme induit une obésité (Farooqi et al., 2003; Lee et al., 2002; Yeo et al., 2003). AgRP agit principalement en tant qu'antagoniste des récepteurs à l' α -MSH et empêche l'effet anorexigène de cette dernière (Ollmann et al., 1997; Rossi et al., 1998). CART agirait principalement sur des sites du tronc cérébral : en effet, la rupture du flux du liquide céphalorachidien (LCR) entre le 3^{ème} et le 4^{ème} ventricule abolit l'effet anorexigène de CART injecté dans le 3^{ème} ventricule (Aja et al., 2001). Enfin, les populations neuronales du NA établissent également des connections entre elles. En effet, les neurones à NPY contactent les neurones à POMC adjacents afin de les inhiber, notamment grâce au GABA (Cowley et al., 2001; Liu et al., 2012b; Vong et al., 2011) (Figure 1). De plus, les neurones à NPY/AgRP et à POMC/CART pourraient être la cible de leur propre neuropeptide puisqu'ils expriment leurs récepteurs MC3-R, MC4-R, Y1 et Y2 (Broberger et al., 1997; Jégou et al., 2000; Mounien et al., 2005).

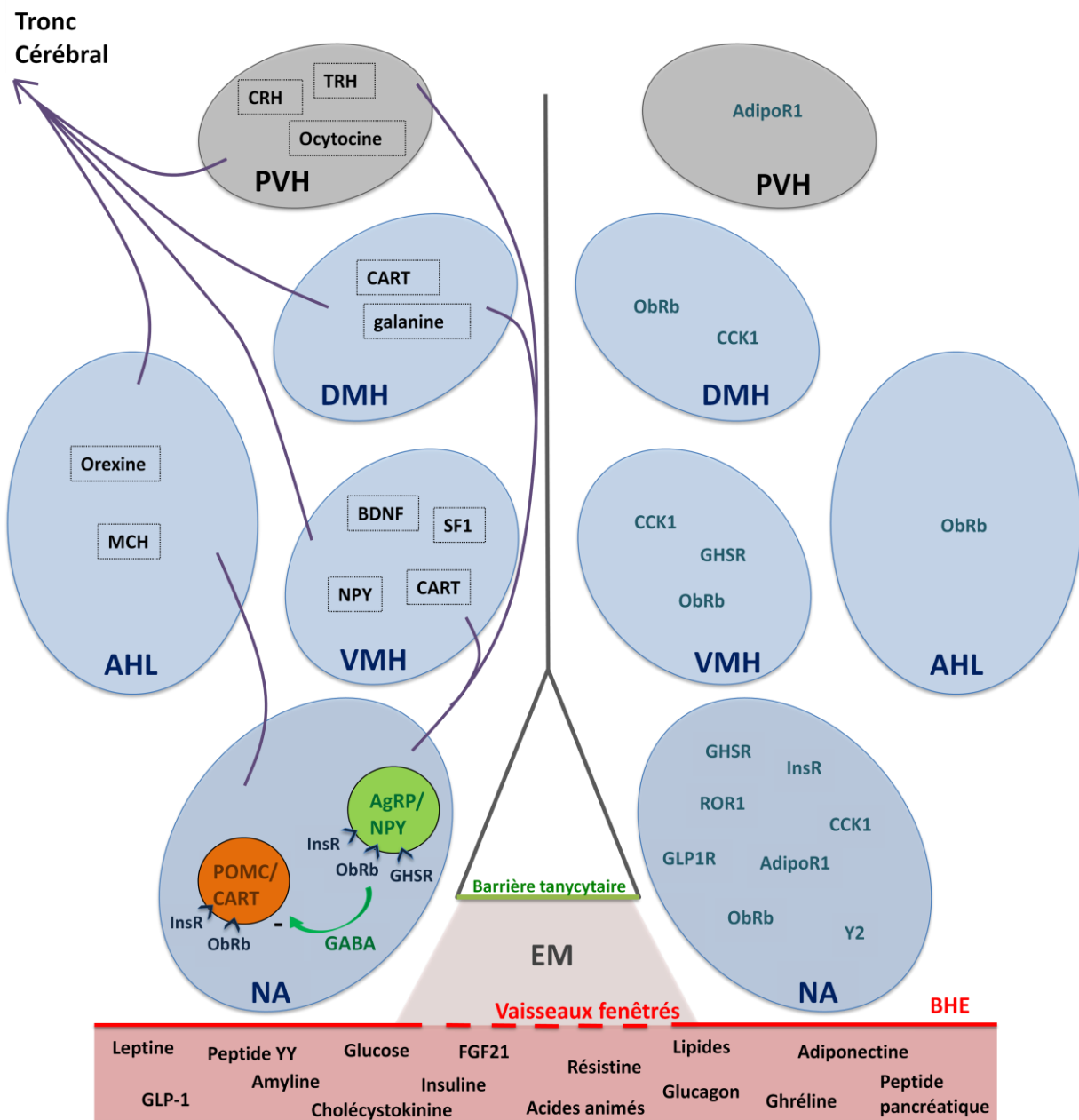


Figure 1 : Représentation schématique des circuits neuronaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire. Partie gauche, populations neuronales régulant la prise alimentaire présentes dans chaque noyau hypothalamique (non exhaustif). Partie droite, récepteurs aux signaux périphériques exprimés dans chaque noyau hypothalamique (non exhaustif). Les noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire communiquent les uns avec les autres formant ainsi des circuits neuronaux. Parmi ces noyaux, le noyau arqué (NA) joue un rôle majeur. En effet, il possède à la fois des neurones orexigènes (NPY/AgRP) et anorexigènes (POMC/CART), les récepteurs de nombreux signaux périphériques, et envoie des connexions vers tous les autres noyaux régulant la prise alimentaire. De plus, le NA se situe à proximité de l'éminence médiane (EM), un organe circumventriculaire où des vaisseaux fenêtrés facilitent les échanges sang/cerveau. NA, noyau arqué ; VMH, noyau ventromédian ; DMH, noyau dorsomédian ; AHL, aire hypothalamique latérale ; PVH, noyau paraventriculaire ; NPY, neuropeptide Y ; AgRP, agouti-gene related peptide ; POMC, pro-opiomélanocortine ; CART, Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript ; MCH, Hormone de mélanocortine ; SF1, facteur stéroïdogénique 1 ; BDNF, facteur neurotrophique dérivé du cerveau ; CRH, corticolibérine ; TRH, hormone thyroïdienne ; FGF21, fibroblaste growth factor 21 ; GLP-1, glucagon-like peptide 1 ; InsR, récepteur à l'insuline ; ObRb, récepteur à la leptine ; GHSR, récepteur à la ghréline ; GLP1R1, récepteur au GLP-1 ; ApidoR1, récepteur à l'adiponectine ; CCK1, récepteur à la CCK ; ROR1, RAR-related orphan receptor ; BHE, barrière hémato-encéphalique.

1.1.3 Le noyau ventromédian

Le noyau ventromédian (VMH), initialement considéré comme le «centre de la satiété», est situé de chaque côté du 3^{ème} ventricule, dorsalement au NA (Figure 1). De forme elliptique, le VMH est délimité par une zone sans cellule, riche en fibres et en dendrites. Il peut être divisé en 4 sous-régions : la partie dorsomédiale, la partie centrale, la partie ventrolatérale et la partie antérieure.

Les populations neuronales régulant la prise alimentaire sont assez hétérogènes au niveau du VMH. Certains neurones contiennent le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Xu et al., 2003), facteur réduisant la prise alimentaire et le poids suite à son injection icv (Pelleymounter et al., 1995; Xu et al., 2003). Certains neurones expriment le facteur stéroïdogénique 1, facteur de transcription impliqué dans le développement du VMH (McClellan et al., 2006) et dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Dhillon et al., 2006; Kim et al., 2011; Tong et al., 2007). Le VMH est essentiellement connu pour ses propriétés de senseur du glucose. En effet, l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle a montré chez l'homme que l'absorption de glucose induit une inhibition du VMH (Matsuda et al., 1999). Le VMH contient donc de nombreux neurones glucosensibles impliqués dans la régulation de la glycémie (Kang et al., 2004). Enfin, le VMH contient également des neurones exprimant l'oxyde nitrique synthase (NOS) sensibles au NPY (Fetissov et al., 2003) et nécessaire à la détection de l'hypoglycémie par les neurones glucosensibles (Fioramonti et al., 2010).

Le VMH appartient également aux circuits régulant la prise alimentaire et établit des connections avec le PVN, l'AHL, le DMH et le NTS. Le VMH reçoit également des projections du NA (Fu and van den Pol, 2008) et envoie des projections glutamatergiques vers les neurones à POMC (Sternson et al., 2005).

1.1.4 Le noyau dorsomédian

Le noyau dorsomédian (DMH) est situé de chaque côté du 3^{ème} ventricule, dorsalement au VMH, et caudalement au PVH (Figure 1). Il peut être divisé en 3 sous-régions : la partie antérieure, la partie ventrale et la partie postérieure.

Le DMH contient notamment des neurones à galanine, neuropeptide orexigène, dont une faible proportion répond à la leptine (Laque et al., 2013). Le DMH joue un rôle dans l'initiation de la prise alimentaire, et l'intégration des informations psychiques et somatosensorielles.

Le DMH établit de nombreuses connections avec les autres noyaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire (PVN, NA ou AHL), les structures limbiques et l'aire préoptique. Il reçoit notamment des terminaisons à NPY et à α -MSH issues du NA (Bouret et al., 2004a).

1.1.5 Le noyau paraventriculaire

Le noyau paraventriculaire (PVH) est un centre intégrateur situé de chaque côté du 3^{ème} ventricule, dans sa partie rostr dorsale (Figure 1). Sa destruction bilatérale conduit à une obésité, suggérant son rôle anorexigène (Aravich and Sclafani, 1983).

Le PVH contient des neurones exprimant la corticolibérine (CRH), l'hormone thyroïdienne (TRH), l'ocytocine et la vasopressine. Ces neuropeptides sont sécrétés dans le sang au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire ou de la neurohypophyse, et jouent un rôle important respectivement dans la régulation des niveaux de glucocorticoïdes, des hormones thyroïdiennes, la contraction utérine et la lactation, et de la balance hydrique. Ainsi, via les actions qu'ils exercent en périphérie, ces neuropeptides interviennent dans la régulation de la balance énergétique : par exemple, le contrôle des niveaux de glucocorticoïdes et d'hormones thyroïdiennes régule respectivement la production hépatique de glucose et la thermogénèse. De plus, les neurones du PVH peuvent aussi établir des connexions avec le tronc cérébral. Par exemple, les neurones à ocytocine, activés par la prise alimentaire, envoient des signaux vers le noyau du tractus solitaire (NTS) (Blevins et al., 2003).

Le PVN établit, lui aussi, de nombreuses connexions avec les autres noyaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire. Il reçoit de nombreuses projections des neurones à NPY/AGRP (Légradi and Lechan, 1998, 1999) et à POMC/CART du NA et est stimulé par ces neuropeptides : l'injection de NPY ou d'AgRP dans le PVH stimule la prise alimentaire (Taylor et al., 2007) tandis que l'injection d' α -MSH l'inhibe (Rossi et al., 1999).

1.1.6 L'aire hypothalamique latérale

L'aire hypothalamique latérale (AHL), considérée comme le «centre de la faim», est située latéralement aux noyaux décrits précédemment, de chaque côté de l'hypothalamus (Figure 1).

L'AHL contient deux populations neuronales principales impliquées dans le contrôle de la balance énergétique. La 1^{ère} exprime l'**orexine A et B** (ou hypocréatine), neuropeptides impliqués dans le contrôle de l'éveil et la prise alimentaire. En effet, des souris KO pour l'orexine deviennent narcoleptiques (Chemelli et al., 1999) et hypophagiques (Willie et al., 2001). De plus, les neurones exprimant l'orexine A sont stimulés par l'hypoglycémie et le jeûne (Karteris et al., 2005). La 2^{nde} population neuronale exprime l'**hormone de mélanocortination** (MCH), neuropeptide orexigène (Broberger et al., 1998). En effet, son injection icv ou dans l'hypothalamus stimule la prise alimentaire (Qu et al., 1996), tandis que des souris KO *mch* ne prennent pas de poids sous régime gras (Kokkotou et al., 2005) et celles KO *mchr1* (un des récepteurs de la MCH) sont minces et hyperactives (Marsh et al., 2002). L'AHL contient

également des neurones glucosensibles répondant aux faibles concentrations en glucose et de manière indépendante au métabolisme du glucose (González et al., 2009a). Enfin, l'AHL contient des neurones à la galanine et à neurotensine sensibles à la leptine (Laque et al., 2013).

L'AHL envoie des projections vers les autres noyaux hypothalamiques, le noyau du raphé, le NTS et le cortex. La MCH et l'orexine A et B exercent leur action orexigène respectivement via leurs récepteurs MCH1-R et MCH2-R et leurs récepteurs OX1-R et OX2-R. L'AHL reçoit et envoie des projections en particulier avec le NA. Les fibres à NPY, AgRP et α -MSH contactent les neurones à MCH et à orexine (Broberger et al., 1998), tandis que des fibres à orexine et MCH activent les neurones à NPY (van den Top et al., 2004) et inhibent les neurones à POMC (Abbott et al., 2003; Ma et al., 2007).

Ainsi, les différents noyaux hypothalamiques possèdent chacun un rôle dans le contrôle de la balance énergétique. Dans ce contexte, la notion de réseaux neuronaux orexigènes et anorexigènes est très importante : chaque noyau communique avec les autres pour contrôler la prise alimentaire. Parmi ces noyaux, le noyau arqué possède deux populations neuronales clés dans la régulation de la prise alimentaire et établit des connections avec la majorité des autres noyaux hypothalamiques. Temporellement le 1^{er} noyau à recevoir l'information métabolique périphérique, il la transmet ensuite aux autres noyaux hypothalamiques et supplémente donc les informations perçues par ces derniers, jouant ainsi le rôle de chef d'orchestre des circuits régulant la prise alimentaire.

1.2 Les signaux périphériques régulant la prise alimentaire

Afin d'assurer le contrôle de la balance énergétique, le cerveau doit être informé en permanence de l'état physiologique de l'individu. Cette information métabolique devant atteindre l'hypothalamus, et en particulier le NA, est portée par des signaux périphériques tels que des hormones sécrétées par les tissus périphériques, principalement par le tissu adipeux, le tractus gastro-intestinal et le pancréas, ou des nutriments issus de l'alimentation et des réserves énergétiques (Tableau 1).

1.2.1 Les hormones

A) Les hormones d'adiposité

Leptine

La leptine est une hormone satiétogène d'environ 16 kDa principalement synthétisée par le tissu adipeux. Son taux circulant reflète la quantité de la masse adipeuse, bien qu'à adiposité égale la leptine est plus élevée chez la femme que chez l'homme. La leptine a été identifiée en

1994 (Zhang et al., 1994), mais son existence est connue depuis les années 70 avec l'étude de modèles murins obèses *ob/ob* et diabétiques *db/db*. Grâce à des expériences de parabiose, Coleman a mis en évidence en 1969 l'existence de facteurs circulants de satiété régulant la prise alimentaire. En reliant le réseau vasculaire d'une souris *ob/ob* à celui d'une souris normale, la prise pondérale de la souris obèse diminue. En revanche, la liaison d'une souris *ob/ob* à une souris *db/db* mène à une perte de poids rapide uniquement de l'animal *ob/ob*. Il en conclut que la souris *ob/ob* ne produit pas de facteur de satiété mais y est sensible, tandis que la souris *db/db* en produit mais n'y est pas sensible (car elle n'exprime pas son récepteur) (Coleman, 2010). Ainsi, ce facteur, appelé plus tard leptine, exerce un effet anorexigène : en effet, son administration périphérique ou centrale diminue la prise alimentaire ainsi que la masse corporelle.

La leptine possède 6 récepteurs différents (Ob-Ra à Ob-Rf) issus de l'épissage alternatif du gène *db*. Parmi ces différentes isoformes, seule la forme b possède une région cytoplasmique longue permettant la transduction des signaux intracellulaires, tels que JAK/STAT3, et est responsable des effets anorexigènes de la leptine. Au niveau de l'hypothalamus métabolique, son récepteur Ob-Rb est fortement exprimé au niveau du NA, du DMH, de l'AhL et du VMH (Caron et al., 2010) (Figure 1). Le récepteur à la leptine est aussi retrouvé dans le tronc cérébral au niveau du noyau du raphé, du NTS et de l'aire tegmentale ventrale. Au niveau du NA, la leptine exerce son action, visualisée par la phosphorylation de STAT3, principalement sur les neurones NPY/AgRP et POMC/CART via son récepteur Ob-Rb. Elle inhibe les neurones à NPY/AgRP et active ceux à POMC/CART (Buchanan et al., 1998), en agissant à la fois sur l'activité électrique neuronale (Cowley et al., 2001; Vong et al., 2011) et l'expression des neuropeptides (Baskin et al., 1999; Buchanan et al., 1998). L'ablation de son récepteur dans les neurones orexigènes et anorexigènes du NA mène à une hyperphagie et à une augmentation de l'adiposité (van de Wall et al., 2008). Ainsi, si le tissu adipeux augmente, la leptine augmente elle aussi et diminue la prise alimentaire : ce processus fait parti de la **théorie lipostatique**, décrit par Kennedy en 1953. Par ailleurs, la leptine joue également un rôle dans la plasticité synaptique des neurones impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire (Pinto et al., 2004). Enfin, elle possède un rôle neurodéveloppemental puisqu'elle permet l'établissement de connexions des neurones à NPY et à POMC vers les autres noyaux hypothalamiques lors du développement (Bouret et al., 2004b).

Adiponectine

L'adiponectine est sécrétée principalement par les adipocytes. D'un poids moléculaire d'environ 28 kDa, elle diminue la sensibilité à l'insuline et est associée aux maladies liées à l'obésité comme le diabète de type 2. Contrairement à la leptine, le niveau d'adiponectine

circulant est inversement proportionnel à la quantité de tissu adipeux. L'effet qu'exerce cette hormone est assez controversé : certaines études indiquent que son injection icv induit une perte de poids (Coope et al., 2008; Qi et al., 2004) ; tandis que d'autres stipulent que son injection intraveineuse (iv) stimule la prise alimentaire (Kubota et al., 2007).

L'adiponectine agit via deux récepteurs, Adipo-R1 et R2, présents au niveau central, notamment dans le NA (Coope et al., 2008; Kubota et al., 2007), le PVH (Hoyda et al., 2007), le NTS (Hoyda et al., 2009), l'organe subfornical (Mimee et al., 2013) et l'area postrema (Fry et al., 2006). Les études sur les récepteurs à l'adiponectine expliquent en partie les réponses contradictoires quant à son effet sur la prise alimentaire et la dépense énergétique. En effet, une délétion du récepteur Adipo-R1 causerait une obésité liée à une diminution de la dépense énergétique, tandis que la délétion du récepteur Adipo-R2 causerait l'inverse (Bjursell et al., 2007). Au niveau du NA, Adipo-R1 et R2 sont exprimés par les neurones à NPY et à POMC (Guillod-Maximin et al., 2009). L'injection d'adiponectine engendre une activation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) (Guillod-Maximin et al., 2009; Kubota et al., 2007), enzyme également présente dans les voies de signalisation de la leptine et de l'insuline. Coope et coll. ont aussi montré que l'injection icv d'adiponectine active les voies de signalisation STAT3, IRS1/2-Akt-FOXO1 et JAK2-STAT3 (2008).

Résistine

La résistine est une hormone d'environ 12.5 kDa produite par le tissu adipeux. Chez l'Homme, elle serait sécrétée par les lymphocytes présents dans le tissu adipeux (Fain et al., 2003). La résistine induit notamment une résistance à l'insuline : en effet, son administration centrale affecte les réponses périphériques et hypothalamiques à l'insuline chez le rat (Benomar et al., 2013) alors que l'injection d'un anticorps anti-résistine chez des souris obèses restaure une sensibilité à l'insuline (Steppan et al., 2001). L'administration chronique de résistine réduit le poids mais pas la prise alimentaire suggérant un effet sur la dépense énergétique (Park et al., 2008).

Son récepteur et ses voies de signalisation sont encore inconnus. Cependant, de récentes études suggèrent que le « toll-like receptor » 4 (TLR4) (Benomar et al., 2013) ou encore le « RAR-related orphan receptor » 1 (ROR1) (Sánchez-Solana et al., 2012) pourraient être des récepteurs à la résistine. ROR1 est notamment exprimé dans le NA d'après Allen Brain atlas. Au niveau du NA, la résistine augmente le facteur de transcription c-Fos chez le rat à jeun, associé à une diminution de la prise alimentaire (Tovar et al., 2005). Ce phénomène est associé à une diminution de l'expression d'AgRP et NPY et une augmentation de celle de POMC (Vázquez et al., 2008).

Introduction

Signal	Taille	Effet sur la balance énergétique	Origine tissulaire principale	Action sur le NA	Voie d'accès supposée au SNC
Leptine	16 kDa	Anorexigène	Tissu adipeux	- Inhibition des neurones à NPY/AgRP - Activation des neurones à POMC/CART - ↗ l'expression de POMC - ↘ l'expression de NPY, d'AgRP	- BHE (Banks 1996) - PC (Zlokovic 2000) - EM (Banks 1996) - Nerf vague (Gaige S 2002) - Origine centrale (Morash 1999)
Résistine	12.5 kDa	Anorexigène	Tissu adipeux	- Activation c-Fos chez des rats à jeun (Tovar 2005) - ↗ l'expression de POMC (Vazquez MJ 2008) - ↘ l'expression de NPY, d'AgRP (Vazquez MJ 2008)	? => présent dans le LCR (Kos K 2007) => donc transport
Adiponectine	28 kDa	?	Tissu adipeux	- Récepteurs exprimés par les neurones NPY et POMC (Guillod-Maximin 2009)	- Pas via la BHE (Pan W 2006) - Cytokine IL6 (Spranger 2006)
FGF21	20 kDa	ND	Tissu adipeux Foie	ND	- BHE (non saturable) (Hsueh 2007)
Insuline	6 kDa	Anorexigène	Cellules β pancréatiques	- ↗ l'expression de POMC - ↘ l'expression de NPY, d'AgRP - activation de la voie PI3K/Akt dans les POMC	- BHE (Banks 1997) - EM (Van Houten M 1980) - PC (Baskin 1986)
Glucagon	3.5 kDa	Anorexigène	Cellules α pancréatiques	ND	ND
Amyline	3.9 kDa	Anorexigène	Cellules β pancréatiques	- Inhibition des neurones à NPY (Davidowa H 2004) - Pas de changement d'expression de NPY, POMC, AgRP	- Messenger cAMP (Riediger T 2001) - Area Postrema (Riediger T 2001) - Nerf vague (Iwasaki Y 2012)
PP	4 kDa	Anorexigène	Cellules F pancréatiques	- Inhibition des neurones GABA (Acuna goycolea 2005) - ↗ l'expression de POMC via Y4R (Lin S 2009)	- Nerf vague (Iwasaki Y 2012)
Ghréline	4 kDa	Orexigène	Estomac	- ↗ l'expression de NPY, d'AgRP (Nakazato M 2001, Kamegai J 2001). - Activation des neurones NPY (Dickson 2000) - Inhibition des neurones POMC par les neurones NPY (Cowley 2003)	- BHE (Banks 2002) - Messenger NO (Aslan 2009) - Origine centrale (Cowley 2003) - Nerf vague (Date 2002)
CCK	8 à 83 AA	Anorexigène	Cellules duodénales et iléales	ND	- Nerf vague (Iwasaki Y 2012) - Origine centrale (Juanedac 2001)
PYY	36 AA	Anorexigène	Cellules L de l'intestin	- Inhibition des neurones à NPY (Batterham 2002, Acuna goycolea 2005) - ↘ l'expression de NPY (Batterham 2002).	- Nerf vague (Iwasaki Y 2012)
GLP-1	29/30 AA	Anorexigène	Cellules entéroendocrines de l'intestin	- Activation c-Fos (Larsen PJ 1997) - Activation électrique des neurones POMC (Ma x 2007) - Activation de neurones sensibles à la ghréline (Riediger T 2010)	- Nerf vague (Iwasaki Y 2012) - Diffusion BHE (Kastin 2002) - PC (Alvarez E 1996)
Oxyntomoduline	37 AA	Anorexigène	Cellules L de l'intestin	- Activation de neurones sensibles à la ghréline (Riediger T 2010) - Inhibition de son action par injection dans NA d'antagonistes à GLP-1R (Dakin CL 2004)	- Nerf vague (Anini Y 2000)
Glicentine	69 AA	Anorexigène	Cellules L de l'intestin	ND	- Nerf vague (Anini Y 2000)
Obestatine	23 AA	Anorexigène	Estomac	- Inhibition de l'activation c-Fos induite par la ghréline par un variant de l'obestatine, Q90L (Hassouna R 2012)	- Pas de BHE (Pan W 2006)
Enterostatine	5 AA	Anorexigène	Intestin grêle	- Activation c-Fos dans les neurones à POMC via une action sur l'amygdale	- BHE (Koizumi M 2002)

Glucose	180 Da	Anorexigène	Alimentation Glycolyse Néoglucogénèse	- Inhibition des neurones AgRP/NPY - Activation des neurones à POMC	- BHE - PC
Lipide	-	Anorexigène	Alimentation Lipolyse	- longues chaînes d'AGL => ∇ l'expression de NPY, d'AgRP	Diffusion des membranes plasmiques
Acide aminé	≈ 110 Da	Anorexigène	Alimentation	- Action sur les neurones à NPY et à POMC via mTor (Cota D 2006)	BHE (Abbott 2010) PC (Redzic 2005)

Tableau 1 : Accès et action des signaux métaboliques périphériques sur les neurones du noyau arqué. Ce tableau donne une liste non exhaustive de signaux métaboliques périphériques, ainsi que leur action au niveau du noyau arqué hypothalamique et la façon dont ils accèdent au système nerveux central.

FGF21

Les facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), peptides d'environ 20 kDa, tirent leur nom de leur capacité à stimuler la prolifération des fibroblastes. Le FGF21 est sécrété par le foie et le tissu adipeux en réponse à de hautes concentrations en acides gras libres (lors de jeûne ou d'activité physique intense). Le FGF21 a pour but d'améliorer la production de corps cétoniques, l'oxydation des acides gras libres et d'augmenter la capture du glucose par le tissu adipeux (Cuevas-Ramos et al., 2009). Sa surexpression chez la souris protège contre la prise de poids en régime gras, tandis que son injection chez des souris obèses permet d'améliorer la glycémie et de réduire l'adiposité (Coskun et al., 2008).

B) Les hormones pancréatiques

Insuline

L'insuline est une hormone de 6 kDa sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Sa sécrétion postprandiale est stimulée par l'arrivée de glucose dans la circulation porte. En périphérie, elle est hypoglycémisante. Elle favorise l'assimilation et le stockage de glucose sous forme de glycogène par les muscles et le foie. Elle bloque également la production de glucose et stimule la conversion des glucides en acides gras libres en vue de leur stockage dans le tissu adipeux. Au niveau central, elle a un effet anorexigène. Injectée en icv, elle diminue la prise alimentaire et engendre une perte de poids (McGowan et al., 1992).

L'insuline exerce ses effets via son récepteur tétramérique Ins-R : il possède deux sous-unités extracellulaires α liant l'insuline et deux sous-unités intracellulaire β se phosphorylant suite à la liaison de l'insuline et déclenchant les voies de signalisation, telles que la voie des MAPK, de PI3K-Akt ou JAK/STAT. Au niveau hypothalamique, son récepteur est fortement exprimé au niveau du NA (Marks et al., 1990) et sur des terminaisons axonales se projetant dans l'EM (van Houten et al., 1980). Dans le NA, l'insuline agit sur les neurones à NPY/AgRP et à POMC/CART : elle diminue l'expression de NPY (Schwartz et al., 1992) et augmente celle de POMC (Porte et al., 2002). Par ailleurs, l'action de l'insuline sur les neurones AgRP permet

d'induire la suppression de la production hépatique de glucose (Könner et al., 2007; Lin et al., 2010) ; tandis que son action sur les neurones à POMC augmente la dépense énergétique et l'activité locomotrice (Lin et al., 2010), via l'inhibition du facteur de transcription FOXO1 (Plum et al., 2012). De plus, il est intéressant de relever que l'insuline stimule aussi la synthèse de leptine au niveau du tissu adipeux. En effet, les taux de leptine augmentent 4 à 5 heures après les repas, proportionnellement aux taux d'insuline. Il s'agit de l'axe adipo-insulaire (Kieffer and Habener, 2000). Par conséquent, le rôle propre de l'insuline dans le contrôle de la prise alimentaire est difficile à déterminer car elle possède un effet à la fois sur la glycémie et sur les niveaux de leptine périphérique. L'insuline apparaît donc plus comme un signal reflétant l'interaction entre les processus métaboliques et le niveau d'adiposité.

Glucagon

Le glucagon est une hormone peptidique de 3.5 kDa sécrétée par les cellules α des îlots de Langerhans du pancréas et dont la sécrétion est stimulée lorsque le taux de glucose sanguin diminue fortement. Hyperglycémiant, il constitue l'«antagoniste» de l'insuline. L'action du glucagon consiste à ramener la glycémie vers sa valeur physiologique, en induisant la glycogénolyse au niveau du foie et des muscles, et l'hydrolyse des triglycérides au niveau des adipocytes. Concernant la balance énergétique, l'administration périphérique de glucagon diminue la prise alimentaire et le poids chez les rats et les humains (Holloway and Stevenson, 1964; Schulman et al., 1957).

Amyline

L'amyline est une hormone peptidique de 3.9 kDa co-sécrétée avec l'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. A l'inverse de l'insuline, l'amyline a un effet hyperglycémiant en favorisant la dégradation du glycogène. L'amyline joue également un rôle important dans l'ostéoporose en inhibant la résorption osseuse (Dacquin et al., 2004) et en stimulant les ostéoblastes (Cornish et al., 1995). Concernant la balance énergétique, l'administration périphérique ou centrale d'amyline diminue la prise alimentaire et le poids (Reidelberger et al., 2002; Smeltzer et al., 2012).

Peptide pancréatique

Le peptide pancréatique, ou polypeptide pancréatique, est sécrété par les cellules F des îlots de Langerhans et les cellules EC1 de l'estomac et de l'intestin. Sa concentration augmente rapidement après un repas : il exerce des effets inhibiteurs sur les sécrétions biliaires et pancréatiques exocrines. De la même famille que le NPY, il exerce son action via le récepteur Y4 et inhibe la prise alimentaire.

C) Les hormones du tractus gastro-intestinal

Ghréline

La ghréline est la seule hormone orexigène connue à ce jour (Kojima et al., 1999). D'environ 4 kDa, elle est essentiellement sécrétée par les cellules P/D1 de l'estomac. Sa sécrétion se produit avant chaque repas et s'arrête quand le pH gastrique diminue avec l'arrivée du bol alimentaire. Son administration en périphérie ou en icv induit une prise alimentaire : elle a donc été surnommée l'hormone de la faim. Par ailleurs, des études chez le rongeur (Thompson et al., 2004; Tschöp et al., 2000) et chez l'homme (Rodríguez et al., 2009) suggèrent que la ghréline joue également un rôle dans la régulation du poids à plus long terme, en favorisant l'adipogenèse.

La ghréline induit ses effets via le récepteur GHS-R. Ce récepteur est exprimé principalement dans le NA, le VMH, le noyau suprachiasmatique, l'AP et la substance noire (Zigman et al., 2006). Au niveau du NA, l'administration de la ghréline induit une activation c-Fos dans les neurones à NPY/AgRP, associée à une augmentation de l'expression de NPY et d'AgRP (Dickson and Luckman, 1997; Nakazato et al., 2001), et induit par conséquent une forte stimulation de la prise alimentaire. Cette stimulation des neurones à NPY engendre en parallèle l'inhibition des neurones à POMC (Cowley et al., 2003), renforçant ainsi l'effet orexigène. Il faut aussi préciser que ces effets orexigènes sont portés par la forme acylée de la ghréline : en effet, la forme desacylée diminuerait la prise alimentaire en agissant sur les neurones CART (Asakawa et al., 2005).

Cholécystokinine

La cholécystokinine (CCK) est une hormone satiétogène sécrétée par les cellules L duodénales et iléales dans la circulation sanguine suite à l'arrivée de lipides et de protéines dans la lumière intestinale. La CCK intervient notamment dans la sécrétion d'enzymes pancréatiques dans la lumière intestinale afin de favoriser la digestion des lipides et des protéines du bol alimentaire. Concernant son action dans la régulation de la balance énergétique, son administration périphérique (Gibbs et al., 1973) ou centrale (Matson et al., 2000) diminue la prise alimentaire, notamment en accélérant la sensation de satiété.

Deux récepteurs à la CCK ont été identifiés : CCK1 et CCK2. La CCK agit principalement via le nerf vague, qui se projette vers le tronc cérébral. En effet, les afférences vagales innervant la muqueuse intestinale expriment le récepteur CCK1 et la vagotomie bloque les effets de la CCK injectée en périphérie. Outre l'emprunt de la voie vagale, la CCK pourrait aussi exercer ses effets via des récepteurs situés au niveau du NA, du VMH, du DMH (Mercer and Beart, 2004) et sur des cellules épendymaires du 3^{ème} ventricule (Ozaki et al., 2013).

Peptide YY

Le peptide YY, peptide de 36 AA, est sécrété par les cellules L de l'iléon, du côlon et du rectum proportionnellement au contenu énergétique du repas. Son administration périphérique diminue la prise alimentaire et la masse corporelle (Batterham et al., 2002). De la même famille que le NPY, le peptide YY exerce son action via les récepteurs Y couplés aux protéines G, en particulier le récepteur Y2. Ce récepteur est notamment exprimé par les neurones à NPY et à POMC (Broberger et al., 1997): les effets anorexigènes du peptide YY passeraient donc par l'inhibition de l'activité des neurones à NPY, la diminution de l'expression du NPY et l'augmentation modérée de l'activité des neurones à POMC (Batterham et al., 2002).

Les peptides dérivés du proglucagon

Les peptides dérivés du proglucagon sont issus du clivage posttranscriptionnel et tissu spécifique du proglucagon, réalisé par les convertases des prohormones PC1 et PC2. Les plus connus sont les glucagon-like peptides (GLP-1 et 2) synthétisés par les cellules entéroendocrines de l'intestin. Le GLP-1, peptide de 29 ou 30 AA, est sécrété par l'intestin grêle en réponse à la prise alimentaire. Il participe à l'homéostasie glucidique en favorisant la sécrétion d'insuline et en inhibant celle du glucagon (Komatsu et al., 1989; Sandoval et al., 2008). Concernant la balance énergétique, l'injection périphérique ou centrale de GLP-1 chez le rongeur diminue de façon très importante la prise alimentaire.

Au niveau central, les récepteurs au GLP-1 sont localisés dans l'hypothalamus (Shughrue et al., 1996), en particulier dans les neurones à POMC du NA (Sandoval et al., 2008). Au niveau du NA, le GLP-1 induit une activation c-Fos (Larsen et al., 1997), et une activation électrique des neurones POMC (Ma et al., 2007).

Les autres peptides dérivés du glucagon exerçant un rôle dans le contrôle de la prise alimentaire sont la glicentine et l'oxyntomoduline (Sinclair and Drucker, 2005). Elles réduisent notamment les sécrétions gastriques et ralentissent le vidage gastrique.

Obestatine

L'obestatine est une hormone peptidique de 23 AA dérivée du même peptide précurseur que la ghréline, la préproghréline. A l'inverse de la ghréline, l'obestatine réduit la prise alimentaire (Lacquaniti et al., 2011; Zhang et al., 2005). Le GPR39 serait son récepteur (Zhang et al., 2005).

Entérostatine

L'entérostatine est un pentapeptide anorexigène de 5 AA formé dans la lumière de l'intestin grêle à partir de la procolipase pancréatique. Elle réduit la prise alimentaire et inhibe la sécrétion d'insuline. La sous-unité β de la F1-ATPase mitochondriale serait son récepteur (Park et al., 2004).

1.2.2 Les nutriments

Outre les signaux hormonaux, de nombreuses études montrent que les nutriments, mis à part leurs rôles structuraux et/ou énergétiques, sont également capables d'activer ou inhiber certains neurones hypothalamiques afin de réguler la balance énergétique.

A) Glucose

Le glucose représente la source d'énergie majeure du SNC. Ainsi, il est vital qu'une homéostasie glucidique, à l'instar de l'homéostasie énergétique, soit maintenue en permanence dans l'organisme ($\approx 5,5$ mM). La première étude démontrant un rôle du cerveau dans le contrôle de la glycémie remonte à 1855. Claude Bernard avait montré que des lésions hypothalamiques chez le chien induisaient une hyperglycémie. Le maintien de l'homéostasie glucidique repose sur la capacité de notre organisme à évaluer le taux plasmatique du glucose. En 1953, John Mayer propose alors que des cellules localisées dans l'hypothalamus pourraient détecter les variations glucidiques et traduire ces variations en signaux électriques ou chimiques pour contrôler le comportement alimentaire : il s'agit de la **théorie glucostatique**. La diminution de la glycémie avant les repas est ressentie par des neurones dits « glucosensibles » qui associent cela à la sensation de faim, stimulent la prise alimentaire et les réponses de la contre-régulation de l'hypoglycémie. A l'inverse, l'infusion de glucose dans l'hypothalamus ventromédian diminue la prise alimentaire (Panksepp and Rossi, 1981). Ce n'est que dans les années 1960 que ces neurones, capables de moduler leur activité électrique en fonction de la glycémie, sont étudiés par électrophysiologie au niveau de l'hypothalamus (Anand, 1964 ; Oomura, 1969). Deux types de neurones glucosensibles sont décrits dans le SNC selon leur capacité à induire une réponse à l'hypoglycémie ou à l'hyperglycémie (dans une gamme de 0 à 5 mM). Les neurones excités par le glucose (GE) augmentent leur activité lors d'une augmentation du glucose extracellulaire ; tandis que les neurones inhibés par le glucose (GI) augmentent leur activité lors d'une diminution du glucose extracellulaire. Ces neurones sont présents au niveau de l'hypothalamus mais aussi au niveau du tronc cérébral (area postrema, NTS, noyau moteur dorsal du nerf vague). Au niveau hypothalamique, les neurones sensibles au glucose sont présents dans le VMH, le NA, l'AHL et le PVH (Jordan et al., 2010). Au niveau du NA, l'augmentation des niveaux de glucose extracellulaire inhibe les neurones AgRP/NPY, qui correspondent donc à des neurones GI, et stimule les neurones à POMC, qui correspondent alors à des neurones GE (Parton et al., 2007; Pénicaud et al., 2002). De plus, certains neurones GE et GI du NA ne répondent qu'à de hautes concentrations en glucose (dans une gamme de 5-20 mM) : ces neurones sont alors différenciés de GE et GI classiques et sont appelés HGE et HGI (Pénicaud et al., 2006).

Si de nombreuses études montrent que certains neurones détectent les variations de glycémie, les mécanismes permettant la détection du glucose restent toutefois peu clairs. Pour les **neurones GE**, l'augmentation d'activité suite à une augmentation de la glycémie serait similaire à ce qui est observé dans les cellules pancréatiques β (Yang et al., 1999). Le glucose est transporté dans la cellule par le transporteur GLUT2, puis phosphorylé par la glucokinase et métabolisé pour augmenter les niveaux d'ATP : cela induit la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants et dépolarise la cellule. Plusieurs études ont montré que les neurones GE possèdent toute la machinerie nécessaire pour engendrer ce type de réponse et que des souris KO pour l'un de ces composants présentent une détection glucidique altérée. Cependant, certaines études suggèrent aussi que la détection du glucose pourrait être indépendante de cette machinerie et se faire par exemple via la régulation des canaux TRP (de l'anglais *transient receptor potentiel*) par le glucose (Fioramonti et al., 2004, Penicaud et al., 2006) ou via les récepteurs couplés aux protéines G T1R2/T1R3 (Ren et al., 2009). Pour les **neurones GI**, le mécanisme est moins connu. Lors d'une hypoglycémie, une augmentation du ratio AMP/ATP induirait une diminution de l'activité de la Na^+/K^+ ATPase (Oomura et al., 1974; Silver and Erecińska, 1998), et la fermeture des canaux Cl^- (Song and Routh, 2005), engendrant une dépolarisation cellulaire. L'AMPK et la NOS sembleraient jouer des rôles prépondérants dans cette détection de l'hypoglycémie (Fioramonti et al., 2011; Jordan et al., 2010; Murphy et al., 2009a). Enfin, au niveau des neurones à orexine de l'AHL, des études ont montré que ces neurones GI répondaient au glucose via un mécanisme indépendant du métabolisme glucidique impliquant certainement les co-transporteurs glucose- Na^+ (González et al., 2009b) ou les canaux « tandem-pore K^+ » (Burdakov et al., 2006).

Finalement, les neurones glucosensibles ne détecteraient pas le glucose de manière isolée : les astrocytes les entourant joueraient aussi un rôle dans ce phénomène. En effet, l'injection iv de glucose induit une activation c-Fos dans les astrocytes du NA (Guillod-Maximin et al., 2004), suggérant que les astrocytes sont également capables de détecter le glucose. Par ailleurs, Marty *et coll.* ont montré que la réexpression de GLUT2 dans les astrocytes de souris KO pour *glut2* était suffisante pour restaurer la sensibilité au glucose (2005). Ce phénomène ferait intervenir la production de lactate par les astrocytes : en effet, l'inhibition hypothalamique de la production de lactate inhibe la réponse des neurones sensibles au glucose (Lam et al., 2005). Les astrocytes entourant les capillaires cérébraux, capturent le glucose, le stockent sous forme de glycogène puis le libèrent sous forme de lactate pour les neurones. Le métabolisme du lactate par les neurones participerait ainsi à l'activation des neurones glucosensibles (Ainscow et al., 2002; Lam et al., 2005; Song and Routh, 2005).

B) Acides gras libres

Les lipides, synthétisés au niveau cérébral ou venant de la circulation sanguine, sont utilisés par les neurones non pas comme source d'énergie, à l'instar du glucose, mais plutôt comme matériau. Cependant, certains neurones utilisent les acides gras libres (AGL) en tant que messagers indiquant l'état énergétique de l'organisme et régulant donc la prise alimentaire (Jordan et al., 2010). En effet, l'injection d'une émulsion de lipides par voie intraveineuse est suffisante pour inhiber la prise alimentaire chez le babouin, indépendamment des niveaux d'insuline ou de l'absorption intestinale (Woods et al., 1984).

Au niveau central, Oomura *et coll.* ont montré en 1975 que des neurones sensibles aux AGL étaient présents dans l'AHN (1975). Par la suite, ces neurones sensibles aux AGL ont également été localisés dans le NA, le VMH, le DMH et le PVH. Au niveau du NA, l'injection icv de longues chaînes d'AGL inhibe la prise alimentaire en diminuant l'expression d'AgRP et de NPY (Obici et al., 2002).

Les mécanismes permettant la détection des AGL restent cependant loin d'être élucidés. De manière générale, les AGL semblent moduler la conductance de certains canaux ioniques incluant, comme pour le glucose, les canaux Cl^- et K_{ATP} , mais également les canaux calciques (Migrenne et al., 2007). Les AGL inhibent également la pompe Na^+/K^+ ATPase (Oishi et al., 1990). Ces modulations d'activité des canaux ioniques modifient les potentiels de membrane cellulaire et engendrent ainsi des signaux électriques. Deux hypothèses sont émises quant à l'origine de ces modulations : une 1^{ère} passant par la dégradation des AGL par la β -oxydation et l'accumulation du malonyl-CoA dans le cytoplasme des neurones, et une 2^{nde} passant par un mécanisme indépendant de la métabolisation des AGL (Migrenne et al., 2007).

C) Les acides aminés

Bien que très peu d'études décrivent un rôle des acides aminés (AA) dans le contrôle de la prise alimentaire, quelques données ressortent tout de même de la littérature. Les AA sont indispensables à la synthèse de protéines, en tant que substrats énergétiques ou en tant que précurseurs de nombreux composants (sérotonine, monoxyde d'azote, catécholamines, histamine). Ainsi le tryptophane, précurseur de la sérotonine, neurotransmetteur connu pour inhiber la prise alimentaire, serait impliqué dans le contrôle de la balance énergétique (Moon et al., 2010). Les AA ont également un haut pouvoir satietogène. Des régimes pauvres en AA augmentent la prise alimentaire chez le rat, tandis que des suppléments en AA la réduisent (Tome, 2004). Au niveau central, l'injection icv d'AA diminue la prise alimentaire (Cota et al., 2006; Morrison et al., 2007). Au niveau du NA, une administration de leucine diminue la prise alimentaire via l'activation de la voie de signalisation mTor dans les neurones

à NPY et à POMC (Cota et al., 2006) et la diminution de l'expression d'AgRP (Morrison et al., 2007).

1.2.3 Modulation de la détection des signaux métaboliques

Parmi les signaux métaboliques décrits précédemment, il est encore difficile aujourd'hui de discerner les effecteurs primaires des effecteurs secondaires. En effet, les nutriments et les hormones interagissent les uns avec les autres, constituant alors un réseau de régulation très complexe. Les nutriments et les hormones peuvent **1-** modifier la concentration sanguine d'autres hormones ou d'autres nutriments, et **2-** agir sur les mêmes populations neuronales et/ou via les mêmes voies de signalisation. Ainsi, l'action d'un signal métabolique au niveau central peut être modulée par la perception d'un autre signal métabolique (Jordan et al., 2010).

Un premier type d'interaction est l'interaction nutriment-nutriment. Tout d'abord, l'action d'un nutriment au niveau hypothalamique peut modifier l'état des stocks énergétiques et par conséquent les niveaux périphériques d'autres nutriments. Par exemple, la détection des AGL au niveau hypothalamique inhibe la production hépatique de glucose et la sécrétion d'insuline (Obici et al., 2002). De plus, les nutriments agissent sur les mêmes populations neuronales via une modulation du ratio AMP/ATP : ainsi, l'action d'un nutriment pourra moduler la détection d'un autre nutriment. Par exemple, au niveau du NA, des neurones modifient leur activité électrique en réponse aux AGL en fonction des concentrations en glucose (Wang et al., 2006).

Un deuxième type d'interaction est l'interaction nutriment-hormone. Deux phénomènes peuvent intervenir : les modulations des concentrations périphériques en nutriments par les hormones, et l'action des hormones sur les mêmes populations neuronales que les nutriments. Premièrement, les hormones n'ont pas qu'une action centrale : en effet, elles agissent aussi en périphérie où elles influencent des niveaux en nutriments en les stockant ou en libérant des réserves énergétiques (tissu adipeux, foie). Ainsi, de manière indirecte, les hormones modulent la détection centrale de l'état énergétique de l'individu. Par exemple, l'insuline induit une hypoglycémie en agissant sur ses sites périphériques : cette hypoglycémie pourra être détectée par les neurones glucosensibles du SNC et déclencher une prise alimentaire. De la même manière, le FGF21 améliore la production de corps cétoniques et l'oxydation des AGL, notamment en réponse au jeûne. Deuxièmement, les hormones périphériques agissent sur les mêmes populations neuronales que les nutriments, et cette convergence peut entraîner des modifications de la perception des signaux métaboliques. Par exemple, l'insuline active la voie PI3K-Akt au niveau central, régule donc l'activité du canal K_{ATP}

via le PIP3 et peut par conséquent perturber la détection du glucose. En effet, l'insuline atténue la capacité des neurones GE du VMH à sentir les diminutions de glucose (Cotero and Routh, 2009). De plus, la leptine et l'insuline modulent, via leurs voies de signalisation, l'activité de l'AMPK : or l'activité de cette enzyme est également modulée par le ratio AMP/ATP et par conséquent par les nutriments.

Un dernier type d'interaction est l'interaction hormone-hormone. Ces interactions résultent principalement du fait que les hormones agissent sur les mêmes populations neuronales et via les mêmes voies de signalisation. Par exemple, la leptine et l'insuline partagent les voies JAK/STAT, PI3K/Akt et AMPK. Par ailleurs, la leptine agit sur les mêmes neurones que la ghréline (Traebert et al., 2002) et est capable d'inhiber son action (Kohno et al., 2008).

Le maintien de l'homéostasie énergétique est assuré par l'intégration des signaux métaboliques au niveau du SNC, notamment au niveau du NA, qui a la particularité de posséder les récepteurs de la majorité des signaux métaboliques. Au cours du temps, les niveaux sanguins de ces signaux varient sans cesse afin de refléter au mieux l'état énergétique de l'individu et permettre au SNC de rééquilibrer la balance énergétique.

1.3 Les déséquilibres de la balance énergétique

L'homéostasie énergétique n'est pas statique : il s'agit en réalité d'une succession de déséquilibres énergétiques rétablis en permanence vers un état d'équilibre. Concernant le comportement alimentaire, cet équilibre se matérialise grâce à la succession de phases de jeûne et de phases de prise alimentaire.

1.3.1 Le jeûne

Au cours de leur vie, les individus sont sujets à des périodes de jeûne ou d'aphagie, pouvant être physiologiques (entre les repas) ou contraints (indisponibilité de nourriture). Ces périodes de jeûne vont engendrer un déséquilibre de la balance énergétique qui sera rétabli par l'induction d'un comportement alimentaire par le SNC.

Les signaux périphériques décrits dans le paragraphe précédent vont informer le SNC de ce statut énergétique (Figure 2). Ainsi, lors d'un jeûne aigu ou intermittent, les niveaux de leptine, d'insuline et de glucose diminuent. A l'inverse, la ghréline et les AGL augmentent (Becksei et al., 2010; Bi et al., 2003; Johansson et al., 2008; Savontaus et al., 2002). Le jeûne est aussi associé à une augmentation des niveaux de corticostérone (Johansson et al., 2008). Ces

modifications s'accompagnent d'une perte de poids et de la fonte des tissus adipeux (Becskei et al., 2010; Bi et al., 2003).

Le jeûne modifie également l'expression des récepteurs aux signaux périphériques au niveau central afin de moduler leur action. Ainsi, le jeûne induit une augmentation de l'expression du récepteur à la ghréline dans le NA (Kim et al., 2003; Nogueiras et al., 2004). Quant au récepteur à la leptine, les études sont plus contradictoires : certaines recensent une augmentation d'expression (Adam et al., 2002; Lin and Huang, 1997; Mitchell et al., 2009) ; d'autres non (Bi et al., 2003; Tinoco et al., 2012).

Les variations des niveaux d'hormones et de nutriments, et les modifications d'expression de leur récepteur dans l'hypothalamus, notamment dans le NA, vont engendrer des modifications d'activité neuronale dans ce dernier. En effet, une activation neuronale, observée grâce au marqueur d'activation c-Fos, se produit dans le NA suite au jeûne (Becskei et al., 2008a, 2009a) et peut être inhibée par l'injection de signaux anorexigènes tels que le peptide YY (Riediger et al., 2004) ou le glucose (Becskei et al., 2008b). En particulier, l'augmentation de la ghréline lors du jeûne active les neurones du NA. Cependant, un bloqueur de la ghréline n'inhibe pas totalement l'activation c-Fos induite par le jeûne, suggérant l'intervention d'autres hormones ou nutriments (Becskei et al., 2008a). En effet, la diminution du glucose est aussi ressentie par les neurones GI et participe à l'activation du NA (Hahn et al., 1998; Murphy et al., 2009b). Les populations neuronales du NA touchées par le jeûne sont majoritairement les neurones à NPY/AgRP (Becskei et al., 2008b) et les neurones à POMC/CART (Liu et al., 2012b). Plus précisément, le jeûne et/ou la diminution des niveaux de glucose active les neurones à NPY/AgRP et augmente l'expression de leurs neuropeptides (Bi et al., 2003)(Figure 2). A l'inverse, il inhibe l'activité des neurones à POMC/AgRP et diminue l'expression de POMC (Savontaus et al., 2002). En complément à l'augmentation d'expression de NPY, la diminution du glucose lors du jeûne stimule également sa neurosécrétion (Murphy et al., 2009b). Enfin, le jeûne induit également une plasticité synaptique afin d'augmenter l'activation des neurones à NPY/AgRP et diminuer celle des neurones à POMC (Zeltser et al., 2012).

L'activation du NA a pour but final d'induire un comportement hyperphagique afin de rétablir la balance énergétique. Bloquer cette activation par le peptide YY (Riediger et al., 2004), ou en détruisant la ghréline (Mayorov et al., 2008) par exemple, empêche ce comportement hyperphagique.

1.3.2 La prise alimentaire : une dérive vers l'obésité

La réalimentation suite au jeûne conduit au rétablissement des niveaux d'hormones, de nutriments et de graisses dans l'organisme. L'augmentation des signaux anorexigènes induite par cette réalimentation va donc engendrer l'inhibition des neurones à NPY du NA : en effet, renourrir un animal avec des régimes contenant des carbohydrates, des protéines ou des graisses stoppent l'activation de ces neurones, tandis qu'une alimentation non calorique n'a aucun effet (Becskei et al., 2009b). En parallèle, ces signaux anorexigènes vont engendrer une activation des neurones à POMC/CART du NA, pour induire par la suite l'arrêt de la prise alimentaire. Ainsi, la **leptine** bloque la dépolarisation des neurones à NPY en réponse à l'hypoglycémie sur des explants hypothalamiques (Murphy et al., 2009b). De plus, l'injection icv de leptine diminue l'expression de NPY/ AgRP et du récepteur à la ghréline (Nogueiras et al., 2004), et augmente celle de POMC/CART (Fekete et al., 2005). En parallèle, la leptine inhibe également l'action de la ghréline sur les neurones à NPY du NA (Kohno et al., 2008). D'autres signaux anorexigènes agissent sur le NA : l'**insuline** augmente l'expression de POMC et réduit celle de NPY, tandis que le **glucose** réduit l'expression de NPY (Fekete et al., 2012). Cependant, Becksei *et coll.* ont aussi montré que des injections d'hormones anorexigènes en sous cutanée comme la leptine, l'amyline, la CCK, l'insuline ne suffisent pas à stopper l'activation du NA engendrée par le jeûne, suggérant l'implication, en parallèle, des signaux dépendants de l'ingestion (via les influx du nerf vague par exemple) pour inhiber les neurones du NA durant la réalimentation.

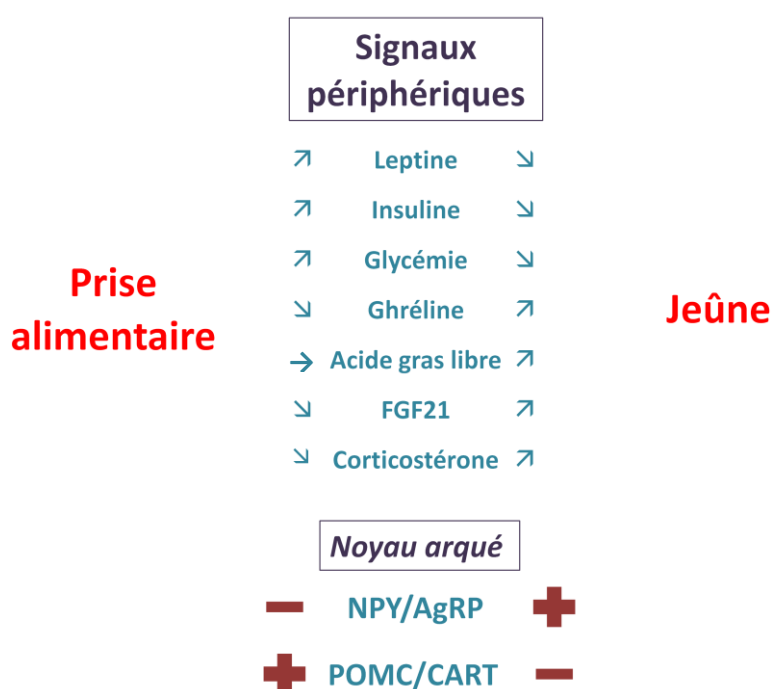


Figure 2 : Variations des signaux métaboliques périphériques lors de déséquilibres énergétiques et effet sur les neurones du noyau arqué. Lors d'une mise à jeun ou d'une prise alimentaire, les taux d'hormones et de nutriments varient en périphérie, afin de refléter au mieux l'état énergétique de l'organisme. Ces variations sont principalement détectées par les neurones orexigènes à NPY/AgRP et anorexigènes à POMC/CART au niveau du noyau arqué hypothalamique, afin de réguler la prise alimentaire.

Cet équilibre énergétique est cependant fragile et peut facilement dériver. En effet, un déséquilibre de la balance énergétique peut se produire en cas d'excès de prise alimentaire ou d'insuffisance de dépenses énergétiques et entraîner le développement d'une obésité. Selon l'organisation mondiale de la santé, l'obésité est définie comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse qui présente un risque pour la santé ». Dans notre société occidentale, de plus en plus d'obèses sont recensés chaque année. Bien que des causes génétiques responsables de l'obésité existent (Farooqi and O'Rahilly, 2005), il est admis que l'hyperphagie et le manque de dépenses énergétiques sont les principales causes de cette « pandémie ». Ces personnes obèses présentent une incapacité à réguler leur balance énergétique. En effet, bien que les niveaux de leptine soient élevés du fait de l'augmentation du tissu adipeux, la leptine endogène ou même des injections de leptine exogène ne parviennent pas à engendrer une diminution de la prise alimentaire et une augmentation des dépenses énergétiques : les individus obèses ont développé une « résistance » à la leptine. Ce phénomène, qui se produit également pour d'autres hormones comme la ghréline (Briggs et al., 2010), auraient pour origine l'inaptitude des hormones périphériques à agir sur les neurones du NA, résultant dans un premier temps d'un problème de transport des hormones périphériques vers ce noyau hypothalamique puis d'un problème central lié à une perturbation des voies de signalisation des hormones en question (Lin et al., 2000b).

Afin d'informer le SNC de l'état physiologique de l'individu et des déséquilibres énergétiques qu'il rencontre, les signaux périphériques doivent atteindre les noyaux hypothalamiques, notamment le NA qui joue un rôle clé dans le contrôle de la prise alimentaire. Cet accès des molécules périphériques vers le SNC est une étape primordiale dans la régulation de l'équilibre énergétique étant donné que, dans les cas d'obésité, certains signaux ne semblent plus atteindre leur but. Afin de mieux comprendre comment les molécules périphériques atteignent le SNC, le prochain chapitre sera consacré à la description des interfaces sang/cerveau.

Chapitre 2. Les interfaces sang-cerveau

Les signaux périphériques régulant la prise alimentaire doivent être intégrés au niveau central afin d'assurer le contrôle de la balance énergétique. Cette intégration va nécessiter un accès des molécules métaboliques périphériques vers le SNC. Cet accès se réalise au niveau de trois interfaces sang-cerveau : la barrière hémato-encéphalique (BHE), les plexus choroïdes (PC) et les organes circumventriculaires (OCVs). Ces interfaces sang/cerveau sont le siège de barrières physiques et métaboliques qui maintiennent une composition stable du liquide céphalorachidien (LCR) et du liquide interstitiel afin d'éviter tout problème de fonctionnement neuronal. Des systèmes de transports spécifiques existent donc au niveau de ces barrières sang/cerveau afin d'assurer l'accès sélectif des molécules périphériques vers le SNC. Ce deuxième chapitre sera consacré à l'étude des barrières sang-cerveau et des moyens d'accès des signaux métaboliques vers le SNC, pour finalement s'intéresser à leur plasticité structurale et fonctionnelle notamment au cours des déséquilibres énergétiques.

2.1 Organisation neuroanatomique des barrières sang/cerveau

2.1.1 La barrière hémato-encéphalique

A) Présentation

Le concept de barrière entre le sang et le cerveau est apparu pour la première fois à la fin du 19^{ème} siècle. Les études de Lewandowski, en 1890, ont montré que des agents toxiques n'étaient délétères que s'ils étaient injectés directement dans le cerveau : il en a conclu à l'existence d'une « barrière hémato-encéphalique » protégeant le cerveau des agents toxiques périphériques. A la même période, en 1885, les études de Paul Ehrlich ont montré que le bleu Trypan, injecté en périphérie, colorait les tissus de l'organisme excepté le tissu nerveux : il en avait conclu, à tort, que les colorants ont des affinités différentes en fonction des tissus avec lesquels ils sont mis en présence. Quelques années plus tard, ces premiers résultats ont été approfondis par son élève, Ernst Goldmann (1913). Celui-ci a observé que le même colorant injecté cette fois dans le LCR colorait le tissu cérébral. Il en a donc conclu qu'il n'existait pas de différences d'affinité au colorant du tissu nerveux mais plutôt la présence d'une barrière séparant la périphérie du SNC. Par la suite, de nombreuses études ont montré que les colorants injectés en périphérie étaient stoppés au niveau des vaisseaux cérébraux, mais la preuve définitive de l'existence d'une barrière n'a été donnée qu'en 1967 par des études en microscopie électronique en transmission (Reese and Karnovsky, 1967), dans lesquelles des complexes de jonctions serrées (JS) ont été observés au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Ainsi, la BHE consiste en une couche continue de cellules endothéliales

très spécialisées qui permettent le maintien de l'homéostasie dans l'ensemble du parenchyme cérébral.

B) Anatomie

Les cellules endothéliales formant la paroi vasculaire cérébrale sont le siège de la BHE. Cependant, de nombreuses études ont montré que d'autres types cellulaires entourant les cellules endothéliales jouent un rôle crucial dans l'établissement des propriétés de barrière et la fonctionnalité de la BHE. La BHE est désormais décrite comme une unité neuro-glio-vasculaire constituée de cellules endothéliales entourées par une épaisse lame basale, de péricytes et d'astrocytes.

Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales constituant la BHE diffèrent des cellules endothéliales présentes en périphérie et possèdent des caractéristiques structurales et fonctionnelles qui leur sont propres. La caractéristique principale de ces cellules est la présence de complexes de JS reliant deux cellules adjacentes entre elles, empêchant la diffusion de molécules par la voie paracellulaire (Brightman and Reese, 1969) et conférant ainsi une haute résistance électrique (TEER) à l'endothélium (Crone and Olesen, 1982). La haute efficacité de la BHE vient du fait que ses complexes de JS sont associés au feuillet protoplasmique P de la membrane plasmique (Simionescu et al., 1988; Wolburg et al., 1994) et forment une ceinture continue autour des cellules endothéliales. On parle alors d'«endothélium continu» (Brightman and Reese, 1969). Les JS sont associées à des jonctions adhérentes composées de cadhérine et de caténine, dont le rôle dans la maturation de la BHE a été suggéré (Liebner et al., 2008). Afin de compléter cette barrière de diffusion paracellulaire, les cellules endothéliales ne possèdent pas de fenestrations ou perforations (Bennett et al., 1959), et ont peu de vésicules de pinocytose (Clawson et al., 1966), empêchant ainsi le passage transcellulaire non spécifique. Les JS permettent également la polarisation de la cellule endothéliale et, ainsi, la mise en place de transports transcellulaires spécifiques. Par ailleurs, les cellules endothéliales possèdent de nombreuses mitochondries (Coomber and Stewart, 1985), reflet d'un métabolisme énergétique intense et nécessaire à ce type de transport. De nombreux systèmes de transports spécifiques ont été décrits au niveau des cellules endothéliales de la BHE comme le transporteur du glucose GLUT1 (Pardridge et al., 1990), des systèmes de transport des AA (Killian and Chikhale, 2001), des systèmes de transport des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Dehouck et al., 1997), le transporteur de la transferrine (Pardridge et al., 1987) ou encore des récepteurs aux hormones périphériques comme l'insuline, la ghréline ou la leptine (Banks et

al., 1996, 1997a, 2002). Les transports réservés aux signaux métaboliques régulant la prise alimentaire seront décrits dans le paragraphe 2.3.

La lame basale

Les cellules endothéliales de la BHE ont la particularité d'être entourées d'une lame basale continue très épaisse, d'environ 40 à 80 nm d'épaisseur, produite à la fois par les cellules endothéliales et les péricytes les entourant (Mandarino et al., 1993). Elle est composée essentiellement de protéines de structure (collagène de type IV, élastine), de protéines spécialisées (laminine et fibronectine) et de protéoglycanes (Wolburg et al., 2009; Del Zoppo et al., 2006). De nombreuses études ont montré l'importance de la lame basale dans l'établissement et le maintien des propriétés de barrière de la BHE. En effet, d'après une étude réalisée *in vitro*, le collagène de type IV, la laminine et la fibronectine ont la capacité d'influencer la différenciation des cellules endothéliales de la BHE notamment la formation de JS (Tilling et al., 1998). De plus, une destruction de la membrane basale par les métalloprotéinases (MMP) supprime les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules endothéliales et perturbe l'intégrité des JS (Beauchesne et al., 2009a).

Les péricytes

Les péricytes, découverts en 1973 par Rouget, sont inclus dans la lame basale entourant les cellules endothéliales. En moyenne, on dénombre un péricyte pour deux ou trois cellules endothéliales : ils semblent donc jouer un rôle majeur au sein de la BHE bien que leurs fonctions et leurs mécanismes d'action restent assez vagues. Tout d'abord, les péricytes jouent un rôle dans la vasoconstriction des vaisseaux cérébraux grâce à leur riche cytosquelette d'actine et modulent ainsi le diamètre du capillaire sanguin en fonction des besoins (Peppiatt et al., 2006). Les péricytes jouent également un rôle dans l'établissement des propriétés de barrière. En effet, des études *in vitro* ont montré que l'addition de péricytes à une culture de cellules endothéliales induisait des propriétés de barrière comme l'augmentation de la TEER ou la diminution de la perméabilité à l'albumine (Dente et al., 2001). Ces phénomènes se produiraient via des intercommunications entre les péricytes et les cellules endothéliales par l'intermédiaire de facteurs solubles tels que l'angiopoïétine 1 (Uemura et al., 2002), le facteur de croissance de transformation (TGF) β (Antonelli-Orlidge et al., 1989), ou le facteur de croissance dérivé des plaquettes β (PDGF β) nécessaires au recrutement des péricytes (Hellström et al., 1999; Lindahl et al., 1997). Ces facteurs jouent aussi un rôle important dans les phénomènes d'angiogenèse, de néovascularisation (Dore-Duffy et al., 2000; Gonul et al., 2002) et dans la différenciation des cellules endothéliales de la BHE.

Les astrocytes

Les astrocytes, ou plus précisément les pieds astrocytaires, viennent au contact des cellules endothéliales et des péricytes afin de recouvrir environ 99% de la surface des capillaires cérébraux (Kacem et al., 1998). Les premières recherches sur la structure de la BHE avaient alors suggéré que les astrocytes, de par leur localisation, constituaient la barrière sang/cerveau (Van Breemen and Clemente, 1955; Dempsey and Wisloski, 1955). Plus tard, les études ont montré que les astrocytes induisaient les propriétés de barrière qui étaient en fait portées par les cellules endothéliales. En effet, les astrocytes sont capables d'induire des propriétés de barrière au niveau des cellules endothéliales non cérébrales *in vivo* (Janzer and Raff, 1987). De plus, des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence que l'apparition de propriétés de barrière sur des cellules endothéliales isolées en culture était favorisée par l'addition d'astrocytes (Dehouck et al., 1990; Neuhaus et al., 1991). Ce phénomène est aussi observable suite à l'ajout de milieu conditionné astrocytaire dans des cultures de cellules endothéliales isolées (Gardner, 1995; Wolburg et al., 1994), suggérant l'implication de facteurs solubles comme le TGF β (Tran et al., 1999), le facteur neurotrophe dérivé de la glie (GDNF) (Igarashi et al., 1999) ou le FGF (Sobue et al., 1999). Enfin, les astrocytes constituent un lien entre le compartiment sanguin et les neurones, et assurent ainsi leur bon fonctionnement, notamment concernant l'apport nutritionnel : en effet, les astrocytes sont capables d'internaliser le glucose pour le stocker sous forme de glycogène et le redistribuer aux neurones par la suite sous forme de lactate (Chih and Roberts Jr, 2003; Wiesinger et al., 1997)

Entre les astrocytes, les péricytes et les cellules endothéliales, des cellules immunitaires, comme des macrophages périvasculaires, peuvent aussi être observés. Cependant, leur rôle dans la fonctionnalité de la BHE n'a pas encore été démontré à ce jour.

C) Fonctions

La BHE permet d'assurer le maintien de l'homéostasie cérébrale nécessaire au bon fonctionnement neuronal, via le contrôle de l'entrée des molécules périphériques vers le SNC et l'évacuation des déchets cérébraux vers la périphérie. Cette fonction est assurée par plusieurs composantes : une barrière physique, grâce aux JS, qui réduit la voie paracellulaire, une « barrière de transport » qui sélectionne les molécules pouvant transiter par la voie intracellulaire, et une barrière chimique ou métabolique grâce aux enzymes et aux transporteurs d'efflux qui dégradent ou excluent les molécules nuisibles au SNC (Abbott et al., 2010). Ainsi, par exemple, la BHE permet de maintenir un environnement ionique et un pH optimal pour le fonctionnement synaptique grâce à une combinaison de canaux ioniques et de transporteurs régulant l'entrée et la sortie des ions du SNC. Dans le même objectif, la BHE

empêche également l'entrée de neurotransmetteurs périphériques, comme le glutamate : ce neuroexcitateur présent dans le sang fluctue notamment avec l'ingestion de nourriture, et pourrait induire de graves dommages neuronaux s'il entrait dans le cerveau (Abbott et al., 2010). Un autre exemple de fonction de la BHE est la protection du cerveau contre des substances neurotoxiques circulant dans le sang. La BHE barre l'accès aux macromolécules et aux agents neurotoxiques hydrophiles qui pourraient entraîner de graves lésions neuronales. Cependant, certains agents neurotoxiques ou pharmacologiques sont liposolubles et peuvent facilement traverser les membranes lipidiques. Dans ce cas, de nombreux transporteurs ABC ou « pompes d'efflux » sont présents au niveau de la BHE et pompent ces agents neurotoxiques en dehors du cerveau en consommant de l'ATP. Trois des plus importantes pompes sont la glycoprotéine P (Pgp), la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP) et les protéines associées à la multirésistance aux médicaments (MRP).

2.1.2 Les plexus choroïdes

A) Présentation

Les plexus choroïdes (PC) sont des petites structures cérébrales faisant protrusion dans le système ventriculaire et contribuant à la formation du LCR. Au nombre de 4, ils sont présents dans les ventricules latéraux, le 3^{ème} et le 4^{ème} ventricule (Figure 3). Ces PC constituent une seconde interface sang/cerveau, différente cependant de la BHE. En effet, les vaisseaux des PC sont fenêtrés et ne sélectionnent donc pas l'entrée des molécules sanguines : la composition du liquide interstitiel des PC est donc comparable à celle du sang. Cependant, l'épithélium cubique simple entourant les vaisseaux fenêtrés présente des propriétés de barrière afin d'assurer l'homéostasie du LCR.

B) Anatomie

Le noyau fibro-vasculaire

En continuité des membranes leptoméningées externes, ce noyau contient de nombreux vaisseaux fenêtrés (capillaires et veines sinusoïdales) entourés d'un réseau lâche de fibres de collagène produites par des fibroblastes (Strazielle and Gherzi-Egea, 2000). Contrairement aux vaisseaux de la BHE, les vaisseaux des PC sont très larges, sinueux, possèdent des fenestrations et n'auraient pas de JS fonctionnelles. Ils expriment notamment MECA-32 chez la souris (Ciofi, 2011a; Mullier et al., 2010) et la protéine associée aux vésicules du plasmalemme PV-1 chez le rat (Carson-Walter et al., 2005), marqueurs de fenestrations. Cela leur confère une haute perméabilité aux molécules hydrophiles qui peuvent alors entrer dans le liquide interstitiel des PC. D'autres types cellulaires sont associés à ce noyau fibro-vasculaire comme les macrophages globulaires (Ling et al., 1998).

Les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales des PC sont situées en continuité des cellules épendymaires bordant le ventricule. Cependant, elles forment un épithélium cubique simple reposant sur une épaisse lame basale et juxtaposant le noyau fibro-vasculaire (Redzic and Segal, 2004). Leur caractéristique principale est la présence d'une ceinture continue de JS au niveau de leur pôle apical : celles-ci sont à la base de la barrière sang-LCR (Brightman and Reese, 1969). Elles permettent également la polarisation de la cellule, nécessaire à la mise en place de transports transcellulaires spécifiques. En effet, les cellules épithéliales des PC possèdent plusieurs caractéristiques typiques des épithéliums ayant des propriétés de sécrétion et/ou d'absorption, telles que de nombreuses vésicules et mitochondries (Redzic and Segal, 2004) ou de longues villosités en leur pôle apical augmentant la surface d'échange avec le LCR (Segal, 2001; Wolburg and Paulus, 2010). Certaines cellules épithéliales possèdent également quelques cils pouvant aider le flux du LCR dans le système ventriculaire (Peters and Swan, 1979). Par ailleurs, les faces basolatérales de deux cellules adjacentes sont imbriquées par de nombreuses interdigitations (Keep and Jones, 1990).

C) Fonctions

La fonction principale des PC, mise en évidence en 1970 par des études de Davson et Segal, est la formation du LCR. La pompe Na^+/K^+ ATPase joue un rôle primordial dans cette fonction. En effet, elle permet de maintenir des gradients osmotiques et ioniques nécessaires au mouvement de l'eau vers le ventricule (Davson and Segal, 1970). Ce même mécanisme a été observé à la membrane abluminale de l'endothélium de la BHE afin d'assurer la synthèse du liquide interstitiel au niveau du parenchyme cérébral (Abbott et al., 2010). La plus grande partie du LCR est formée au niveau des PC des ventricules latéraux. Le LCR entre ensuite dans le 3^{ème} ventricule par le trou de Monroe pour atteindre le 4^{ème} ventricule via l'aqueduc de Sylvius. Le LCR passe ensuite dans l'espace sous-arachnoïdien par les foramen de Luschka et Magendie, puis retourne dans le sang veineux par les villosités arachnoïdiennes (Figure 3). Le LCR apporte une protection mécanique au cerveau. Ce dernier y « flotte » ce qui le protège des chocs et diminue son poids « apparent ».

Outre la synthèse du LCR, les plexus choroïdes synthétisent et sécrètent également de nombreuses molécules bioactives (facteur de croissance, facteur trophique ...) qui seront distribuées dans l'ensemble du SNC. Ces substances jouent un rôle actif dans le développement du SNC et le maintien de l'homéostasie cérébrale (voir pour revue Redzic et al., 2005).

Tout comme la BHE, les PC jouent un rôle de barrière. Ils permettent le maintien de l'homéostasie ionique et du pH du LCR (Johanson et al., 2011), et empêchent le passage de macromolécules ou de neurotoxines (Gherzi-Egea et al., 1994; Strazielle and Gherzi-Egea, 2000). Par exemple, les protéines de la famille des MRP sont exprimées au niveau des cellules épithéliales des PC afin de protéger le LCR des toxines périphériques (Gherzi-Egea et al., 2001).

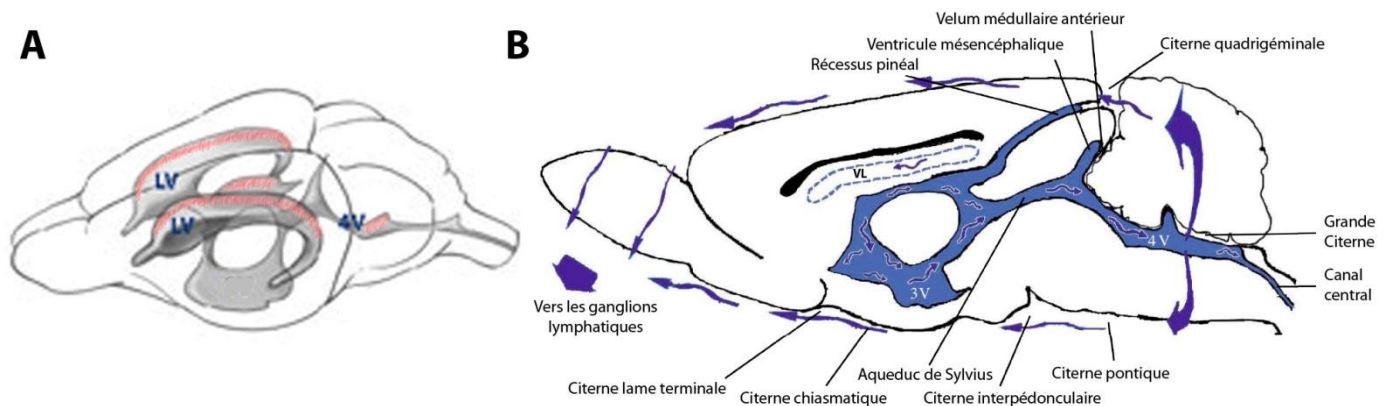


Figure 3 : Schéma représentant le système ventriculaire et la circulation du LCR chez le rongeur. Les plexus choroïdes, représentés en rouge (A, chez la souris), sont la source majeure de LCR. Ce LCR circule ensuite dans le système ventriculaire (B, chez le rat). Tiré de la thèse de Charlotte Schmitt (01/2012).

2.1.3 Les organes circumventriculaires

A) Présentation

Les organes circumventriculaires sont de petites régions cérébrales très spécialisées localisées à proximité du 3^{ème} et 4^{ème} ventricule. Leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles les impliquent dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques (Tableau 2). Dans la littérature, les avis divergent qu'en à leur nombre, allant de 6 à 8 en fonction des critères considérés. Leur principale caractéristique est l'absence de BHE au niveau de leurs vaisseaux. En effet, ces vaisseaux sont larges et possèdent de nombreuses fenestrations, ce qui favorise les échanges sang/parenchyme cérébral. Ces vaisseaux sont similaires aux vaisseaux des PC, excepté le fait qu'ils sont situés directement dans le parenchyme cérébral. Cela confère alors aux OCVs le surnom de « fenêtres du cerveau » (Gross and Weindl, 1987). Les OCVs sont souvent divisés en deux groupes selon le type de communication qu'ils entretiennent avec la périphérie :

- Les OCVs dits « **sensoriels** » comprenant l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLTL), l'organe subfornical (OSF) et l'area postrema (AP). Ces derniers possèdent dans leur parenchyme des corps cellulaires neuronaux qui sont donc en contact direct avec la circulation sanguine.

- Les OCVs dits « **sécréteurs** » comprenant la glande pinéale, la neurohypophyse et l'éminence médiane (EM). Ces derniers ont la particularité de sécréter des substances dans la circulation sanguine.

Certains auteurs incluent les PC dans les OCVs car ils possèdent une organisation et localisation comparables aux OCVs. Enfin, bien qu'il ne possède pas de vaisseaux fenêtrés, l'organe subcommissural (OSC) est souvent considéré comme un OCV sécréteur libérant des substances dans le LCR. La glande pinéale forme plutôt une glande à part entière au sein du SNC et n'est pas en contact direct avec les ventricules. Anatomiquement, nous nous intéresserons à l'OVLT, l'OSF, l'AP et l'EM qui sont des structures comparables puis à l'OSC.

B) Anatomie de l'OVLT, de l'OSF, de l'AP et de l'EM

Ces OCVs sont généralement organisés en trois couches : une couche épendymaire, une couche interne et une couche externe.

Les cellules épendymaires

Ces OCVs sont situés à proximité ou font protrusion dans le système ventriculaire. Dans ces régions hautement spécialisées, les cellules épendymaires sont particulières. En effet, ce sont des cellules bipolaires dont le corps borde la paroi du ventricule et qui émettent un unique long prolongement dans le parenchyme de l'OCV pour venir contacter les vaisseaux fenêtrés de la zone externe (Krisch et al., 1978). Dans l'éminence médiane, ces cellules sont appelées tancytes : elles seront décrites plus en détail dans le dernier chapitre de cette introduction. Des études en microscopie ont révélé la présence de JS au niveau du corps cellulaire de ces cellules épendymaires (Brightman and Reese, 1969; Petrov et al., 1994; Smith and Shine, 1992) voire entre leur prolongement adjacent (Krisch et al., 1978; Wang et al., 2008): ainsi, comme pour les PC, les propriétés de barrière semblent délocalisées au niveau de l'épendyme. A leur surface apicale, elles possèdent également de nombreuses microvillosités augmentant la surface d'échange avec le LCR, et parfois un unique cil primordial (Dellmann and Linner, 1979; Dellmann and Simpson, 1976; Mestres and Rascher, 1994; Scott and Sladek, 1981). Enfin, la présence de nombreuses mitochondries, de vésicules, d'un réticulum endoplasmique très développé et de nombreux microfilaments dans leur prolongement suggèrent que ces cellules épendymaires constitueraient un épithélium de sécrétion et/ou d'absorption (Dellmann and Simpson, 1976).

La couche interne

Cette zone, située sous l'épendyme, contient les prolongements des cellules épendymaires décrites dans la section précédente, et de très nombreuses cellules gliales telles que des

astrocytes et des oligodendrocytes. Cette zone contient également des éléments neuronaux. Dans les OCVs sensoriels (OVLT, OSF, AP), les corps cellulaires neuronaux et leurs dendrites y sont très nombreux. Dans l'EM, bien qu'il s'agisse d'un OCV sécréteur, quelques corps cellulaires de neurones peuvent être observés. Ces neurones ne sont donc pas protégés par la BHE et reçoivent de nombreuses informations venant directement de la périphérie. La couche interne est aussi occupée par de nombreux axones venant des neurones situés dans des régions protégées par la BHE. Par exemple, l'EM est traversée par des axones appartenant aux neurones magnocellulaires situés dans le noyau supraoptique et paraventriculaire, et se projetant vers la neurohypophyse pour y libérer l'ocytocine et la vasopressine.

La couche externe

La couche externe contient un réseau vasculaire très développé (Duvernoy and Risold, 2007). Ces vaisseaux ont la particularité d'être fenêtrés et expriment donc les marqueurs de fenestrations MECA-32 chez la souris (Ciofi, 2011a; Schulz and Engelhardt, 2005) et PV-1 chez le rat (Ciofi et al., 2009). Dans l'EM, ces vaisseaux sont le site de projection de neurones hypothalamiques qui y établissent, via leur axone, des jonctions neuro-vasculaires afin de déverser leurs neurohormones dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire.

C) Anatomie de l'organe subcommissural

L'OSC est souvent considéré comme une glande au sein même du cerveau. Son nom est dû à sa localisation en contact avec la commissure postérieure : il est situé caudalement au 3^{ème} ventricule, à l'entrée de l'aqueduc de Sylvius.

Cet organe circumventriculaire est constitué de cellules épendymaires très spécialisées. Comme les cellules épendymaires des OCVs décrits précédemment, elles possèdent une forme bipolaire avec un corps cellulaire et un prolongement. Leur corps cellulaire, particulièrement grand et allongé, forme la paroi du ventricule et leur prolongement s'étend dans le parenchyme cérébral pour venir contacter des vaisseaux de la BHE (Rodríguez et al., 1986). En effet, l'OSC ne possède pas de vaisseaux fenêtrés comme les autres OCVs (Duvernoy and Risold, 2007). Le pôle apical des cellules épendymaires fait protrusion dans la cavité ventriculaire et possède des kinocils, des villosités et de nombreuses vésicules de pinocytose, suggérant des échanges avec le LCR (Collins and Woollam, 1979). De plus, les pôles apicaux sont connectés les uns aux autres par des JS (Meiniel, 2007; Petrov et al., 1994). Leur cytoplasme contient un large réticulum endoplasmique, de nombreux microtubules et des vésicules de sécrétions, indiquant son rôle de glande sécrétrice (Collins and Woollam, 1979).

Les cellules épendymaires spécialisées de l'OSC sécrètent une glycoprotéine N-glycosylée, appelée la spondine, basalement vers la commissure postérieure et les espaces

leptomeningés et luminalement dans le système ventriculaire (Gobron et al., 1996). Dans le ventricule, la spondine s'agrège pour former la fibre de Reissner, qui s'étend dans l'aqueduc de Sylvius, le 4^{ème} ventricule et jusqu'à la fin du canal central de la moelle épinière (Vio et al., 2008). Cette fibre, découverte par Reissner en 1860, aide à la bonne circulation du LCR. Outre la spondine, les cellules épendymaires produiraient d'autres glycoprotéines entrant dans la composition de la fibre de Reissner. La fibre de Reissner n'existe pas chez l'Homme et les glycoprotéines resteraient à l'état soluble. Les sécrétions de l'OSC serviraient également à maintenir l'homéostasie du LCR (Meiniel, 2007).

D) Fonctions des organes circumventriculaires

La présence de vaisseaux fenêtrés dans les OCVs leur confère deux fonctions essentielles dans les communications sang/cerveau :

- La **neurosecrétion de peptides et de protéines** vers le sang.
- L'**accès de molécules plasmatiques** telles que les hormones ou les nutriments aux cellules nerveuses.

Ces propriétés les impliquent ainsi dans de nombreuses fonctions physiologiques (Tableau 2).

Nom de l'OCV	Localisation	Sensoriel ou Sécréteur	Rôle pour les réponses neuroendocriniennes	Projections
OVLT	3V, B +0,5	Les deux	Contrôle de la balance hydrique Soif	Aire préoptique, VMH, Noyau supraoptique, SFO, Locus coeruleus
SFO	3V, B -0.5	Sensoriel	Réponse à la soif Osmorégulation Contrôle cardiovasculaire Homéostasie énergétique	PVH, Noyau préoptique médial, OVLT, Noyau supraoptique, Noyau du raphé
ME	3V, B -1,5	Sécréteur	Libération de neurohormones dans le système porte vers l'adénohypophyse	-
Neurohypophyse	B -2	Sécréteur	Libération de l'ocytocine et la vasopressine produites par les neurones magnocellulaires de l'aire supraoptique et du PVH	-
SCO	3V, B -2	Sécréteur	Formation de la fibre de Reissner Homéostasie du LCR	-
Glande pinéale	Glande, B -2.5	Sécréteur	Sécrétion de mélatonine Régulation des rythmes jour/nuit	-
AP	4V, B -4.5	Sensoriel	Centre du vomissement Contrôle cardiovasculaire et respiratoire Pression sanguine Homéostasie énergétique	NTS, Noyau parabrachial, Locus coeruleus

Tableau 2 : Localisation, fonctions et projections des différents organes circumventriculaires.

2.2 Les jonctions serrées : régulateur des barrières sang/cerveau

Le point commun à ces trois interfaces est la présence de JS au niveau des cellules endothéliales, des cellules épithéliales ou des cellules épendymaires bordant les OCV (Figure 4). Ces JS sont des assemblages de protéines transmembranaires et intracellulaires formant un complexe jonctionnel entre deux cellules adjacentes et bloquant la voie paracellulaire.

2.2.1 Les protéines des jonctions serrées

L'**occludine** a été la première protéine transmembranaire observée dans les JS (Furuse et al., 1993). On la retrouve au niveau de la BHE, des PC et de l'EM (Mullier et al., 2010). D'un poids moléculaire de 65 kDa, elle possède 4 domaines transmembranaires, deux boucles extracellulaires et deux terminaisons cytosoliques. Son domaine C-terminal est hautement conservé et est important pour l'assemblage et une bonne imperméabilité de la JS (Balda et al., 1996; Kale et al., 2003). Son domaine extracellulaire assure l'adhésion intercellulaire dépendante du calcium (Van Itallie and Anderson, 1997). Cependant, des souris KO pour cette protéine sont viables et développent des JS morphologiquement et fonctionnellement normales. Cependant, elles présentent certains phénotypes pathologiques comme un retard de croissance post-natal ou un comportement sexuel anormal (Saitou et al., 2000). Les auteurs en ont conclu que l'occludine ne serait donc pas nécessaire à la formation des JS mais jouerait plutôt un rôle dans l'induction de signaux intracellulaires. Cependant, d'autres auteurs ont tout de même montré sa capacité à former des JS, bien que celles-ci ne soient pas très étanches (Furuse et al., 1996).

Les **claudines** forment une famille de protéines transmembranaires des JS d'environ 24 membres. Bien que possédant aussi 4 domaines transmembranaires, elles n'ont pas d'homologie de séquence avec l'occludine. Leur boucle extracellulaire assure une adhésion intercellulaire très forte qui est indépendante du calcium. Les claudines sont suffisantes pour former des JS (Furuse et al., 1998a; Morita et al., 1999). Contrairement à l'occludine, les claudines ne sont pas distribuées de manière égale dans chaque tissu, ce qui crée les différences d'étanchéité des différents épithéliums de l'organisme (Tsukita and Furuse, 2000a, 2000b). En effet, la combinaison spécifique de différentes claudines permet de définir les propriétés de chaque JS. Premièrement, elle détermine l'efficacité de la JS : les claudines 1 et 3 seraient responsables de l'association des JS au feuillet protoplasmique P (Furuse et al., 1998b), soit d'une haute TEER ; tandis que la claudine 2 forme des jonctions associées au feuillet endoplasmique E (Furuse et al., 1998b), soit d'une plus faible TEER. La combinaison des différentes claudines détermine également la perméabilité paracellulaire. En effet, la perméabilité aux ions ou aux molécules de différents poids moléculaires est définie par les

claudines. Par exemple, les JS deviennent permissives aux molécules de moins de 800 Da chez la souris KO pour la claudine 5 (Nitta et al., 2003), tandis que des mutations de la claudine 16 induisent des problèmes de perméabilité paracellulaire au calcium et au magnésium (Hou et al., 2005; Simon et al., 1999). Au niveau du cerveau, les claudines 3 et 5 sont présentes au niveau de la BHE (Mullier et al., 2010; Wolburg and Lippoldt, 2002) ; les claudines 1 et 5 sont exprimées au niveau de l'EM (Mullier et al., 2010) et les claudines 1, 2, 3 et 11 sont exprimées au niveau des PC (Redzic and Segal, 2004; Wolburg et al., 2001).

Les molécules d'adhésion **JAM** (JAM 1 à 4) appartiennent à la famille des immunoglobulines et sont retrouvées au niveau des JS. Elles possèdent un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire à deux motifs Ig. La neutralisation de JAM-1 perturbe les JS (Liu et al., 2000) et inhibe l'extravasation leucocytaire (Del Maschio et al., 1999). Au niveau du cerveau, JAM-1 et JAM-3 ont été observées (Aurrand-Lions et al., 2001).

Ces protéines transmembranaires sont reliées au cytosquelette par des protéines intracellulaires comme les **zonula occludens (ZO)**. ZO1, 2 et 3 appartiennent à la famille des protéines guanylate kinase associées à la membrane. ZO1 est la première protéine associée aux JS identifiée. D'un poids moléculaire de 225 kDa, elle possède un segment N-terminal riche en domaine PDZ, permettant la liaison aux protéines transmembranaires et intracellulaires des JS, et un segment C-terminal permettant la liaison aux protéines du cytosquelette : ZO1 est donc considérée comme une protéine d'échafaudage. Au niveau central, elle est exprimée au niveau de la BHE, des PC et des OCV (Mullier et al., 2010; Petrov et al., 1994). ZO1 joue un rôle important dans la formation des JS. En effet, des cellules épithéliales n'exprimant plus ZO1 présentent des problèmes de formation des JS induite par le calcium (Sheth et al., 1997). Par ailleurs, ZO1 se fixe à l'occludine et aux claudines via ses domaines PDZ et permet ainsi leur bonne localisation dans la JS (Fanning and Anderson, 2009). ZO1 interagit également avec les protéines du cytosquelette, telle que l'actine. Cette interaction est particulièrement importante étant donné que des souris KO pour la dystrophine, une protéine du cytosquelette, présentent des JS perturbées (Nico et al., 2004). Enfin, ZO1 régule également l'expression génique. En effet, elle peut être localisée au niveau nucléaire dans des cellules en prolifération (Gottardi et al., 1996), et se lier à des facteurs de transcription, tel que ZONAB, pour moduler l'expression génique (Balda et al., 2003).

Cette description des protéines de JS n'est pas exhaustive. D'autres protéines y sont aussi présentes comme la cinguline, protéine d'échafaudage reliant la JS au cytosquelette et intervenant dans la prolifération cellulaire ; la protéine 7H6, intervenant dans l'assemblage des JS ; les protéines de polarité PAR3 et PAR6 ; la protéine aux multiples domaines PDZ MUPP1 ; la

protéine AHNAK ou la protéine JACOP. De nombreuses kinases comme la protéine kinase C, les tyrosine-kinases c-SRC et c-Yes, ou les phosphatases PP1 ou PP2A sont également présentes et régulent le niveau de phosphorylation des protéines constituant la JS afin de réguler son étanchéité (voir pour revue Ebnet, 2008).

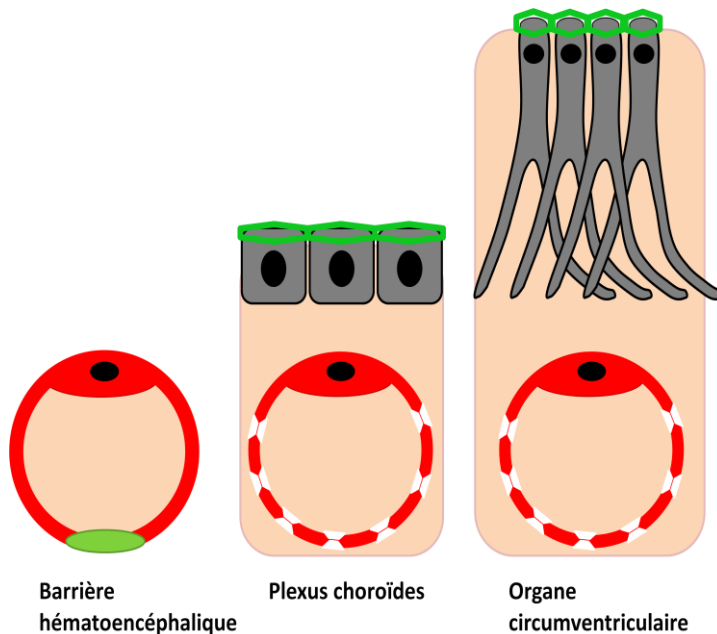


Figure 4 : Représentation schématique des différentes barrières sang/cerveau.

Trois interfaces sang/cerveau ont été décrites dans la littérature : la barrière hémato-encéphalique (BHE), les plexus choroïdes (PC), et les organes circumventriculaires (OCVs). Ces interfaces sont constituées de cellules endothéliales (pour la BHE) ou d'une association entre cellules endothéliales et cellules épithéliales ou épendymaires (respectivement pour les PC et les OCVs). Au niveau de ces interfaces, une barrière sang/cerveau, assurée notamment par des jonctions serrées (en vert), permet le maintien de l'homéostasie cérébrale. Au niveau de la BHE, les propriétés de barrière sont portées directement par les

cellules endothéliales : les molécules périphériques (fond rose) sont donc confinées dans le vaisseau et ne peuvent pas diffuser dans le parenchyme cérébral. Au niveau des PC, les vaisseaux sont fenêtrés ce qui permet aux molécules du sang (fond rose) de pénétrer dans l'espace périvasculaire. Les propriétés de barrière sont portées par les cellules épithéliales qui empêchent ainsi la diffusion des molécules vers le liquide céphalorachidien : les molécules restent donc dans l'espace périvasculaire. Au niveau des OCVs, les vaisseaux sont également fenêtrés permettant l'entrée des molécules du sang (fond rose) dans l'espace périvasculaire. Les propriétés de barrière sont reportées plus loin au niveau de l'épendyme. De ce fait, les molécules du sang peuvent diffuser dans le parenchyme de l'OCV jusqu'à la barrière épendymaire : tout élément neuronal présent dans l'OCV pourra alors recevoir des informations de la circulation sanguine.

2.2.2 Les fonctions des jonctions serrées

La principale fonction des JS est de **restreindre la perméabilité paracellulaire** : cette fonction est à la base des propriétés de barrière des épithéliums ou des endothéliums. Cette étanchéité est assurée par l'association des boucles extracellulaires des protéines transmembranaires de deux cellules voisines afin de bloquer la voie paracellulaire. Cependant, les JS, selon leur composition en claudines, constituent également des **pores sélectifs** laissant passer certains ions via la voie paracellulaire. Les JS sont aussi impliquées dans la mise en place d'une **polarité cellulaire**. En effet, elles encerclent entièrement la cellule formant ainsi une barrière à la diffusion des lipides et des protéines de la membrane plasmique : cela induit une distribution différentielle des transporteurs et des récepteurs entre la face luminale et abuminale des cellules (Betz and Goldstein, 1980; Lidinsky and Drewes, 1983). La mise en

place de cette polarité implique des voies de signalisation intracellulaire initiées par des protéines intracellulaires des JS, notamment par les protéines de polarité PAR3 et 6 (voir pour revue Shin et al., 2006). Enfin, les JS régulent également la **prolifération cellulaire**, en général en l'inhibant. En effet, plus la densité cellulaire augmente, plus l'assemblage des JS augmente et moins il y a de prolifération. Ce phénomène se déroule via la modulation des voies de signalisation ou la séquestration de facteurs de transcription (voir pour revue Matter et al., 2005).

2.3 Accès des signaux métaboliques périphériques régulant la prise alimentaire vers le système nerveux central via les interfaces sang/cerveau

Les interfaces sang/cerveau sont des zones d'échange entre la périphérie et le SNC. Dans le cadre de la régulation de la balance énergétique, ces interfaces constituent donc le lieu de passage des signaux métaboliques périphériques devant atteindre les centres régulateurs de la prise alimentaire (Figure 4). Les substances liposolubles telles que les AGL pénètrent dans le cerveau librement par simple diffusion à travers les membranes plasmiques lipidiques des capillaires cérébraux. En général, le potentiel de diffusion d'une molécule à travers la BHE corrèle bien avec sa liposolubilité (Cornford et al., 1982). Outre son facteur de solubilité, les molécules à charge positive ont aussi un avantage pour traverser la BHE probablement à cause de leurs interactions avec le glycocalix et les phospholipides membranaires négatifs. Cependant, à l'état physiologique, la majorité des molécules sont chargées négativement. Ainsi, les molécules hydrophiles ou chargées négativement ne peuvent pas diffuser à travers les barrières sang/cerveau et devront donc utiliser d'autres systèmes pour amener leur information au SNC (Tableau 1).

2.3.1 Transport transendothélial via les Transporteurs/Récepteurs

Un premier type de transport au niveau des barrières sang/cerveau est le transport transendothélial (ou transépithélial au niveau des PC). Pour les petites molécules hydrophiles, des **transporteurs** ont été décrits au niveau des interfaces sang/cerveau. Il en existe pour les hexoses (glucose, mannose, arabinose, galactose), les AA (phénylalanine, leucine), les acides monocarboxyliques (lactate, corps cétoniques), les nucléosides (adénine, guanine, uridine), la choline et les ions (voir pour revue Abbott et al., 2010). Pour les macromolécules hydrophiles, des **récepteurs spécifiques** ont aussi été décrits au niveau des cellules endothéliales ou des cellules épithéliales des PC. Ces récepteurs vont permettre le transport des macromolécules du sang vers le cerveau par des mécanismes de transcytose. Dans tous les cas, la présence de transporteurs/récepteurs, leur distribution différentielle sur les membranes luminale et

abluminale (gérant la direction du transport) et le gradient de concentration des molécules sont des critères à prendre en compte pour déterminer comment une molécule hydrophile est transportée au niveau des interfaces sang/cerveau.

A) Les transporteurs : le passage des nutriments

Les nutriments régulant la prise alimentaire sont au nombre de trois : les AGL, le glucose et les AA. Les **AGL**, par leur propriété lipophile, entrent dans le SNC par simple diffusion. Les lipides peuvent également être transportés sous forme de LDL. Des études ont montré que les cellules endothéliales de la BHE expriment le récepteur au LDL et que ce dernier permet le transport des LDL par transcytose via la voie des cavéoles (Dehouck et al., 1997).

Le **glucose**, substance hydrophile de 180 Da, utilise un transporteur, le GLUT1. Ce transporteur est une protéine de 55 kDa appartenant à la famille des transporteurs de glucose indépendant du sodium. Dans le cerveau, son expression est restreinte aux cellules endothéliales de la BHE, aux cellules épithéliales des PC et aux cellules épendymaires, notamment les tanocytes de l'EM (Pardridge et al., 1990; Peruzzo et al., 2000). Au niveau de la BHE, GLUT1 est exprimé sur la face luminale et abluminale des cellules endothéliales ce qui permet une diffusion selon le gradient de concentration. De plus, sa distribution asymétrique avec 3 à 4 fois plus de transporteurs sur la face abluminale permettrait d'éviter une accumulation de glucose dans les cellules endothéliales et de favoriser un transport vers le cerveau (Bolz et al., 1996; Farrell and Pardridge, 1991). Par ailleurs, une étude de Ngarmukos *et coll.* a montré une colocalisation de GLUT1 et de GLUT4 au niveau de la BHE dans l'hypothalamus ventromédial (Ngarmukos et al., 2001). GLUT4 est un membre de la famille des transporteurs de glucose indépendant du sodium étant sensible à l'insuline, suggérant ainsi que l'insuline modulerait l'accès du glucose dans cette région cérébrale. En effet, Hertz *et coll.* ont montré que l'insuline pouvait augmenter le transport du glucose à travers la BHE (Hertz et al., 1981). Au niveau des PC, GLUT1 est exprimé par les cellules épithéliales, côté basolatéral. Finalement, il existe également un autre transporteur au glucose dépendant du sodium, nommé SGLT1 (Elfeber et al., 2004; Yu et al., 2013), localisé face abluminale des cellules endothéliales qui ne permettrait qu'une sortie du glucose vers le sang (Abbott, 2010).

Les **AA** sont transportés au niveau des interfaces sang/cerveau du sang vers le cerveau ou du cerveau vers le sang selon la distribution de leurs transporteurs au niveau des cellules endothéliales ou des cellules épithéliales. On distingue deux types de transporteurs : des systèmes de transport facilité sodium-indépendants et sodium-dépendants. Au niveau de la BHE, le système L (Boado et al., 1999) transporte des AA à longue chaîne neutre comme le L-

tryptophan, le L-histidine ou le L-tyrosine (Abbott et al., 2010). Ces transporteurs sont indépendants du sodium et localisés sur la face luminale et abluminale des cellules endothéliales de la BHE : comme GLUT1, ils permettent un transport selon le gradient de concentration. Le système γ^+ permet le transport des AA basiques à longue chaîne cationique du sang vers le cerveau (Stoll et al., 1993). Ces transporteurs sont indépendants du sodium et localisés sur la face luminale des cellules endothéliales de la BHE. Les systèmes de transport sodium-dépendants sont très nombreux et sont présents sur la face abluminale ou luminale des cellules endothéliales de la BHE (voir pour revue Abbott et al., 2010). En général, ces transporteurs utilisent le gradient de concentration du sodium principalement pour extraire les AA non essentiels du SNC (voir pour revue Bernacki et al., 2008). D'autres études indiquent que les PC sont également équipés en transporteurs des AA (Redzic et al., 2005, Preston and Segal, 1992; Segal, 2001). La direction du transport des AA serait bidirectionnelle et dépendante des concentrations en AA du LCR (Preston et al., 1989).

B) Transcytose médiée par les récepteurs : le passage des hormones

Les hormones métaboliques sont des macromolécules qui vont utiliser leurs récepteurs spécifiques pour traverser les interfaces sang/cerveau via des mécanismes de transcytose. La transcytose médiée par récepteur se déroule en trois étapes : la fixation de la molécule à son récepteur avec formation de cavéoles, l'internalisation sous forme de vésicules avec traversée du cytoplasme et l'exocytose au pôle opposé de la cellule. Dans la majorité des tissus, les vésicules internalisées sont dirigées vers les lysosomes pour y être dégradées : cependant, au niveau de la BHE, la faible épaisseur de la cellule endothéliale laisse suggérer que la transcytose y serait favorisée.

La **leptine** accède au cerveau par un système de transport saturable, unidirectionnel (Banks et al., 1996) et modulable par diverses substances (cf 2.4.3) (Kastin and Pan, 2000). La forme courte du récepteur à la leptine (Ob-Ra) serait impliquée dans son transport vers le SNC (Hileman et al., 2002; Kastin et al., 1999) : elle est exprimée par les cellules endothéliales de la BHE (Bjørbaek et al., 1998), les cellules épithéliales des PC (Bjørbaek et al., 1998; Guan et al., 1997), et les tanocytes de l'éminence médiane (données issues du laboratoire). Cependant rien n'indique que ce récepteur Ob-Ra soit réellement impliqué dans des phénomènes de transcytose. La forme longue du récepteur à la leptine (ObRb) est également exprimée par les cellules endothéliales de la BHE (Bjørbaek et al., 1998). Il est très probable que ce récepteur soit responsable des nombreux effets vasculaires de la leptine incluant l'angiogenèse (Anagnostoulis et al., 2008), la perméabilisation de l'endothélium (Cao et al., 2001), la modulation du tonus vasculaire ou l'inflammation (Zlokovic et al., 2000). La forme longue du

récepteur à la leptine est également présente au niveau des PC (Guan et al., 1997) et des tanycytes de l'EM (Balland et al., soumis dans Cell Metabolism).

Les premières études dans le domaine stipulaient qu'il n'existait pas de transport d'**insuline** au niveau de la BHE ou des PC (Margolis and Altszuler, 1967). Cependant, Wood et Porte ont montré en 1977 qu'il existait une corrélation entre les niveaux d'insuline dans le sang et dans le LCR suggérant un système de transport de l'insuline au niveau des interfaces sang/cerveau. Les études de Banks *et coll.* ont confirmé que l'insuline pouvait être transportée vers le SNC via un transport saturable et de façon non uniforme selon les régions cérébrales (Banks et al., 1997a, 1997b). Le récepteur à l'insuline est exprimé au niveau des cellules endothéliales de la BHE (Pardridge et al., 1995) et des cellules épithéliales des PC (Baskin et al., 1986), afin d'assurer son transport vers le SNC (Banks et al., 1997b). Cependant, d'autres études suggèrent que ces récepteurs joueraient plutôt un rôle dans la modulation de la fonction endothéliale ou épithéliale, voire une endocytose de l'insuline en vue d'être dégradée (Banks, 2008).

Bien qu'une origine centrale de la **ghréline** ait été décrite (Cowley et al., 2003), la ghréline périphérique peut accéder aux réseaux neuronaux via la BHE (Banks et al., 2002). Chez la souris, Banks *et coll.* ont montré l'existence d'un système de transport saturable de la ghréline murine uniquement du cerveau vers le sang, et de la ghréline humaine dans les 2 sens.

2.3.2 Transfert d'information via les messagers de la barrière hémato-encéphalique

Le mécanisme le plus décrit est le transport à travers la BHE grâce à des récepteurs ou les transporteurs spécifiques. Cependant, un autre mécanisme existe : suite à leur stimulation par les signaux périphériques, les cellules endothéliales peuvent synthétiser des substances modifiant l'activité neuronale. Ces substances incluent les cytokines pro-inflammatoires et le monoxyde d'azote (NO). Par exemple, bien que le récepteur à l'**adiponectine** soit exprimé dans les cellules endothéliales cérébrales, cette dernière ne traverse pas (ou très peu) la BHE (Spranger et al., 2006). De plus, elle n'est pratiquement pas retrouvée dans le LCR chez l'homme (Neumeier et al., 2007). Spranger *et coll.* ont alors suggéré que l'adiponectine pourrait utiliser une voie alternative pour agir sur les neurones régulant la balance énergétique. Une expérience réalisée *in vitro* a montré que l'adiponectine peut, en se fixant à ses récepteurs endothéliaux, diminuer les taux d'interleukines 6 (IL-6) produits par les cellules endothéliales et pourrait ainsi moduler l'activité neuronale sans traverser la BHE (Spranger et al., 2006). De la même manière, la **ghréline** augmente la synthèse de NO via l'activation de la NOS endothéliale et pourrait ainsi moduler l'activation neuronale par ce mécanisme (Aslan et al., 2009; Xu et al., 2008).

2.3.3 Transfert d'information via les influx nerveux

Une autre voie très documentée est le transfert d'information via le nerf vague. Des expériences de vagotomie inhibent en effet l'action des molécules périphériques sur la régulation centrale de la prise alimentaire suggérant ainsi que leur information passe par voie nerveuse. C'est le cas pour la majorité des hormones du tractus gastro-intestinal. Par exemple, la **CCK** peut transmettre son signal via le nerf vague. En effet, son récepteur CCK1 est exprimé sur les afférences vagales et une injection de CCK en périphérique stimule le nerf vague (Moran et al., 1997). A l'inverse, une vagotomie abdominale bloque l'effet satiétogène de la CCK (Smith et al., 1981). Le **GLP-1** et le **peptide YY** possèdent également des récepteurs sur les afférences du nerf vague et peuvent véhiculer leur information via ce dernier (Abbott et al., 2005; Iwasaki and Yada, 2012). De même, les noyaux du bulbe sont informés de l'arrivée d'**AA** dans le duodénum via le nerf vague (Tome, 2004).

Le récepteur à la **ghréline** est également présent sur les afférences vagales, mais contrairement aux signaux précédents, la ghréline inhibe le nerf vague (Date et al., 2002). La **leptine** pourrait également moduler l'activité du nerf vague (Gaigé et al., 2002). Cependant, la leptine et la ghréline ayant toutes les deux un rôle précis et connu au niveau central, l'importance de leur action via le nerf vague reste matière à débat.

2.3.4 Accès facilité via les organes circumventriculaires

Une voie alternative, mais encore fortement controversée, permettrait aux molécules périphériques de contourner la BHE : le passage via les OCV. En effet, la vasculature des OCV est fenêtrée et permet donc des échanges sang/parenchyme cérébral facilités (Gross and Weindl, 1987). Dans le contexte de la prise alimentaire, le NA a la particularité d'être localisé à proximité d'un OCV, l'EM. De nombreux auteurs ont alors suggéré que les signaux périphériques pouvaient atteindre le NA par simple diffusion à partir de l'EM (Broadwell et al., 1983; Ciofi et al., 2009; Morita and Miyata, 2013). En effet, l'injection de leptine radiomarkée montre qu'elle s'accumule rapidement dans l'EM et le NA médiobasal (Banks et al., 1996). L'AP participe également à la régulation de la prise alimentaire : il contient des neurones glucosensibles capables de détecter la concentration en glucose dans le sang (Young, 2012) et des récepteurs aux signaux métaboliques tels que la ghréline (Zigman et al., 2006) ou la leptine (Lin et al., 2000a). De la même manière, le SFO pourrait être impliqué dans le contrôle de la prise alimentaire via ses récepteurs GHS-R, Ob-R (Mimee et al., 2013) et Adipo-R (Alim et al., 2010).

2.4 Développement et plasticité des interfaces sang-cerveau

Les **cellules endothéliales** et les **JS** sont des éléments primordiaux des barrières sang/cerveau (Figure 4). Une modulation d'organisation de ces éléments pourrait alors réguler l'accès des molécules métaboliques vers le SNC. En effet, les interfaces sang/cerveau sont plastiques durant le développement et à l'âge adulte, notamment lors de déséquilibres énergétiques, afin de moduler les échanges sang/cerveau.

2.4.1 Les cellules endothéliales

A) Développement et angiogenèse

La période où les vaisseaux cérébraux sont les plus plastiques est le développement embryonnaire. À partir d'E10 chez la souris et E11 chez le rat, le système vasculaire se développe par angiogenèse : en effet, les vaisseaux pénètrent dans le SNC à partir du plexus vasculaire périneural mis en place à E9. Leur développement suit ensuite un schéma spatio-temporel précis qui se terminera en post natal. Ce développement est réalisé grâce à des facteurs angiogéniques paracrines sécrétés par le cerveau embryonnaire (Engelhardt, 2003).

Le premier facteur identifié dans les cerveaux embryonnaires en développement a été le **FGF acide et basique** (Risau et al., 1988). Il induit une prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et une angiogenèse *in vivo* mais son profil d'expression reste haut chez l'adulte et ne coïncide donc pas avec le schéma spatio-temporel du développement vasculaire (Emoto et al., 1989). Le second facteur identifié a été le **facteur de croissance de l'endothélium vasculaire** (VEGF) agissant via ses récepteurs VEGF-R1 (ou flt-1) et VEGF-R2 (ou KDR). En effet, les souris déficientes pour le VEGF montrent que celui-ci est indispensable à la formation des vaisseaux cérébraux et la survie de l'animal (Ferrara et al., 1996). Dans le cerveau, le VEGF est produit par les cellules de la couche épendymaire : l'angiogenèse se fait alors de manière radiale vers les épendymes, tandis que les neurones, naissant des épendymes au même moment, se dirigent dans la direction opposée. Bass *et coll.* ont montré que les cellules radiales de la zone ventriculaire pouvaient servir d'échafaudage nécessaire à la fois à la guidance des vaisseaux naissant et à la migration neuronale (Bass et al., 1992). L'**angiopoiétine 1 et 2** et leur récepteur commun Tie-2 jouent aussi un rôle dans le développement vasculaire cérébral, notamment pour l'adhésion à la matrice extracellulaire et le recrutement des cellules périvasculaires (Davis and Yancopoulos, 1999). L'angiopoiétine 1 et son récepteur Tie-2 sont toujours exprimés à l'âge adulte notamment dans les tanocytes et les vaisseaux fenêtrés de l'EM, respectivement (Horton et al., 2010). Le **TGFβ** peut aussi avoir un rôle dans l'angiogenèse via ses récepteurs Alk-1, Alk-5 et l'endogline, et ses effecteurs intracellulaires Smad5 et 6 (voir pour revue van Meeteren et al., 2011). Outre les facteurs de croissance, les molécules de guidance, telles que

les sémaphorines et leurs récepteurs, la famille des éphrines ou les récepteurs Notch, jouent également un rôle important dans le développement vasculaire cérébral.

Cette angiogenèse centripète aurait pour origine une hypoxie cérébrale : en effet, le cerveau embryonnaire n'étant pas oxygéné, des zones hypoxiques y sont retrouvées (Fan et al., 2009). Cela induit la sécrétion du **facteur induit par l'hypoxie** (HIF-1). HIF-1 est un facteur de transcription qui induit l'expression de facteurs angiogéniques notamment le VEGF et ses récepteurs, le PDGF β , le FGF et l'érythropoïétine: les souris KO pour HIF-1 présentent en effet un développement angiogénique cérébral anormal (Tomita et al., 2003). Une fois l'oxygène apporté au cerveau, les zones hypoxiques disparaissent ainsi que l'angiogenèse.

Les facteurs de croissance cités précédemment sont aussi des **facteurs de perméabilité** (BDNF, VEGF, HIF, TGF). Ils sont capables d'induire des fenestrations sur les cellules endothéliales *in vivo* et *in vitro* (Esser et al., 1998). Ainsi, une fois formés, les vaisseaux cérébraux ont un large diamètre, présentent des fenestrations (Stewart and Hayakawa, 1994) et possèdent des JS très rudimentaires : ils sont ainsi encore perméables aux petites molécules. Par la suite, les vaisseaux vont perdre leurs fenestrations, devenir de plus en plus fins et acquérir des complexes de JS très efficaces.

B) Plasticité vasculaire à l'âge adulte

A l'âge adulte et en conditions physiologiques, les vaisseaux du SNC sont très peu plastiques. Les phénomènes d'angiogenèse sont rares voire inexistantes au niveau central. Cependant, dans des cas pathologiques, la formation de vaisseaux peut être observée. Des phénomènes d'angiogenèse sont notamment observés suite aux ischémies cérébrales. Après une hypoxie, la formation de vaisseaux au niveau central a été observée chez la jeune souris (Harb et al., 2013). Comme à l'âge embryonnaire, ce phénomène fait intervenir le HIF-1 et le VEGF (Lokmic et al., 2012). Des études ont d'ailleurs montré le rôle bénéfique du VEGF au niveau du cerveau après un accident vasculaire cérébral. L'injection centrale de VEGF permet de diminuer les dommages cérébraux, favoriser l'angiogenèse, retarder la sénescence des cellules endothéliales et augmenter la neurogenèse (Mattson and Wan, 2005). Le VEGF est également physiologiquement essentiel au niveau cérébral à l'âge adulte, notamment dans le maintien des caractéristiques des épendymes (Kamba et al., 2006; Maharaj et al., 2008).

2.4.2 Les jonctions serrées

Les JS sont des structures jonctionnelles qui réalisent l'adhésion de deux cellules voisines et sont donc des éléments clés dans les barrières sang/cerveau.

A) Développement et mise en place des propriétés de barrière

A E10-E11, les vaisseaux néoformés sont larges, et présentent des fenestrations et des JS très rudimentaires : ils sont donc encore perméables aux petites molécules. Cependant, suite à l'oxygénation du tissu, la BHE va se mettre en place très rapidement. Chez la souris, elle se déroule entre E11 et E17 où les premières JS deviennent observables. A E21, la résistance électrique de la BHE est déjà haute chez le rat suggérant la présence de JS efficaces. Cependant, la BHE n'est pas encore tout à fait mature et va finir de se mettre en place en post-natal. En effet, la proportion de JS associées au feuillet protoplasmique P des membranes plasmiques (caractéristiques de JS matures dans le cerveau) augmente encore après la naissance. En parallèle, les vaisseaux perdent leurs fenestrations : à E16-E18, le marqueur de fenestrations MECA-32 n'est plus observable (Hallmann et al., 1995).

Cette mise en place de la barrière est notamment due au micro-environnement des vaisseaux. En effet, des cellules endothéliales isolées ne sont pas prédisposées à développer des propriétés de barrière. Les premières cellules décrites comme jouant un rôle dans la formation de la barrière sont les astrocytes. En effet, des études *in vitro* ont permis de mettre en évidence que les propriétés de barrière de cellules endothéliales isolées étaient favorisées par l'ajout d'astrocytes (Dehouck et al., 1990), ou de milieu conditionné astrocytaire (Gardner 1995), suggérant l'implication de facteurs solubles tels le TGF β , le GDNF ou le FGF. La maturation de la barrière fait aussi intervenir le Src-suppressed C Kinase Substrate (SSECKS). Ce suppresseur de tumeur, synthétisé par les astrocytes en réponse au PDGF β des cellules endothéliales, diminue la sécrétion astrocytaire de VEGF et augmente celle de l'angiopoïétine 1 : cela induit la localisation de ZO1 au niveau des JS (Engelhardt, 2003). Lors de l'oxygénation du tissu, les astrocytes sécrètent également la thrombospondine 1 qui est un activateur du TGF β astrocytaire. Ce facteur, en compagnie du GDNF (Igarashi et al., 1999) et du FGF (Sobue et al., 1999), intervient dans la maturation des vaisseaux et l'organisation des JS. Cependant, la gliogenèse chez le rat ne se fait qu'à partir d'E17 alors que le développement de la barrière et la neurogenèse se déroulent entre E11 et E17. La mise en place des propriétés de barrière serait donc vraisemblablement initiée par d'autres signaux, sécrétés certainement par les neurones, les péricytes ou les progéniteurs, tandis que les astrocytes auraient plutôt un rôle dans la maturation (en périnatal) et la maintenance (à l'âge adulte) de la BHE.

Lors du développement de la barrière, les capillaires cérébraux acquièrent aussi tous les systèmes de transport adéquats. C'est le cas par exemple de GLUT1 (Bolz et al., 1996; Cornford et al., 1993a). A E13, le marquage GLUT1 est très faible puis augmente progressivement jusqu'en post natal. De même, sa distribution asymétrique n'existe pas à E13 et ne commence qu'à partir d'E19.

B) Plasticité des jonctions serrées à l'âge adulte

Contrairement aux vaisseaux, qui restent relativement stables à l'âge adulte, les JS sont des composants extrêmement plastiques, modulés selon l'état physiologique de l'individu et modulant la perméabilité des barrières sang/cerveau. Par exemple, une étude reporte des modifications de barrière chez la brebis au niveau des PC en fonction de la photopériode. L'expression de l'occludine, de ZO1 et de ZO2 est plus importante en jours courts comparés aux jours longs. Ces résultats suggèrent une augmentation de la perméabilité des PC en jours longs via une régulation des niveaux de protéines de JS (Lagaraine et al., 2011). De même, dans la cornée, le neurotransmetteur substance P induit une augmentation de ZO1 *in vitro*, suggérant une modulation par des neurotransmetteurs des JS de l'épithélium de la cornée (Ko et al., 2009). Certains cas pathologiques induisent également des ouvertures de la barrière en modulant l'expression, la localisation et la dégradation des protéines de JS comme la sclérose en plaque, l'hypoxie/ischémie, les œdèmes, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, l'épilepsie, les tumeurs, les glaucomes ou l'encéphalopathie de Gayet-Wernicke.

Dans des situations physiologiques ou pathologiques, la plasticité des JS est due à plusieurs phénomènes tels que des modifications post traductionnelles des protéines de JS qui induisent leur délocalisation de la JS, une modulation de leur synthèse ou encore leur dégradation. De nombreuses études ont montré que les **modifications post traductionnelles** des protéines de JS, comme la phosphorylation, régulent l'assemblage ou le désassemblage des JS. Par exemple, la phosphorylation de l'occludine sur ses résidus thréonine ou sérine, via la signalisation calcique, permet la stabilisation de la JS tandis que sa déphosphorylation induit sa désorganisation (Rao, 2009). En revanche, une phosphorylation des résidus tyrosine de l'occludine augmente la perméabilité vasculaire lors d'ischémie cérébrale (Takenaga et al., 2009). En particulier, une phosphorylation des résidus tyrosine sur le domaine C-terminal de l'occludine diminue son interaction avec les ZO, engendrant la délocalisation de l'occludine de la JS et sa rupture (Kale et al., 2003). Les autres protéines de JS subissent également des phosphorylations. Par exemple, la phosphorylation de ZO1 module la formation des JS : suite à l'inhibition de la PKC, Stuart et Nigam ont remarqué *in vitro* une diminution de la TEER due à la déphosphorylation de ZO1 et sa sortie de la JS (1995). Cependant, l'inhibition de la tyrosine phosphatase, qui augmente donc le niveau de phosphorylation de ZO1 sur ses résidus tyrosine, rompt aussi les JS (Staddon et al., 1995). La cinguline ou la protéine 7HA sont d'autres phosphoprotéines constituant les JS dont le niveau de phosphorylation prédit leur localisation au niveau de la JS. Ainsi, la balance entre les protéines kinases (notamment PKC, c-SRC) et les phosphatases (PP2A, PP1), présentes au niveau des JS, est importante dans le contrôle de l'assemblage/désassemblage des JS, et donc de leur perméabilité. Les plasticités de barrière

peuvent aussi faire intervenir **la synthèse de novo** ou la **dégradation et/ou diminution de l'expression de protéines de JS**. Au niveau de l'épithélium de la cornée, Ko *et coll.* ont observé *in vitro*, suite à un traitement à la substance P, une augmentation de l'expression génique et protéique de ZO1, associée à une augmentation de la TEER. Ce phénomène est sous contrôle de la voie de signalisation calcique et de la calmoduline protéine kinase II (2009). A l'inverse, dans de nombreux cas pathologiques, comme l'encéphalopathie de Gayet-Wernicke (Beauchesne *et al.*, 2009b), une baisse de la quantité d'occludine, de ZO1 et de ZO2 a été observée *in vivo*. Des dégradations de protéines de JS, telle l'occludine, sont aussi recensées (Antonetti *et al.*, 1999; Murakami *et al.*, 2009).

Ces modulations des JS sont souvent dues à des **facteurs de croissance**, tels que le VEGF. Injecté de façon chronique en icv chez le rat ou chez la souris, le VEGF induit une perméabilité vasculaire via la rupture des JS (Proescholdt *et al.*, 1999). En 2009, Murakami *et coll.* ont montré que le VEGF, dans des cultures de cellules de rétines, pouvait induire une phosphorylation de l'occludine sur sa sérine 490, induisant ainsi son ubiquitinylation et son internalisation vers les endosomes en vue de sa dégradation. Les **radicaux libres** modulent également les JS. L'ouverture de la BHE est souvent associée à une augmentation de l'activité de la NOS endothéliale et, par conséquent, à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène. Cela entraîne un stress oxydatif qui active les PK et inhibe les PP. Par exemple, des études ont montré *in vitro* qu'un stress oxydatif engendre l'activation et le transfert de la kinase c-SRC à la membrane, et la phosphorylation des résidus tyrosine de l'occludine et de ZO1 (Basuroy *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2002). Ce phénomène induit leur dissociation, leur redistribution et la rupture de la JS. Les espèces réactives de l'oxygène cassent également la BHE par la redistribution d'autres protéines de JS comme la claudine 5, via la PKB, la PI3 kinase et RhoA (Schreibelt *et al.*, 2007). L'ouverture de la BHE est enfin associée à une augmentation de l'activité des **métalloprotéinases** (MMP). Ces MMP détruisent les membranes basales, rompent par conséquent les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules endothéliales et perturbent l'intégrité des JS (Beauchesne *et al.*, 2009b).

L'ensemble de ces travaux montre que les interfaces sang/cerveau sont très plastiques et suggère par conséquent que des changements hormonaux dus à des déséquilibres énergétiques pourraient eux aussi provoquer une réorganisation des barrières sang/cerveau modulant ainsi les échanges entre ces deux compartiments.

2.4.3 Plasticité des interfaces sang/cerveau lors de déséquilibres énergétiques

Plusieurs auteurs ont décrit des modifications structurales, concernant les vaisseaux et les JS, ainsi que des modifications fonctionnelles, concernant les systèmes de transport, au niveau des interfaces sang/cerveau lors de déséquilibres énergétiques qu'ils soient physiologiques ou pathologiques. Ces résultats seront présentés dans le cas du jeûne, de l'obésité et du diabète.

A) Le jeûne

Des modifications structurales vasculaires ou de barrière n'ont pas encore été recensées dans la littérature lors du jeûne. Cependant, plusieurs papiers rapportent une perméabilisation des vaisseaux lors d'hypoglycémie. En effet, lors de la rétinopathie diabétique, une maladie associée au diabète, une angiogenèse est observée au niveau de la rétine. Certains auteurs suggèrent que cette pathologie secondaire serait due aux hypoglycémies récurrentes induites par les traitements contre le diabète. Ce phénomène est mis en relation, dans la littérature, avec l'augmentation du VEGF dans le sang induit par l'hypoglycémie (Dantz et al., 2002; Merl et al., 2005) : en effet, l'hypoglycémie augmente l'expression du VEGF (Akiri et al., 1998; Satake et al., 1998), via le facteur HIF-1 (Carmeliet et al., 1998), et stabilise son ARNm (Stein et al., 1995), permettant ainsi l'augmentation de sa synthèse protéique. Cependant, l'origine tissulaire de l'augmentation du VEGF sanguin induit par l'hypoglycémie n'a pas encore été déterminée à ce jour.

Concernant les modifications des systèmes de transport des molécules périphériques vers le SNC lors du jeûne, la littérature est assez riche. Par exemple, la quantité de **leptine** transportée à travers la BHE diminue avec la famine (Banks, 2003) ou lors de jeûnes répétés (Kastin and Pan, 2000); alors qu'elle ne varie pas (Kastin and Akerstrom, 2001) lors de jeûnes à court terme. Pour la **ghréline**, Banks *et coll.* ont aussi montré une corrélation inverse entre le poids et l'accès de la ghréline au SNC suggérant que l'état physiologique de l'individu influençait les taux de transport de la ghréline. Ainsi, lors du jeûne, le passage de la ghréline augmente de 3 fois comparé à la souris nourrie (Banks et al., 2008). Pour l'**insuline**, son transport est aussi augmenté lors de jeûne ou d'hypoglycémie (Banks et al., 1997a). Enfin, les mises à jeun modifient également le passage de nutriments comme le **glucose**. En effet, une diminution des niveaux de glucose ont été observé chez les animaux à jeun associée cependant à une augmentation de son assimilation par le cerveau (Cornford et al., 1993b). Cette augmentation de la perméabilité au glucose a aussi été observée chez l'homme lors du jeûne (Hasselbalch et al., 1995). Ce phénomène peut être associé à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de GLUT1 lors du jeûne bien que les niveaux protéiques ne varient pas (Cornford et al.,

1993b; Koranyi et al., 1991). Certains auteurs ont également montré que, suite à des hypoglycémies récurrentes liées au diabète de type 1, le transport du glucose (Criego et al., 2005) et du lactate (Herzog et al., 2013) est augmenté vers le SNC.

B) Obésité et Diabète

Contrairement au jeûne, de nombreux remaniements structuraux et fonctionnels ont été décrits dans la littérature en cas d'obésité ou de diabète. Ces modifications des interfaces sang/cerveau sont en fait induites par les dyslipidémies et par l'hyperglycémie associées à ces pathologies. Les **dyslipidémies** perturbent fortement l'intégrité des barrières sang/cerveau. Au niveau des JS, Kanoski *et coll.* ont montré une diminution de l'expression des protéines les constituant, notamment de la claudine 12, de la claudine 5 et de l'occludine, au niveau de la BHE ; et de la claudine 12, de la claudine 5 et de ZO2 au niveau des PC chez des rats nourris en régime gras. Ce phénomène est associé à une augmentation de la perméabilité de la barrière et des troubles cognitifs (Davidson et al., 2012; Kanoski et al., 2010). De même, chez l'Homme, les dyslipidémies sont associées à des problèmes de BHE (Bowman et al., 2012). Les lipides agissent via deux voies afin d'induire ces effets: **1-** ils détruisent directement les JS en baissant l'expression des protéines les composant ou en induisant leur redistribution cellulaire, **2-** ils augmentent la production de cytokines inflammatoires responsables de la rupture des JS. Au niveau des vaisseaux, les souris nourries avec une alimentation riche en graisse présentent également un développement vasculaire cérébral anormalement important. Concernant l'**hyperglycémie**, de nombreuses perturbations sont également reportées dans la littérature. L'hyperglycémie perturbe tout d'abord l'intégrité de la BHE et de la barrière rétinocérébrale. Leur perméabilité est augmentée alors que des injections d'insuline (Huber et al., 2006) ou l'activation de l'AMPK (Liu et al., 2012a) ont un effet protecteur sur ce phénomène. Cette augmentation de perméabilité est associée à une diminution de la quantité d'occludine, de la claudine 5 et de ZO1 ainsi qu'à une augmentation d'activité des MMP et à la présence d'anions superoxydes (Hawkins et al., 2007; Liu et al., 2012a). Lors de rétinopathies diabétiques (cf pour revue Felinski and Antonetti, 2005), des perturbations de la barrière sont aussi associées à une diminution d'expression de ZO1 et de l'occludine, et une phosphorylation de l'occludine entraînant une redistribution des protéines de JS (Antonetti et al., 1999; Gardner, 1995). Ces modifications sont notamment dues à une augmentation du VEGF, connue pour détruire les JS (Antonetti et al., 1999), ou de l'histamine (Gardner, 1995). L'augmentation du VEGF lors de diabète engendre aussi des cas d'angiogenèse à l'âge adulte au niveau du cortex, du striatum et de la rétine (Prakash et al., 2012).

Tout comme le jeûne, l'obésité et le diabète induisent des modifications des systèmes de transport au niveau de la BHE. Concernant la **leptine**, sa quantité transportée à travers la BHE diminue avec l'obésité. Les triglycérides seraient impliqués dans ce phénomène et seraient alors responsables des problèmes de résistance à la leptine chez les sujets obèses (Banks et al., 2004). Banks *et coll.* suggèrent également que l'augmentation des triglycérides libres lors de jeûne prolongé serait aussi responsable de la diminution du transport de la leptine observée dans cette condition (2004). L'insuline ou l'injection de glucose (qui induit un pic d'insuline) augmente le passage de la leptine chez la souris à jeun ; mais n'a pas d'effet chez les souris diabétiques hypoinsulinaires (Kastin and Akerstrom, 2001). Concernant la **ghréline**, des souris obèses et âgées perdent l'habileté à transporter la ghréline vers le cerveau, bien que les triglycérides favorisent le transport de la ghréline (Banks et al., 2008). L'obésité diminue également le passage de l'**insuline** (Urayama and Banks, 2008). Ce phénomène est à corrélérer avec une diminution de la liaison de l'insuline à l'endothélium suggérant une diminution de ses récepteurs sur ce dernier (Schwartz et al., 1990). Enfin, Banks *et coll.* ont observé une augmentation du transport de l'insuline au niveau de la BHE lors d'un diabète induit par la streptozotocine, tandis que son transport est diminué lors d'un diabète induit par l'alloxane (Banks et al., 1997c).

Ainsi, les interfaces sang/cerveau sont le lieu de passage des molécules métaboliques devant atteindre les noyaux centraux régulant la prise alimentaire. Dans le chapitre I, nous avons vu toute l'importance du NA dans le contrôle de la prise alimentaire, tandis que les moyens pour l'atteindre ont été décrits dans ce chapitre. Cependant, la littérature décrit principalement un accès via la BHE. Or, le NA a la particularité d'être localisé à proximité de l'éminence médiane, un OCV via lequel les molécules périphériques pourraient transiter librement. Le troisième chapitre sera donc consacré à la description de cette région cérébrale en tant qu'interface sang/liquide céphalorachidien/noyau arqué.

Chapitre 3. L'éminence médiane, une interface sang/liquide céphalorachidien/noyau arqué dans l'hypothalamus médiobasal

L'organisation structurale des interfaces sang/cerveau dans la région cérébrale du NA est très particulière suggérant une régulation spécifique de l'accès des molécules périphériques vers ce noyau hypothalamique. En effet, plusieurs éléments sont à prendre en compte afin de comprendre comment sont organisés les échanges sang/cerveau dans cette région cérébrale. On y trouve à la fois, **1-** des vaisseaux de la BHE directement dans le parenchyme du NA et **2-** des vaisseaux fenêtrés dans l'éminence médiane (EM), un organe circumventriculaire (OCV) adjacent au NA. Alors que les vaisseaux de la BHE présentent des propriétés de barrière et régulent les échanges sang/NA, les vaisseaux de l'EM possèdent de nombreuses fenestrations facilitant les échanges sang/EM. De fait, l'EM est souvent décrite comme une porte d'entrée vers le NA pour les signaux métaboliques régulant la prise alimentaire. Par ailleurs, les vaisseaux de cette région cérébrale ont la particularité d'être contactés par **3-** des cellules épendymaires hautement spécialisées formant le plancher du 3^{ème} ventricule : les tanocytes. Dans l'EM, ces cellules sont le siège de la barrière tanocytaire et participent donc eux aussi à la régulation des échanges sang/cerveau. Ce chapitre aura donc pour but de décrire ces différents constituants, afin de comprendre comment s'organise l'interface sang/cerveau au niveau de l'hypothalamus médiobasal.

3.1 La vasculature de l'hypothalamus médiobasal

3.1.1 Vascularisation de l'EM/NA et circulation sanguine

L'EM et le NA possèdent une vascularisation particulière. En effet, les vasculatures des deux entités sont en étroite connexion et sont séparées de celle du reste de l'hypothalamus (Ambach et al., 1976). La spécificité du système porte de l'EM est connue depuis les années 30 (Popa and Fielding 1930 ; Wislocki 1937) ; mais celle du réseau EM/NA ne sera approfondie qu'entre les années 30 et 70 (Worthington 1955, 1963 ; Negm 1971). L'EM a la particularité d'être extrêmement vascularisée (Green and Harris, 1949) (Figure 5). Le sang est apporté dans cette région par les artères hypophysaires antérieure, médiane et postérieure ; excepté chez l'homme et le singe qui ne possèdent que deux artères hypophysaires. Ces artères entrent latéralement dans l'EM et se divisent en branches anastomosées dans la zone externe pour former le **plexus capillaire primaire** (Ambach et al., 1976), aussi appelé le «plexus capillaire superficiel» (Duvernoy and Risold, 2007) ou «Mantel-plexus». Ce plexus primaire collecte les neurosécrétions des neurones hypothalamiques. L'ensemble des vaisseaux du plexus primaire débouche ensuite sur de larges veines portes se dirigeant vers l'hypophyse antérieure. Issues du plexus primaire, quelques petites anses vasculaires pénètrent dans l'EM, en restant

cependant dans la zone externe. Le plexus primaire donne également naissance à de longues anses vasculaires qui pénètrent dans la zone interne de l'EM. Plus on se situe dans la partie médiale et caudale de l'EM, plus ces anses pénètrent profondément dans la couche interne et atteignent la zone sous épendymaire. Les anses les plus hautes, souvent d'un large calibre, ont deux destinations. Dans un premier temps, elles forment le **plexus capillaire subépendymaire** (Ambach et al., 1976), aussi appelé le «plexus capillaire profond» (Duvernoy and Risold, 2007) qui est en étroite relation avec l'épendyme, puis elles retournent vers le plexus primaire par le système veineux. La fonction de ce plexus subépendymaire n'est pas encore clairement établie mais sa proximité avec le 3^{ème} ventricule suggère des échanges avec le LCR (Talanti and Kivalo, 1961). Dans un second temps, les anses atteignant la zone subépendymale peuvent également contourner les invaginations latérales du 3^{ème} ventricule et entrer dans le NA pour participer à sa vascularisation (Figure 5).

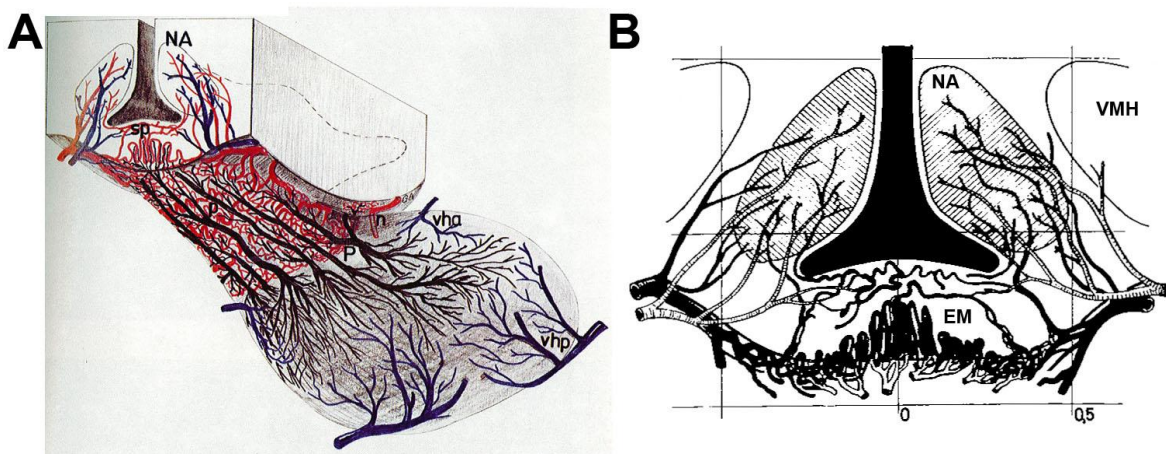


Figure 5 : Vascularisation de l'éminence médiane et du noyau arqué. L'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (NA) sont tous les deux alimentés par les artères hypophysaires (en rouge en A, et en noire en B). La vasculature de l'éminence médiane forme un réseau anastomosé dans la partie externe (en rouge en A) et est caractérisé par la présence d'anses vasculaires pénétrant dans la partie interne (A et B). Ces anses vont former un réseau sous épendymaire (sp en A), dont certains vaisseaux iront vasculariser le noyau arqué ventromédian (A et B). Ces anses retournent ensuite dans la zone externe de l'éminence médiane par le système veineux qui se jettera ensuite dans les larges veines du système porte hypothalamo-hypophysaire (en noir en A). Tiré d'Ambach et coll., 1976.

Au début des années 30, les auteurs pensaient que la circulation sanguine se faisait de l'hypophyse vers l'hypothalamus. Ce n'est qu'à la fin des années 30 que Wislocki et King ont suggéré que le flux sanguin allait de l'EM vers la *pars tuberalis* (1938). Cela a été confirmé dans les années 50 par des études de Green et Harris. Ils ont montré, *in vivo* chez le rat, que l'EM possède une vasculature très développée qui débouche sur de larges veines portes. Dans ces veines, le sang circule de l'EM à la *pars tuberalis* à un débit comparable aux autres veines hypothalamiques. Le flux est constant, sans pulsation. Les auteurs ont aussi observé ces

résultats chez d'autres espèces et ainsi établi la théorie que le cerveau régule la fonction pituitaire via un « relai huméral » par le système porte hypothalamo-hypophysaire (Green and Harris, 1947, 1949). Au sein même des anses vasculaires de l'EM, on suggère cependant que le flux sanguin serait ralenti en raison du réseau vasculaire sinueux afin de favoriser les échanges sang/cerveau.

Un flux sanguin rétrograde allant de l'hypophyse à l'EM a aussi été suggéré par certains auteurs (Ciofi et al., 2009; Oliver et al., 1977; Palkovits, 2008; Porter et al., 1978). Ce flux permettrait un rétrocontrôle direct des hormones hypophysaires sur les noyaux hypothalamiques.

3.1.2 Les vaisseaux fenêtrés de l'éminence médiane

Les vaisseaux du plexus primaire et une partie des anses du parenchyme plus profond de l'EM ont la particularité d'être fenêtrés. Ils expriment notamment MECA-32 chez la souris (Ciofi, 2011a; Mullier et al., 2010) et la PV-1 chez le rat (Ciofi et al., 2009), marqueurs de fenestrations. Les cellules endothéliales ont une membrane basale particulièrement fine, possèdent de nombreuses vésicules et sont dépourvues de complexes de JS. Elles forment ainsi des vaisseaux considérés exempt de BHE, facilitant les échanges sang/cerveau. Ces vaisseaux sont aussi entourés par l'espace de Virchow-Robin : cet espace, rempli de liquide interstitiel, est délimité par la membrane basale des vaisseaux fenêtrés et par la basale parenchymateuse qui limite les pieds tanyctaires et les projections axonales (Maccuza 1963).

A) Morphologie d'une fenestration

La caractéristique principale des vaisseaux de l'EM est la présence de fenestrations au niveau de leur endothélium (Ciofi, 2011a; Mullier et al., 2010). Ces fenestrations constituent des pores circulaires dans la couche endothéliale qui permettent le transfert de substances hydrophiles et augmentent la perméabilité du vaisseau. La structure de ces fenestrations n'a jamais été étudiée complètement au niveau de l'EM, mais plusieurs publications les décrivent au niveau d'autres régions cérébrales (comme dans les PC) ou des tissus périphériques. Les fenestrations sont regroupées en clusters séparés par des zones sans fenestration (Melamed et al., 1980) : cela donne l'aspect d'un tamis à l'endothélium. Chaque fenestration, associée indifféremment au feuillet protoplasmique P ou endoplasmique E membranaire (Bearer and Orci, 1985; Melamed et al., 1980), est un pore occupé par un diaphragme d'environ 60 nm. La fenestration paraît à première vue ronde mais plusieurs études ont montré qu'elle avait en réalité une symétrie octogonale (Bearer and Orci, 1985; Maul, 1971; Stan, 2007). En microscopie électronique à transmission, en vue parallèle, le diaphragme apparaît comme une

fine membrane protéique, sans lipide (absence de l'aspect trilaminaire des membranes plasmiques), attachée au bord de la fenêtrure et possédant en son centre une « densité » (Figure 6). Cette vue parallèle du diaphragme de la fenêtrure a notamment été observée au niveau des vaisseaux de l'EM (Maccuza 1963). En vue de face, suite à une cryofracture rapide, ce diaphragme apparaît comme un arrangement de fibrilles radiales (15 en moyenne) de 7 nm de diamètre, qui prennent l'aspect d'une fleur (Figure 6). Le nombre de fibrilles (de 9 à 21) est assez difficile à déterminer étant donné qu'elles s'assemblent par 2 ou par 3. Ces fibrilles s'entremêlent au centre du pore pour former une maille d'environ 10-12 nm de diamètre (Bearer and Orci, 1985), correspondant à la « densité » observée en vue parallèle. Apparaissent alors des espaces vides entre les fibrilles, d'une taille moyenne de 5.46 nm où les molécules hydrophiles peuvent transiter (Bearer and Orci, 1985). Cela établit donc un *cut off* pour le passage de molécules : par exemple, les pores sont perméables à la peroxydase de Raifort (HRP) (4.5 nm de diamètre) mais pas la ferritine (11 nm de diamètre) (Clementi and Palade, 1969). Il existe une hétérogénéité dans le diamètre des fenestrations et dans l'arrangement des fibrilles mais la structure diaphragmatique est similaire dans de nombreux tissus incluant le rein, le pancréas, les glandes surrénales, la cornée, les PC et les intestins (Bearer and Orci, 1985; Melamed et al., 1980).

Des études ont aussi montré que les fenestrations étaient **chargées négativement** (Dermietzel et al., 1983; Schmidley and Wissig, 1986; Thürauf et al., 1983). La ferritine, molécule cationique à pH 7.8/10, se fixe au diaphragme des fenestrations sur les vaisseaux fenêtrés de l'EM (Schmidley and Wissig, 1986). D'autres études ont montré que la ferritine se fixe aux fenestrations des vaisseaux de l'intestin ou du pancréas (Bearer and Orci, 1985; Simionescu et al., 1981). Cette fixation est abolie par des traitements aux protéases et à l'héparinase (Maul, 1971; Simionescu et al., 1981), suggérant ainsi la présence de protéoglycanes à sulfate d'héparane. Cependant, les lectines, glycoprotéines reconnaissant des monosaccharides spécifiques, ont peu d'affinité pour les diaphragmes des fenestrations (Pino, 1986; Simionescu et al., 1982; Tyler and Burns, 1991) : cela peut s'expliquer par le fait que les résidus sulfates, apportant les charges négatives, empêcheraient la lectine de se fixer aux résidus monosaccharides des protéoglycanes du diaphragme. Ces protéoglycanes sulfatés ont également été observés en microscopie électronique : une étude de Rostgaard et Qvortrup révèle, sur la face luminale des diaphragmes des fenestrations, la présence de larges « touffes » d'environ 400 nm, qu'ils ont interprétées comme étant des protéoglycanes sulfatés (1997). Les études décrites précédemment portaient sur les vaisseaux fenêtrés du pancréas et des intestins, mais ces sites anioniques ont aussi été relevés au niveau des vaisseaux fenêtrés des PC (Taguchi et al., 1998). En effet, leurs fenestrations sont réactives aux colloïdes ferreux

cationiques de pH 1.5/2, suggérant que ces structures présentent également des groupes sulfates portés par les protéoglycanes (Taguchi et al., 1998). Ainsi, ces charges négatives au niveau des fenestrations établissent un second type de sélection, en plus de la taille des molécules, quant aux substances pouvant les traverser. En effet, les molécules anioniques seraient repoussées électriquement, empêchant ainsi leur passage ; tandis que le passage de molécules cationiques serait favorisé.

La **protéine associée aux vésicules du plasmalemma 1 (PV-1)**, aussi connue sous le nom de MECA-32 et PAL-E, est le seul composant connu des diaphragmes des fenestrations (Figure 6). PV-1 est une glycoprotéine N-glycosylée de 60 kDa, formant des homodimères. Elle possède 4 sites de N-glycosylation et les N-glycanes représentent 15 % de sa masse (Stan, 2007). De nombreuses études ont montré des corrélations entre son expression et la présence de fenestrations, que ce soit au cours du développement, à l'âge adulte ou chez des animaux génétiquement modifiés: PV-1 est donc considéré comme un marqueur des endothéliums fenêtrés. Il est nécessaire et suffisant pour la biogenèse des fenestrations : la formation *de novo* de fenestrations est associée à une expression *de novo* de PV-1 (Stan et al., 2004). À l'inverse, la répression de PV-1 par des siRNA empêche la formation de fenestrations (Ioannidou et al., 2006; Stan et al., 2004). Plus précisément, PV-1 est localisée au niveau du diaphragme de la fenestration et constitue les fibrilles le formant (Figure 6) : l'analyse de sa séquence d'AA suggère que l'association des domaines C-terminaux formerait la maille dense centrale et stabiliserait la fenestration. De plus, le diaphragme pourrait être stabilisé par d'autres protéines cytoplasmiques localisées sur le bord de la fenestration et connectées au cytosquelette (Stan, 2007). Enfin, le VEGF, facteur de croissance connu pour induire des fenestrations au niveau des cellules endothéliales, induit une augmentation de l'expression de PV-1 (ou MECA-32) *in vitro* et *in vivo* via son récepteur VEGF-R2 (Strickland et al., 2005).

B) Perméabilité des vaisseaux

Ces caractéristiques structurales des vaisseaux de l'EM permettent une communication sang/parenchyme relativement libre. En effet, l'accès de petites molécules vers le parenchyme cérébral est 200 à 700 fois plus rapide que dans les zones où la BHE est présente (Gross et al., 1987). Ceci indique que les vaisseaux fenêtrés de l'EM sont hautement perméables, conférant à l'EM un rôle de « fenêtre sur le cerveau » (Gross and Weindl, 1987). Cependant, des critères de restriction existent tout de même concernant la taille et la charge des molécules. En effet, des traceurs, tels que le bleu Evans ou la peroxydase administrés en périphérie, traversent les fenestrations et entrent aisément dans le parenchyme de l'EM (Brightman et al., 1975; Morita and Miyata, 2013; Mullier et al., 2010), tandis que la ferritine ne peut pas les traverser.

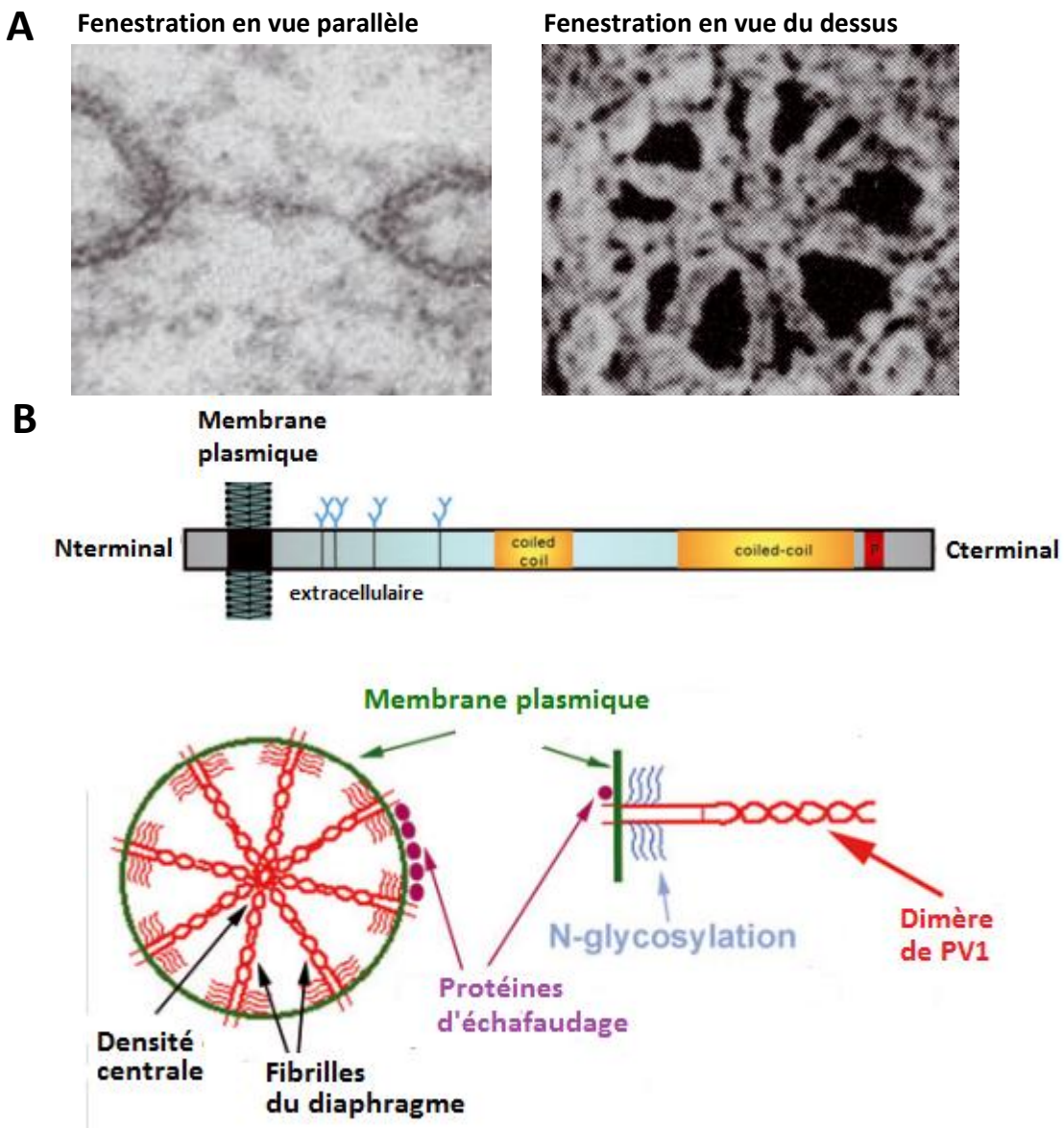


Figure 6 : Organisation d'une fenestration. A. Fenestration observée en microscopie électronique en vue parallèle et en vue du dessus. Sur ces deux photographies, on observe au niveau de la fenestration un diaphragme contenant une « densité » en son centre. B. Dessin localisant la protéine PV1 au sein de la fenestration. PV1 est une glycoprotéine transmembranaire qui forme les fibrilles du diaphragme de la fenestration. Les extrémités C-terminale extracellulaire de chaque protéine interagissent les uns avec les autres pour former la densité centrale de la fenestration (Tiré de Stan 1999).

3.1.3 Les vaisseaux de la barrière hémato-encéphalique du noyau arqué

Au niveau du NA, les vaisseaux sont essentiellement des vaisseaux de la BHE. Comme décrit dans le chapitre précédent, ces vaisseaux sont le siège de la barrière sang/cerveau assurant l'homéostasie cérébrale. De ce fait, les colorants injectés en périphérie n'entrent pas dans le parenchyme cérébral et restent cloîtrés dans les vaisseaux de la BHE (Mullier et al., 2010). Cependant, quelques particularités existent au niveau du NA ventromédian, la région adjacente à l'EM : en effet, les vaisseaux pourraient être plus permissifs à ce niveau. Une étude

de Norsted *et coll.* (2008) mentionne que les vaisseaux du NA ventromédian ne possèdent pas de BHE comparable à celle du reste de l'hypothalamus : en effet, des marquages immunohistochimiques indiquent que certains marqueurs de la BHE comme l'EBA (de l'anglais endothelial barrier antigen) ou le récepteur à la transferrine n'y sont pas exprimés. De plus, d'autres études ont même montré que certains vaisseaux du NA possèdent des fenestrations (Ciofi, 2011a).

3.2 L'épendyme de la région tubérale de l'hypothalamus

Les épendymes formant la paroi des ventricules cérébraux et du canal central de la corde spinale sont très hétérogènes structurellement et fonctionnellement. Les différences entre les épendymes reposent sur plusieurs critères : la forme des cellules, la présence ou non de cils et la présence ou non de JS efficaces. Au niveau du 3^{ème} ventricule, dans la région tubérale de l'hypothalamus, l'épendyme formant la partie dorsale du 3^{ème} ventricule diffère fortement de l'épendyme voisin du NA ou de l'EM (Figure 7).

3.2.1 L'épendyme de la partie dorsale du 3^{ème} ventricule

Classiquement, les cellules épendymaires formant les ventricules latéraux et la majorité du 3^{ème} et 4^{ème} ventricule sont des cellules cubiques. C'est notamment le cas dans le haut du 3^{ème} ventricule. Ces cellules épendymaires possèdent des cils battant en coordination pour faciliter la circulation du LCR dans la cavité ventriculaire (Figure 7). Les cadhérines, glycoprotéines de surface cellulaire, interviennent dans ce processus car des mutations des gènes *Celsr2* et *Celsr3* provoquent une altération de la circulation du LCR et une hydrocéphalie (Tissir et al., 2010). Ces cellules épendymaires contiennent un noyau imposant occupant tout le cytoplasme de la cellule (Figure 7). Enfin, ces cellules épendymaires expriment des protéines de JS, notamment l'occludine, ZO1 et la claudine 5 (Mullier et al., 2010), qui ne permettent cependant pas de créer un épendyme étanche (Brightman et al., 1975 ; Ghersi-Egea et al., 1996). En effet, de larges molécules, comme la peroxydase, injectées dans le LCR diffusent par la voie paracellulaire et atteignent facilement le parenchyme cérébral (Brightman et al., 1975).

3.2.2 L'épendyme de la partie ventrale du 3^{ème} ventricule

Après une zone de transition au niveau du VMH (Figure 7), où l'on trouve encore quelques cellules épendymaires cubiques, l'épendyme du NA et de l'EM diffère totalement de celui du haut du 3^{ème} ventricule.

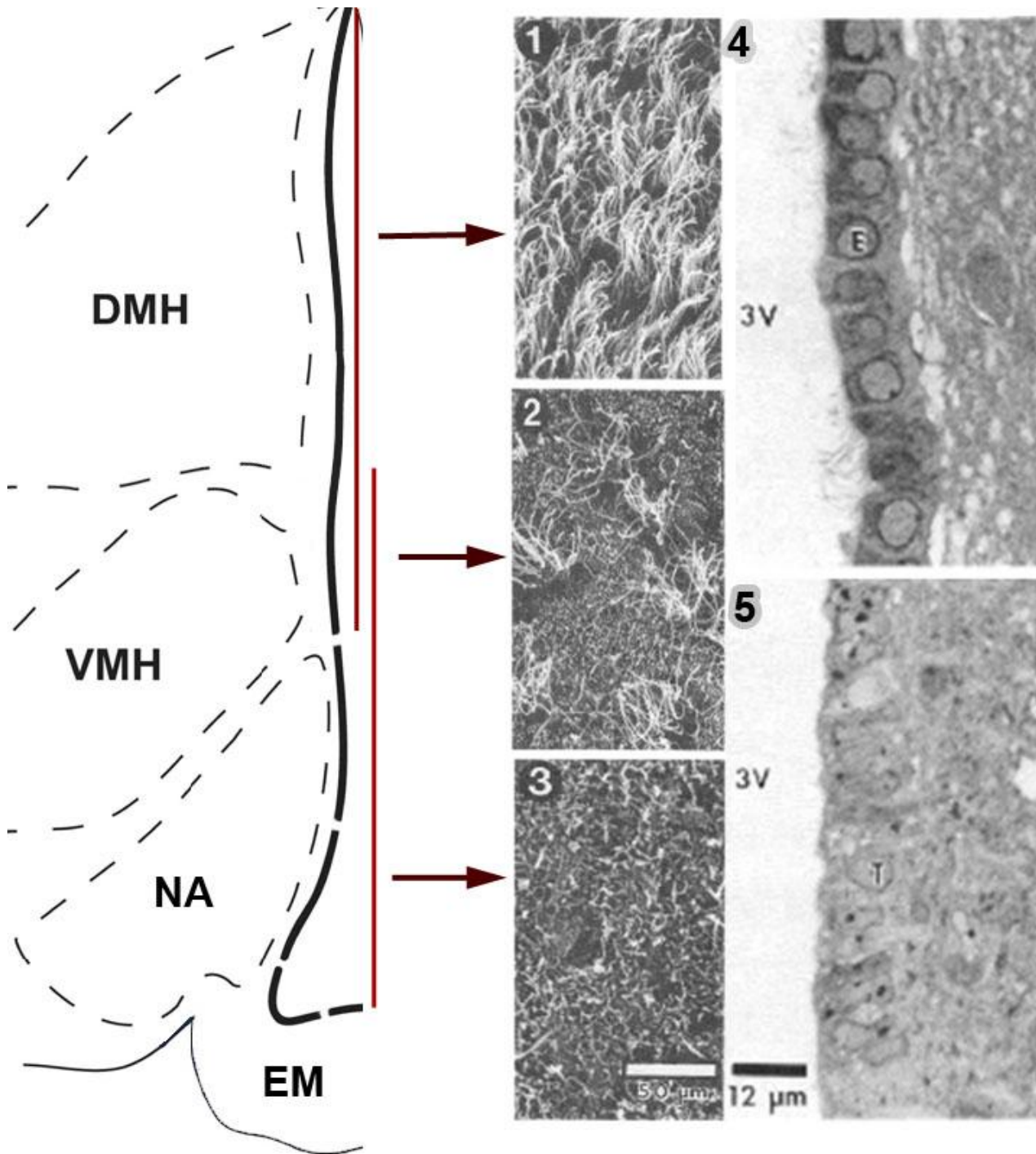


Figure 7 : Les différents types d'épendyme au niveau du 3^{ème} ventricule de la région tubérale de l'hypothalamus. Les épendymes formant la paroi du 3^{ème} ventricule, dans la région tubérale de l'hypothalamus, diffèrent dans la partie ventrale voisine du noyau arqué (NA) ou de l'éminence médiane (EM). Au niveau de la partie dorsale du ventricule (1 et 4), les cellules épendymaires sont cubiques (4), et possèdent des cils (1 et 4). En revanche, au niveau ventral (3 et 5), les cellules épendymaires sont allongées (5), et ne possèdent pas de cils (3 et 5). Au contraire, l'épendyme est caractérisé par la présence de nombreuses microvillosités (3). Entre ces deux régions, il existe une zone de transition (2) où les deux types cellulaires sont présents. EM, éminence médiane ; NA, noyau arqué ; VMH, noyau ventromédian ; DMH, noyau dorsomédian ; 3V, 3^{ème} ventricule.

A) L'épendyme du NA

L'épendyme du NA est très particulier. Le pôle apical des cellules épendymaires possède très peu de cils (Brawer, 1972). Au contraire, il est caractérisé par la présence de nombreuses protrusions bulbaires et des microvillosités de diamètre comparable mais de forme et longueur différentes : certaines de ces microvillosités fusionnent et englobent une goutte de LCR, suggérant des phénomènes pinocytiques. Les corps cellulaires possèdent un noyau ovale contenant un nucléole, un réticulum endoplasmique, un appareil de Golgi associé à la membrane plasmique, quelques ribosomes libres et de petites mitochondries. Les pôles apico-latéraux possèdent de nombreuses interdigitations et des complexes jonctionnels : ces jonctions sont principalement des jonctions adhérentes d'après les études de Brawer (1972) et Farquhar et Palade (1963), tandis que les JS seraient absentes. En effet, Mullier *et coll.* ont montré une organisation diffuse des protéines de JS et une plus grande perméabilité de l'épendyme du NA (2010).

B) L'épendyme de l'EM

L'épendyme de l'EM est lui aussi très particulier. A la surface apicale des cellules épendymaires, des microvillosités, des cavéoles, et des protrusions cellulaires ont été observées (Nakai et al., 1977). Ces structures augmentent la surface d'échange avec le LCR et suggèrent des phénomènes pinocytiques ou de transcytose. De plus, ces cellules épendymaires possèdent également et occasionnellement un unique cil excentré, issu du cil primaire (Scott and Sladek, 1981). Leur corps cellulaire est composé d'un noyau ovale, de nombreuses vacuoles et vésicules, un Golgi et des mitochondries. Au niveau apico-latéral, des complexes de JS associés au feuillet protoplasmique P sont présents, caractéristiques des barrières à haute imperméabilité. En effet, des injections de colorant en périphérie ou en icv ont prouvé que l'épendyme de l'EM était très étanche (Brightman et al., 1975 ; Mullier et al., 2010). Enfin, des jonctions GAP ont aussi été observées suggérant des communications cytoplasmiques entre cellules épendymaires voisines (Hatton and Ellisman, 1982; Jarvis and Andrew, 1988; Nakai et al., 1977).

*Ainsi, les épendymes de l'EM et du NA possèdent des propriétés spécifiques qui diffèrent de celles des cellules épendymaires formant la paroi du système ventriculaire. Ces différences viennent du fait qu'une population de cellules épendymaires hautement spécialisées forment la paroi ventriculaire au niveau de l'EM et du NA : il s'agit des **tanycytes**.*

3.3 Des cellules épendymaires spécialisées, les tanocytes

En 1954, Horstmann a décrit pour la première fois que les cellules épendymaires formant le plancher du 3^{ème} ventricule étaient des cellules allongées bipolaires. Le pôle apical borde le mur ventriculaire tandis qu'un long et unique prolongement est envoyé dans le parenchyme cérébral. À cause de leur forme, Horstmann a appelé ces cellules "tanocytes", du grec *tanus* qui signifie "allongé".

3.3.1 Le tanocyte : une cellule bipolaire

La principale caractéristique structurale des tanocytes, les distinguant des cellules épendymaires dites « typiques », est leur processus basal. Celui-ci est composé de microtubules et de filaments intermédiaires (Rodríguez et al., 2005). Dans l'EM, ce long prolongement est envoyé dans la zone externe au contact des vaisseaux fenêtrés de l'EM. En effet, l'injection iv de fluorogold montre son internalisation dans les tanocytes de l'EM (Faouzi et al., 2007; Merchenthaler, 1991), indiquant leur communication avec la circulation sanguine. Ainsi, par cette organisation anatomique particulière, les tanocytes de l'EM assurent un « pont » entre le LCR et le sang. Dans le NA, le prolongement tanocytaire est envoyé dans le parenchyme cérébral au contact des vaisseaux de la BHE. Les pieds tanocytaires les entourent et remplacent ainsi les pieds astrocytaires minoritaires autour des vaisseaux du NA. Certains auteurs suggèrent également l'existence de contacts avec les neurones du NA et des autres noyaux hypothalamiques (Coppola et al., 2007; Rodríguez et al., 1979). Ces pieds tanocytaires contiennent de nombreuses vésicules, granules et autres gouttelettes lipidiques suggérant une sécrétion épendymale ou une endocytose de substances venant de la circulation sanguine (Brawer, 1972). Enfin, la forme bipolaire des tanocytes et leur localisation le long du ventricule rappellent fortement les cellules de la glie radiaire. En effet, de nombreux marqueurs de la glie radiaire sont exprimés dans les tanocytes (Rodríguez et al., 2005). De plus, les tanocytes possèdent, comme les cellules de la glie radiaire, des propriétés de prolifération (Lee et al., 2012; Pérez-Martín et al., 2010; Xu et al., 2005a). Cependant, les tanocytes sont des cellules à distinguer de la glie radiaire. Chez le rat, ils se différencient pendant les 2 derniers jours de la gestation et les premiers jours postnataux, et perdurent à l'âge adulte (Altman and Bayer, 1978).

3.3.2 Les tanocytes : une population hétérogène

Les tanocytes ne forment pas une population homogène (Figure 8). En effet, selon leur localisation le long du 3^{ème} ventricule et leurs propriétés structurales et fonctionnelles, les tanocytes ont été divisés en 4 sous-familles chez le rat (Akmayev and Fidelina, 1976; Rodríguez

et al., 1979, 2005) : les tanocytes $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, et $\beta 2$. Les **tanocytes $\alpha 1$** forment la paroi du 3^{ème} ventricule au niveau du VMH et de la partie postéro-ventrale du DMH. Ils émettent leur prolongement dans ces deux noyaux hypothalamiques. Les **tanocytes $\alpha 2$** forment la paroi du 3^{ème} ventricule au niveau dorsal du NA et émettent leur prolongement dans ce noyau avec une direction latéro-ventrale. Quelques prolongements des tanocytes $\alpha 2$ finissent leur course au contact de la face externe du cerveau, latéralement à l'EM. Les tanocytes α entrent notamment en contact avec les vaisseaux de la BHE (Mullier et al., 2010) ou les neurones des noyaux hypothalamiques (Coppola et al., 2007). Les **tanocytes $\beta 1$** forment la paroi du 3^{ème} ventricule au niveau ventral du noyau NA et de l'évagination ventriculaire latérale. Ils émettent leur prolongement dans la région latérale externe de l'EM où ils établissent des contacts avec les fibres des neurones à gonadolibérine (GnRH) et l'espace périvasculaire des vaisseaux fenêtrés du système porte hypothalamo-hypophysaire. Les **tanocytes $\beta 2$** forment le plancher du 3^{ème} ventricule au niveau de l'EM et émettent leur prolongement au contact de l'espace périvasculaire des vaisseaux fenêtrés du système porte hypothalamo-hypophysaire. Les tanocytes β ont donc un accès direct aux molécules circulantes. Outre ces différences morphologiques, les populations tanocytaires possèdent également des différences fonctionnelles et d'expression génique (voir pour revue Rodríguez et al., 2005).

3.3.3 Les tanocytes : une barrière épendymaire

Plusieurs études ont montré que les JS, absentes au niveau des vaisseaux fenêtrés de l'EM, étaient en fait délocalisées au niveau des tanocytes. La présence de JS a été suggérée pour la première fois par Brightman en 1969, puis dans les études de Wagner et Pilgrim (1974) et Broadwell (1987). Mais elle n'a réellement été montrée qu'en 1992 par Smith *et coll.* et en 1994 par Petrov *et coll.*. Dans ces études, les auteurs ont montré que ZO-1 était exprimé au niveau des tanocytes de l'EM avec une intensité d'expression beaucoup plus importante que celle des cellules épendymaires « typiques ». De plus, les complexes de JS forment des ceintures encerclant le corps cellulaire de chaque cellule, ressemblant ainsi à des «nids d'abeille», ce qui a pour conséquence de bloquer la voie paracellulaire. Ces observations ont été validées et complétées par Mullier *et coll.* en 2010 (Figure 8). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'en plus de ZO1, les tanocytes de l'EM exprimaient l'occludine et la claudine 5, d'autres protéines de JS notamment retrouvées au niveau de la BHE et des PC. Les protéines de JS observées avaient toutes une configuration en «nid d'abeille». De plus, les tanocytes de l'EM ont la particularité d'exprimer la claudine 1, protéine retrouvée notamment dans les PC, mais absente au niveau de la BHE. En revanche, au niveau du NA, les tanocytes ne possèdent pas de JS fonctionnelles : ils expriment des protéines de JS, notamment l'occludine, ZO1 et la

claudine 5, mais leur organisation diffuse rend le mur ventriculaire perméable (Mullier et al., 2010). Des observations en microscopie électronique réalisées par Brawer (1972) ou Farquhar/Palade (1963) avaient aussi rapportées l'absence de JS au niveau de l'épendyme du NA.

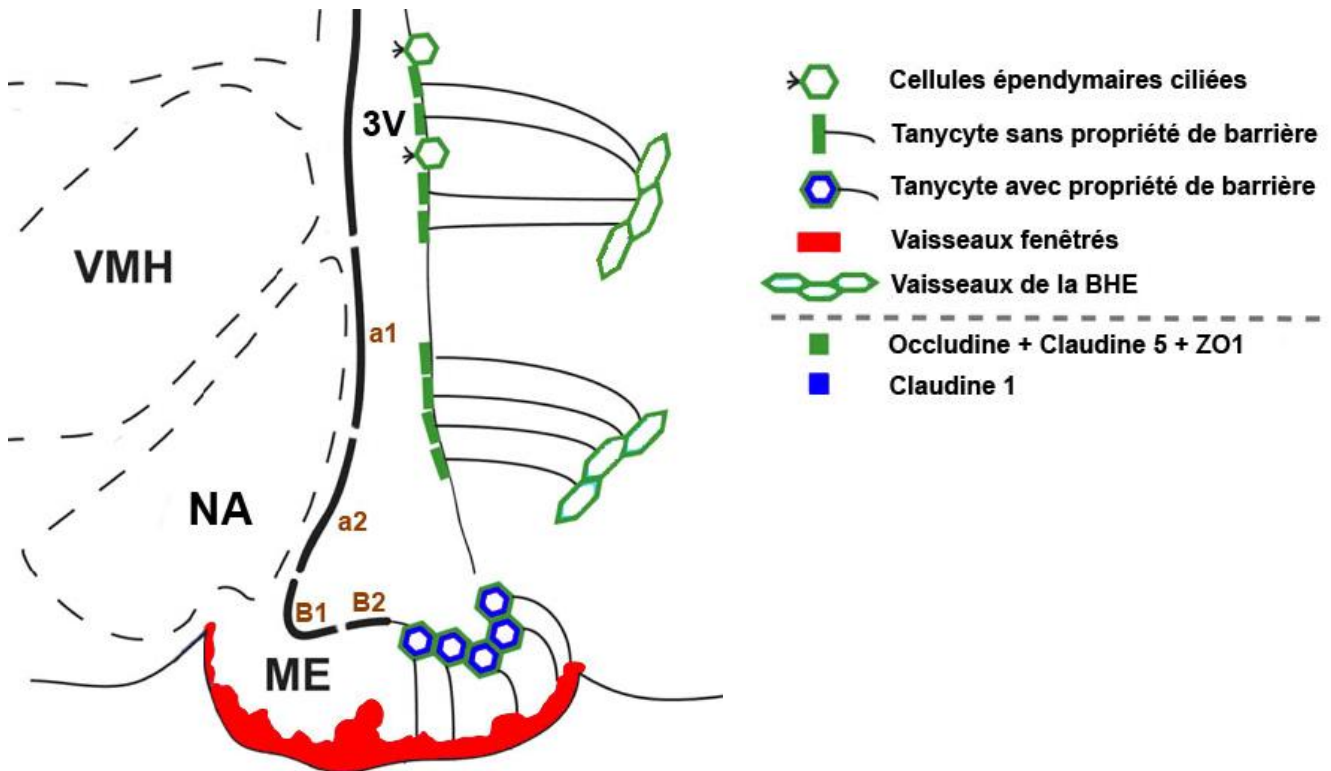


Figure 8 : Schéma représentant l'organisation de l'interface sang/cerveau au niveau de l'hypothalamus médiobasal. Cette région cérébrale est particulière car elle intègre plusieurs types d'interface sang/cerveau. En effet, on y trouve tout d'abord des vaisseaux de la barrière hémato-encéphalique (BHE) dans le noyau arqué (NA) et des vaisseaux fenêtrés dans l'éminence médiane (EM). Les tanycytes, cellules épendymaires bordant le plancher du 3^{ème} ventricule, appartiennent également à cette interface sang/cerveau. Les tanycytes β (B1 et B2) bordent l'éminence médiane, contactent les vaisseaux fenêtrés et possèdent des propriétés de barrière afin d'assurer l'homéostasie cérébrale. Les tanycytes α (a1 et a2) bordent le NA et le VMH et contactent des vaisseaux de la BHE : l'homéostasie cérébrale étant assurée par ces vaisseaux, les tanycytes α n'expriment donc pas de propriétés de barrière. EM, éminence médiane ; NA, noyau arqué ; VMH, noyau ventromédian ; 3V, 3^{ème} ventricule ; BHE, barrière hémato-encéphalique ; ZO1, zonula occludens 1 (tiré de Mullier et al., 2010).

Les tanycytes possédant des JS organisées en nid d'abeille correspondent aux tanycytes β . Ces derniers sont les tanycytes contactant les vaisseaux fenêtrés de l'EM via leur prolongement. A l'inverse, les tanycytes du NA possédant une organisation diffuse des protéines de JS correspondent aux tanycytes α et contactent les vaisseaux de la BHE (Mullier et al., 2010). Les auteurs ont donc mis en évidence que, dans tous les cas, une barrière sang/cerveau est présente afin d'assurer l'homéostasie cérébrale. Ainsi, au niveau du NA, l'homéostasie cérébrale étant assurée par les vaisseaux de la BHE, les tanycytes ne forment

pas de barrière. En revanche, dans l'EM, la barrière étant absente au niveau des vaisseaux fenêtrés, elle est de ce fait délocalisée au niveau des tanocytes qui forment une « **barrière tanocytaire** ».

Les tanocytes sont donc des cellules bipolaires hautement spécialisées, réalisant un « pont » entre le LCR et le compartiment sanguin. Au niveau de l'EM, les tanocytes β contactent les vaisseaux fenêtrés de la zone externe et sont le siège de la barrière tanocytaire. Cela suggère que, dans cette région, ces cellules épendymaires participeraient à la régulation des échanges sang/cerveau.

3.4 Les tanocytes : une interface sang/cerveau

Bien que le concept de neurosécrétion soit bien établi au niveau de l'EM, une entrée des molécules sanguines dans le cerveau y serait aussi envisageable. Cet échange du sang vers le cerveau a d'ailleurs été suggéré par plusieurs études (Mullier et al., 2010 ; Ciofi et al., 2009) : ainsi, l'entrée de molécules sanguines issues de l'hypophyse voisine ou des organes périphériques plus éloignés pourrait se réaliser via les vaisseaux fenêtrés de l'EM et modifier l'activité neuronale hypothalamique. Cependant, bien que l'EM soit initialement considérée comme une fenêtre sur le cerveau de par la présence de vaisseaux fenêtrés dans sa zone externe, elle possède tout de même une barrière épendymaire : la « **barrière tanocytaire** ».

3.4.1 La barrière tanocytaire : régulation de la voie paracellulaire

Les tanocytes bordant le plancher du 3^{ème} ventricule, et contactant les vaisseaux fenêtrés de l'EM, de part la présence de JS, forment une barrière bloquant la diffusion par voie paracellulaire. Diverses publications se sont intéressées à la diffusion dans le parenchyme de l'EM et du NA de colorants injectés en périphérie ou au niveau central. Ces colorants, injectés dans la circulation sanguine, entrent aisément dans l'EM étant donnée la présence de vaisseaux fenêtrés (Brightman et al., 1975 ; Morita and Miyata, 2013 ; Mullier et al., 2010). Cependant, ils y restent cloîtrés : en effet, si on injecte de la peroxydase dans le sang, elle pénètre dans l'EM mais n'atteint pas les régions voisines (Brightman et al., 1975 ; Krisch and Leonhardt, 1978). A l'inverse, si la peroxydase est injectée dans le LCR, elle diffuse dans l'hypothalamus, mais n'entre pas dans l'EM. De la même manière, si le bleu Evans est injecté dans le sang, il reste cloîtré dans l'EM; tandis que s'il est injecté dans le LCR, il ne diffuse pas dans l'EM (Mullier et al., 2010). Cela suggère une barrière de diffusion très efficace assurant l'étanchéité du plancher du 3^{ème} ventricule. Les colorants sont en effet stoppés par les JS : des études en microscopie électronique de Nakai et Naito en 1975 ont montré que la peroxydase injectée en périphérie, pouvait diffuser dans le parenchyme de l'EM mais était arrêtée au

niveau des JS tanycytaires. Par conséquent, le liquide interstitiel de l'EM possède une composition plus proche de celle de la circulation sanguine que de celle du LCR, de par la présence de vaisseaux fenêtrés dans sa zone externe et à cause de la barrière tanycytaire.

3.4.2 Le transport tanycytaire : régulation de la voie transcellulaire

Etant donné que la voie paracellulaire est bloquée, la seule voie possible pour traverser la barrière tanycytaire est la voie transcellulaire. Les tanycytes β de l'EM connectent deux compartiments, à savoir le LCR et l'espace périvasculaire des vaisseaux fenêtrés de l'EM. De plus, les tanycytes β apparaissent comme des cellules bipolaires distinctement polarisées grâce à la présence de JS efficaces à leur pôle apical. Enfin, les tanycytes possèdent de nombreuses vésicules/cavéoles au niveau de leur pôle apical et basal. Ces caractéristiques évoquent l'existence de transports transcellulaires. Deux types de transports transcellulaires ont en effet été suggérés au niveau de l'EM : la pinocytose et l'endocytose médiée par les récepteurs.

A) La pinocytose

La **pinocytose** consiste en l'absorption de gouttelettes de liquide extracellulaire sous forme de minuscules vésicules. Tout soluté présent dans le liquide étant englobé sans discrimination, la pinocytose ne constitue pas une forme de transport spécifique. Nakai a montré en 1977 que l'épendyme de l'EM de grenouille présentait environ 20 ouvertures de vésicules sur la membrane par μm^2 , suggérant une haute activité pinocytique. De plus, Brawer a observé que les microvillosités des tanycytes $\beta 1$ fusionnaient et englobaient des gouttes de LCR. L'utilisation de traceurs et de substances marquées biologiquement actives, injectés dans le 3^{ème} ventricule ou dans le sang, indiquent que les tanycytes β ont la capacité d'absorber les substances présentes dans le LCR ou dans le sang respectivement (Bjelke and Fuxe, 1993; Silverman and Knigge, 1972; Silverman et al., 1972). Par exemple, la ferritine administrée dans le LCR peut être observée dans des vésicules pinocytiques dans le cytoplasme apical et latéral des tanycytes $\beta 2$ (Benkovic and Connor, 1993; Ugrumov and Mitskevich, 1980). De même, la peroxydase injectée dans le ventricule ou l'espace sous arachnoïdien est intégrée par les tanycytes (Nakai, 1971; Nakai and Naito, 1975 ; Wagner and Pilgrim, 1974).

B) L'endocytose médiée par récepteur

L'**endocytose médiée par récepteur** est une endocytose sélective grâce à la présence de récepteurs membranaires au niveau des vésicules d'endocytose. Ce type de transport se réalise via des vésicules recouvertes de clathrine ou de cavéoline, et constitue le moyen de transport clé au niveau de la BHE.

La clathrine et la cavéoline 1 sont exprimées par les tanycytes mais leur distribution diverge selon le type de tanycytes. En effet, dans les tanycytes $\alpha 1$ et $\alpha 2$, la clathrine se situe à la fois au pôle apical et basal. Dans les tanycytes $\beta 1$, elle se situe essentiellement au niveau du corps cellulaire, sur les prolongements mais pas au niveau des pieds tanycytaires. Dans les tanycytes $\beta 2$, elle est retrouvée au niveau du pôle apical et le processus proximal mais pas (ou peu) au niveau des pieds tanycytaires (Peruzzo et al., 2004). Les vésicules recouvertes de clathrine sont chargées négativement ce qui permet aux molécules cationiques, comme de la ferritine (Ugrumov and Mitskevich, 1980) par exemple, d'y être également absorbées. Concernant la cavéoline 1, elle est abondante dans les tanycytes β mais est absente dans les tanycytes α (Peruzzo et al., 2004). Dans les tanycytes $\beta 2$, elle est présente au niveau basal et apical ; tandis que dans les tanycytes $\beta 1$, elle ne se situe qu'au niveau basal (Peruzzo et al., 2004). Cette distribution différentielle suggère des directions d'endocytose différentes et spécifiques selon les tanycytes. Par exemple, les tanycytes β sont capables d'internaliser la lectine par leur pôle apical après une injection ventriculaire, tandis qu'ils ne le peuvent pas par leur pied après une injection dans la grande citerne (Peruzzo et al., 2004). ARF6 (facteur de ribosylation de l'ADP 6) et Rab4, aussi impliqués dans les mécanismes d'endocytose, sont également retrouvés dans les tanycytes : ARF6 est détecté faiblement au niveau des membranes latérales des tanycytes $\alpha 1$, $\alpha 2$ and $\beta 1$, et Rab4 est fortement exprimé dans les tanycytes $\beta 2$ (Peruzzo et al., 2004).

La nature des substances endocytées via des récepteurs reste cependant assez vague. Les tanycytes possèdent de très nombreux récepteurs comme le récepteur aux œstrogènes (Langub and Watson, 1992), à la dopamine (Bjelke and Fuxe, 1993), au GABA, à la prolactine, aux opioïdes, aux FGFs, au TGF α , au glutamate, à la leptine, à la mélatonine et à la ghréline (unpublished data). Toutes ces substances pourraient ainsi être endocytées par les tanycytes. Un cas particulier, qui mérite d'être développé et qui a fait le sujet de plusieurs études, est le cas du facteur de croissance apparenté à l'insuline, l'IGF-1. Les tanycytes $\beta 1$ possèdent le récepteur à l'IGF-1 (Cardona-Gómez et al., 2000), et sont immunopositifs pour IGF-1 (Dueñas et al., 1994; García-Segura et al., 1991). Cependant ils ne possèdent pas l'ARN messager de l'IGF-1 (Dueñas et al., 1994), suggérant une endocytose de l'IGF-1 par les tanycytes. Quand IGF-1 est injecté dans le ventricule, il est internalisé par les tanycytes (Fernandez-Galaz et al., 1996) L'endocytose d'autres substances, telle la dopamine, a également été observée (Scott et al., 1974).

Cependant, si ces substances sont détectées dans les tanycytes, l'évidence qu'elles passent du sang vers le LCR, ou inversement, est aujourd'hui encore sujet à débats et controverses (Broadwell and Brightman, 1976; Flament-Durand and Brion, 1985; Pilgrim, 1978;

Wagner and Pilgrim, 1974). En effet, les substances absorbées pourraient être envoyées vers les endosomes en vue de leur dégradation. Cependant, quelques exemples suggèrent des phénomènes de transcytose. Par exemple, tous les tanocytes sont capables d'internaliser la lectine WGA 1h après l'injection dans le système ventriculaire. Les tanocytes $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\beta 2$ la transportent ensuite jusqu'à leur pôle basal tandis que les tanocytes $\alpha 2$ ne le peuvent pas (Peruzzo et al., 2004). Après 4h, les pieds tanocytaires β sont marqués, suggérant un transport du LCR vers le sang. Concernant les molécules régulant la prise alimentaire, l'internalisation et le transport d'une leptine fluorescente (Balland et al, soumis dans Cell Metabolism) et d'une ghréline fluorescente (données personnelles) injectées dans le sang, ont été observé au niveau des tanocytes β (Figure 9).

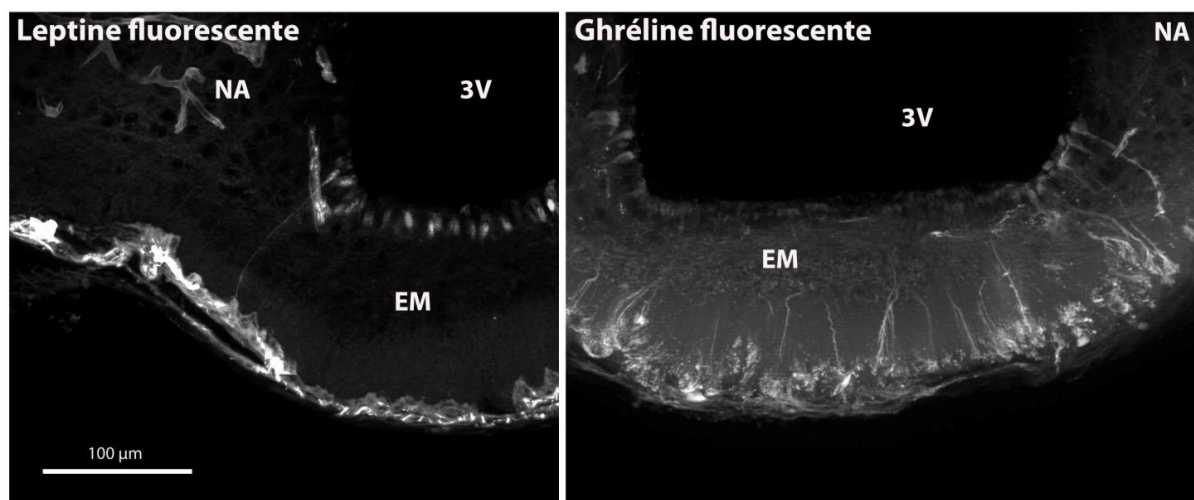


Figure 9 : Photographies montrant l'internalisation de la ghréline et de la leptine fluorescentes par les tanocytes de l'éminence médiane suite à leur injection dans le sang. Données du laboratoire. EM, éminence médiane ; NA, noyau arqué ; 3V, 3^{ème} ventricule.

Enfin, il existerait aussi une transcytose empruntant un chemin plus court : la ferritine (Ugrumov and Mitskevich, 1980) ou la peroxydase (Nakai and Naito, 1975) injectées dans le ventricule, sont retrouvées dans des vésicules tanocytaires qui viennent s'ouvrir latéralement dans l'espace intercellulaire sous les complexes de JS. Ces observations laissent penser qu'effectivement il y a passage d'un compartiment à l'autre mais la démonstration complète reste à faire.

3.4.3 Accès des molécules périphériques vers le NA

Pour atteindre le NA, de nombreux auteurs suggèrent que les signaux métaboliques périphériques contournent la BHE présente sur les vaisseaux du NA et entrent via l'EM. L'entrée dans le parenchyme de l'EM y est aisée grâce à la présence des vaisseaux fenêtrés. Les

molécules ayant passées les vaisseaux fenêtrés auront deux possibilités pour atteindre le NA : **1-** via les zones latérales de l'EM par simple diffusion ou **2-** via le LCR suite à un transport transcellulaire tanycytaire.

A) La diffusion de l'éminence médiane vers le noyau arqué

Les molécules périphériques ayant atteint le parenchyme de l'EM via ses vaisseaux fenêtrés, pourraient ensuite diffuser de l'EM vers le NA en passant par les zones latérales de l'EM. En effet, quelques études montrent que des colorants injectés dans le sang diffusent jusque dans le NA (Broadwell et al., 1983; Shaver et al., 1992). Cependant, d'autres auteurs stipulent qu'il existerait une barrière de diffusion entre l'EM et le NA, empêchant les molécules se trouvant dans l'EM d'atteindre le NA. En effet, si un colorant est injecté dans le sang, il entre dans l'EM mais ne pénètre pas dans le NA. De plus, quand un colorant est injecté dans le LCR, il entre dans le NA mais ne pénètre pas dans l'EM (Brightman et al., 1975; Mullier et al., 2010). Enfin, si un colorant est injecté directement dans le NA, il ne pénètre pas dans les régions voisines notamment dans l'EM (Réthelyi, 1984). Ces résultats suggèrent la présence d'une barrière de diffusion entre l'EM et le NA. Les prolongements des tanocytes $\beta 1$ pourraient jouer ce rôle de barrière : en effet, ces tanocytes bordent les invaginations latérales du 3^{ème} ventricule et envoient leur prolongement dans une direction basolatérale pour séparer l'EM du NA. Des JS entre des prolongements de tanocytes situés dans cette région ont d'ailleurs été observées par des études de cryofracture (Krisch and Leonhardt, 1978). Cependant, d'autres équipes ayant réalisé des études immunohistochimiques n'ont pas relevé la présence de JS au niveau des prolongements tanycytaires (Mullier et al., 2010; Petrov et al., 1994; Smith and Shine, 1992).

B) L'hypothèse du transport tanycytaire

Une autre hypothèse quant à l'accès des molécules périphériques vers le NA a été avancée par Mullier *et Coll.* (2010). Dans cette étude, les auteurs mettent en avant la différence d'organisation des protéines de JS le long du 3^{ème} ventricule : les tanocytes de l'EM possèdent des JS fonctionnelles et par conséquent sont polarisés et susceptibles de réaliser des transports transcellulaires ; tandis que les tanocytes du NA présentent des JS non organisées rendant l'épendyme perméable. Les molécules sanguines pourraient alors être transportées via les tanocytes de l'EM par la voie transcellulaire vers le LCR. Ensuite, elles atteindraient le NA par simple diffusion paracellulaire en passant entre les tanocytes non étanches à ce niveau.

3.5 Rôle des tanocytes dans le contrôle de la prise alimentaire

La position stratégique des tanocytes à l'interface entre le sang, le LCR et les noyaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire a incité de nombreux auteurs à suggérer que ces cellules jouaient un rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique. De nombreuses études récentes ont appuyé cette hypothèse.

3.5.1 Les tanocytes, des cellules glucosensibles

Le rôle des tanocytes dans le métabolisme glucidique a été suggéré dès les années 2000 dans des études montrant l'expression du transporteur GLUT-1 dans les cellules β 1 (Harik et al., 1990; Peruzzo et al., 2000). Des marquages immunohistochimiques réalisés dans une étude de Norsted montrent que GLUT1 est également exprimé par les tanocytes β 2 (2008). Il a alors été proposé que les tanocytes, à l'instar des astrocytes, pouvaient intégrer le glucose via GLUT1 et le métaboliser en lactate afin d'approvisionner les neurones du NA via les transporteurs MCT (de l'anglais monocarboxylate transporter) (Cortes-Campos et al., 2013). Par ailleurs, ce lactate pourrait également engendrer une réponse dans les neurones glucosensibles des noyaux hypothalamiques voisins (Lam et al., 2005; Song and Routh, 2005).

Les tanocytes expriment également le transporteur de glucose GLUT2 (García et al., 2003), la glucokinase, enzyme spécifique des tissus glucosensibles (Millán et al., 2010), ainsi que certaines sous-unités de canaux potassiques ATP-dépendants (García et al., 2003; Thomzig et al., 2001, 2005). Etant donné que tous ces éléments sont impliqués dans les mécanismes de détection du glucose par les cellules β des îlots pancréatiques (Guillam et al., 1997) et par les neurones glucosensibles (Kang et al., 2004), plusieurs auteurs ont alors suggéré que les tanocytes pourraient aussi être impliqués dans la détection centrale du glucose. Cette hypothèse a été vérifiée par la suite et plusieurs publications ont montré que des tanocytes pouvaient détecter le glucose. Suite à une application directe de glucose, les tanocytes α augmentent leur calcium intracellulaire et produisent de l'ATP (Dale, 2011; Frayling et al., 2011; Orellana et al., 2012). Les tanocytes pouvant, à l'instar des astrocytes, répondre à différents stimuli comme l'ATP, l'histamine ou l'acétylcholine, par des changements de calcium intracellulaire, l'ATP libéré va agir sur les tanocytes voisins via le récepteur P2Y pour propager le signal (Dale, 2011). La propagation du signal se réalise également via des jonctions GAP (Orellana et al., 2012). Outre le glucose, les tanocytes peuvent aussi répondre aux analogues non métabolisables du glucose comme le 2-desoxyglucose (2-DG) (Dale, 2011, Gotoh et al., 2008). Cependant, le modèle des cellules β pancréatiques ou des neurones GE ne peut être appliqué aux tanocytes. En effet, l'augmentation de calcium dans ces cellules est due à des canaux calciques voltage-dépendants, absents chez les tanocytes. De plus, les tanocytes

répondent aux analogues non métabolisables du glucose (alors que le métabolisme du glucose est nécessaire dans le premier modèle). Une hypothèse proposée par Bolborea *et coll.* (2013) quant au mécanisme de détection du glucose par les tanocytes est que le calcium intracellulaire augmenterait via les co-transporteurs glucose- Na^+ et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, à l'instar des cellules glucosensibles de l'aire hypothalamique latérale (González *et al.*, 2009a), ou via un récepteur membranaire (Ren *et al.*, 2009) (Figure 10).

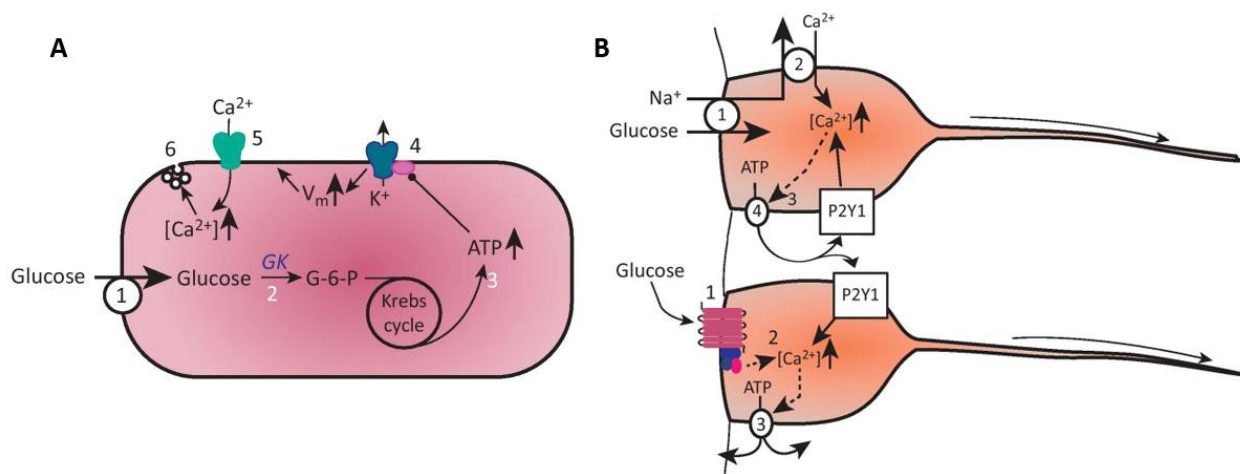


Figure 10 : Schéma représentant les mécanismes potentiels de détection du glucose par les tanocytes. (A) Détection du glucose dans la cellule β pancréatique. (B) Deux modèles de détection du glucose chez les tanocytes. Le premier modèle (B haut) utilise le co-transporteur glucose- Na^+ (1) et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (2), tandis que le second utilise un récepteur membranaire couplé aux protéines G (tiré de Bolborea *et al.*, 2013).

Les conséquences de cette détection du glucose sur la prise alimentaire ont été suggérées dans plusieurs études. En effet, l'hypoglycémie et l'analogue du glucose, le 2-DG, provoquent la phosphorylation de la β -adducine des tanocytes. Cette modification du cytosquelette dans les tanocytes est associée à une augmentation de la prise alimentaire (Gotoh *et al.*, 2008). De plus, une étude menée par Sanders *et coll.* a montré que l'injection d'alloxane, un inhibiteur de la glucokinase, dans le 3^{ème} ventricule détruit les tanocytes et engendre une perturbation du comportement alimentaire (2004).

3.5.2 Les tanocytes expriment le GPR50

Le GPR50 est un récepteur orphelin homologue aux récepteurs à la mélatonine (MT1 et MT2), mais ne liant pas la mélatonine. Il se dimérise à MT1 et MT2, affectant l'activité du premier mais pas du second (Levoye *et al.*, 2006). Il est exprimé dans l'hypothalamus et en particulier dans les tanocytes (Barrett *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 2008; Sidibe *et al.*, 2010). Le GPR50 est lié à l'homéostasie énergétique. En effet, il module les voies de signalisation de la leptine (Bechtold *et al.*, 2012) et des corticostéroïdes (Li *et al.*, 2011). De plus, les souris KO pour GPR50 ont un poids plus faible sous nourriture normale et sont résistantes aux nourritures

riches en graisse. Cette résistance s'explique par une dépense énergétique augmentée : en effet, elles mangent plus que les souris contrôles mais leur taux métabolique de base est plus élevé (Ivanova et al., 2008). A jeun, les souris KO présentent également des phases de torpeur avec des chutes de leur taux métabolique et de leur température corporelle. Ces phases de torpeur sont associées à une réponse atténuée à la leptine et la suppression de libération de l'hormone thyroïdienne (Bechtold et al., 2012). Ces effets seraient liés à la protéine TXNIP (Blouet et al., 2012) : en effet, cette protéine également exprimée par les tanocytes augmente lors des phases de torpeur (Ebling and Samms, 2013) ou chez les souris GPR50/- (Hand et al., 2013).

3.5.3 Les tanocytes et le système thyroïdien

Les hormones thyroïdiennes sont de puissantes régulatrices de la balance énergétique et du métabolisme lipidique. La déiodinase DIO1 à 3 convertit le précurseur de l'hormone thyroïdienne, la prohormone thyroxine T4, en hormone thyroïdienne active, la triiodothyronine T3. Dans le cerveau, DIO2 est la forme majoritaire et joue un rôle primordial dans la médiation des effets de l'hormone thyroïdienne sur le SNC (Lechan and Fekete, 2005). Au niveau de l'hypothalamus, cette enzyme est exprimée par les tanocytes : elle est observée au niveau du pôle apical mais aussi au niveau des pieds tanocytaires chez plusieurs espèces incluant les rongeurs (Guadaño-Ferraz et al., 1999; Tu et al., 1997), le poulet (Gereben et al., 2004) et l'homme (Lechan and Fekete, 2004). Les tanocytes expriment également un transporteur des hormones thyroïdiennes T4 et T3, le MCT8 (Herwig et al., 2009). Plusieurs auteurs ont alors émis l'hypothèse que les tanocytes, en contact avec la circulation sanguine et le LCR, pouvaient capturer la T4 de ces deux compartiments, et la transformer en T3 pour la distribuer ensuite aux noyaux hypothalamiques (Lechan and Fekete, 2007). Ainsi les tanocytes joueraient un rôle important dans le contrôle de l'axe thyroïdien (Fonseca et al., 2013) : en effet, la T3 libérée dans l'hypothalamus induit l'inhibition de la synthèse de TRH (Coppola et al., 2005). De plus, la T3 libérée au niveau du NA pourrait également jouer un rôle dans le contrôle de la balance énergétique en augmentant la prise alimentaire (Coppola et al., 2007; Ishii et al., 2008; Murphy and Ebling, 2011). Enfin, les tanocytes synthétisent la pyroglutamyl peptidase 2 (PPII), une métallopeptidase qui inactive la TRH, afin de limiter sa sécrétion dans le sang porte (Sánchez et al., 2009).

3.5.4 Les tanocytes, des progéniteurs au service du contrôle de la prise alimentaire

Morphologiquement, les tanocytes ressemblent aux cellules de la glie radiaire, connues en tant que progéniteurs des neurones qui constitueront les noyaux hypothalamiques. L'idée que l'épendyme de l'EM pourrait être une niche neurogène remonte à une dizaine d'années

mais ce n'est que récemment que des études ont associé cette compétence proliférative des tanycytes à la régulation de la prise alimentaire.

L'incorporation de BrDu dans les cellules en prolifération a permis l'étude de la prolifération cellulaire dans l'hypothalamus : celle-ci y est importante même à l'âge adulte (Kokoeva et al., 2005). Les neurones possédant très peu de capacité proliférative, cette prolifération cellulaire suggère donc l'existence d'une niche neurogène. Des études ont montré qu'au niveau de l'épendyme du 3^{ème} ventricule, les tanycytes possédaient des capacités prolifératives (Lee et al., 2012; Pérez-Martín et al., 2010; Xu et al., 2005b). En effet, les tanycytes, notamment les β , expriment des marqueurs de cellules souches comme le FGF10, le BLBP, le Musashi ou encore Sox2 (Haan et al., 2013). De nombreuses publications ont montré que les tanycytes possèdent les facteurs de croissance, leurs récepteurs, et les signalisations intracellulaires nécessaires à la prolifération cellulaire. Le bFGF (Xu et al., 2005b), l'IGF1 (Lee et al., 2012; Pérez-Martín et al., 2010), la doublecortine-like (Saaltink et al., 2012) et le CNTF (Kokoeva et al., 2005) sont connus pour induire la prolifération, tandis que l'acide rétinoïque (Shearer et al., 2012) est connu pour l'inhiber. Or, les tanycytes expriment le CNTF (Severi et al., 2012), la doublecortin like (Saaltink et al., 2012), et l'enzyme RALDH capable de synthétiser l'acide rétinoïque (Shearer 2012). Ils expriment également les récepteurs au CNTF (Severi et al., 2012), à l'IGF1 (Cardona-Gómez et al., 2000), et au FGF (Xu et al., 2005b). La prolifération, notamment des cellules radiaires, est aussi dépendante de la signalisation calcique (Weissman et al., 2004) : or, les tanycytes sont capables de répondre à différents stimuli comme l'ATP en induisant des vagues calciques (Dale, 2011), ce qui pourrait alors intervenir dans leur capacité proliférative. Enfin, ces cellules souches du 3^{ème} ventricule sont capables de donner naissance *in vitro* et *in vivo* à des neurones sous l'influence du FGF (Robins et al., 2013) ou à des cellules gliales (Kokoeva et al., 2005).

Le suivi des cellules générées indique qu'elles migrent dans le parenchyme hypothalamique et s'intègrent, en formant des synapses, aux réseaux neuronaux déjà existants (Xu et al., 2005b). Cette prolifération cellulaire au niveau des tanycytes a été associée à la régulation de la prise alimentaire. En effet, certains neurones formés au niveau du ventricule s'intègrent dans les réseaux régulant la prise alimentaire et expriment l'orexine A (Xu et al., 2005b), le NPY ou le POMC (Haan et al., 2013, Kokoeva et al., 2005). De plus, ces neurones néoformés sont capables de répondre à la leptine par une activation pSTAT3 (Kokoeva et al., 2005). Enfin, une nutrition riche en graisse augmente également la capacité proliférative des tanycytes ; tandis que l'inhibition de la prolifération tanycytaire diminue la prise de poids et augmente la dépense énergétique (Lee et al., 2012).

3.6 L'EM : une interface hautement plastique

De nombreuses études ont montré que l'EM était une région très plastique. Selon les conditions physiologiques de l'animal, l'EM est le siège de modifications d'expression génique et de remaniements structuraux ayant un rôle physiologique.

3.6.1 Plasticité dans la fonction de reproduction

La littérature concernant la plasticité de l'EM dans le cas de la reproduction est la plus riche.

Tout d'abord, les tanycytes sont sensibles aux hormones sexuelles. En effet, les tanycytes possèdent le récepteur α aux œstrogènes (Langub and Watson, 1992), et sont donc sensibles à ces derniers. Par exemple, des différences morphologiques ont été observées au niveau des tanycytes du NA entre les mâles et les femelles (Akmaev and Fidelina, 1978). Le niveau de l'IGF-1 dans les tanycytes varie aussi selon le cycle oestral (Duenas, 1994), suggérant une absorption de l'IGF-1 sous influence des estrogènes.

De plus, une plasticité structurale a aussi été observée au cours du cycle œstral (Brawer et al., 1974; Garcia-Segura et al., 1994) et a été particulièrement étudiée par la suite. Les neurones à gonadolibérine (GnRH), localisés dans l'aire préoptique hypothalamique, projettent leur axone vers l'EM, plus particulièrement vers les vaisseaux fenêtrés de la zone externe latérale. Cependant, les terminaisons nerveuses sont rarement en contact avec les vaisseaux fenêtrés du système porte hypothalamo-hypophysaire. En effet, les terminaisons à GnRH sont généralement séparées des vaisseaux par des pieds tanycytaires appartenant aux tanycytes $\beta 1$ (Kozlowski and Coates, 1985). Cette organisation structurale varie au cours du cycle œstral. En effet, chez la ratte adulte en diestrus (quand la GnRH est faible), la plupart des terminaisons nerveuses sont séparées de l'espace péricapillaire par les pieds tanycytaires ce qui empêche la libération de la GnRH dans le sang porte. Au moment du pic pré-ovulatoire de GnRH, il se produit un remodellement morphologique dans la zone externe de l'EM permettant la formation de contacts neurovasculaires entre les neurones à GnRH et les capillaires fenêtrés du système porte (Prevot et al., 1999).

La dissection des mécanismes moléculaires impliqués dans le remodellement structural des tanycytes a montré l'implication des récepteurs à tyrosine kinase de la famille erbB. Ces récepteurs sont déjà connus dans la physiologie de la reproduction : ils interviennent dans le contrôle de l'activité des neurones à GnRH par les astrocytes (voir pour revue Ojeda et al., 2003). Les tanycytes expriment *in vivo* les récepteurs erbB-1 et erbB-2 (Ma et al., 1994). Des études *in vitro* montrent que ces récepteurs s'hétérodimérisent suite à un traitement au TGF α . La transduction de ce signal conduit à la synthèse de la prostaglandine E2 (PGE2) et TGF $\beta 1$

(Prevot et al., 2003). Des études morphométriques ont démontré *in vitro* que le TGF β 1 induit la rétractation des prolongements tanycytaires par remodelage du cytosquelette permettant l'accès à l'espace de Virchow Robin ; tandis que le TGF α induit l'élongation des prolongements tanycytaires bloquant l'espace de Virchow Robin. En revanche, une exposition prolongée des tanycytes au TGF α provoque une rétraction des prolongements via la synthèse de TGF β 1 (Prevot et al., 2003). La PGE2, quant à elle, stimule directement la libération de GnRH par les terminaisons des neurones à GnRH (Clasadonte et al., 2011).

Les astrocytes participent également au remodelage de l'EM au cours du cycle œstral. En effet, ils expriment erbB-1, erbB-2 et erbB-4 et répondent également au TGF α par la synthèse de PGE2. Enfin, les cellules endothéliales engendrent également des modifications du cytosquelette des tanycytes. Ce phénomène est réalisé par un facteur soluble, le NO, qui favorise le contact des projections à GnRH avec l'espace périvasculaire (De Seranno et al., 2004). Si la plasticité de l'EM est bloquée par un inhibiteur de NO, les cycles œstraux sont perturbés. Les vaisseaux de l'EM sont eux-mêmes également plastiques au cours du cycle œstral. Des rats avec de hauts niveaux de LH présentent plus de vaisseaux immunoréactifs pour PV-1, ce qui engendrerait une augmentation de leur perméabilité (Ciofi et al., 2009).

3.6.2 Plasticité au cours des rythmes saisonniers

L'EM est également modulée lors des rythmes saisonniers. Dans l'environnement, l'alternance saisonnière de jours longs et jours courts induit des adaptations comportementales en ce qui concerne la reproduction ou le comportement alimentaire, pour s'adapter au climat ou à la disponibilité en nourriture par exemple. Etant donné que l'EM est hautement plastique pour réguler la fonction de reproduction, il n'est pas surprenant que l'EM réagisse également aux rythmes saisonniers pour adapter le comportement reproductif. La longueur des jours est détectée par la glande pinéale et se traduit par une libération de mélatonine durant la nuit. Les tanycytes expriment le GPR50 et les récepteurs à la mélatonine, et sont donc sensibles à cette hormone. En effet, les tanycytes subissent des modifications d'expression génique et structurales en fonction de la photopériode (Bolborea and Dale, 2013).

Les hormones thyroïdiennes sont importantes pour le contrôle du comportement en fonction des rythmes saisonniers. Les tanycytes expriment un large répertoire de molécules relatives à l'axe thyroïdien (cf paragraphe précédent) qui sont également modulées par la photopériode. En effet, chez le hamster sibérien (Herwig et al., 2009), en jours longs, les tanycytes expriment la DIO2 qui active T3, ce qui augmente sa concentration hypothalamique ; tandis qu'en jours courts, ils expriment la DIO3 qui inactive T3, et augmente l'expression du transporteur des hormones thyroïdiennes MCT8, ce qui diminue la concentration de T3

hypothalamique. La modulation de la concentration en T3 active dans l'hypothalamus en fonction de la photopériode s'accompagne d'une diminution de poids chez le hamster en jours courts (Herwig et al., 2009). La neurogenèse au niveau des tanocytes est aussi modulée en fonction de la photopériode. En effet, les tanocytes expriment la RALDH, enzyme synthétisant l'acide rétinoïque, un inhibiteur de la prolifération. En jours longs, chez le rat, la RALDH1 est fortement exprimée et la prolifération cellulaire est diminuée (Shearer 2012). De nombreux autres gènes sont modulés par la photopériode. L'immunomarquage vimentine, protéine du cytosquelette des tanocytes, et NCAM, molécules d'adhésion cellulaire, diminuent en jours courts (Bolborea et al., 2011; Kameda et al., 2003). En jours longs, ce phénomène peut être mimé par des injections de mélatonine en fin d'après midi (Bolborea et al., 2011). Le GPR50 des tanocytes diminue aussi en jours courts chez le hamster (Barrett et al., 2006).

Enfin, en supplément des modifications d'expression génique, l'EM subit également des remaniements structuraux en fonction de la photopériode. En effet, Van Wijk *et coll.* ont montré, chez la grenouille, que la zone externe de l'EM était plastique selon le temps d'illumination (2009).

3.6.3 Plasticité dans la régulation du métabolisme

L'EM étant plastique lors des rythmes saisonniers et cela pour adapter le comportement alimentaire de l'animal en fonction des jours courts et longs, il n'est pas étonnant que l'EM soit aussi plastique lors de déséquilibres énergétiques. En effet, les tanocytes subissent des modifications d'expression génique et structurale en fonction de l'état énergétique de l'individu.

Concernant les modifications d'expression génique, le GPR50 diminue par exemple lors du jeûne, lors de 5 semaines de nourriture riche en graisse (Ivanova et al., 2008) ou chez les souris *ob/ob* (Bechtold et al., 2012). Le jeûne induit également une augmentation de l'expression et d'activité de DIO2 (Diano et al., 1998). Par conséquent, cela entraîne une augmentation de T3 au niveau hypothalamique et stimule la prise alimentaire par activation des neurones à NPY (Diano et al., 1998, Coppola et al., 2005, 2007). Les variations des niveaux de leptine et des glucocorticoïdes seraient aussi impliquées dans ce processus (Coppola et al., 2005).

Concernant les modifications structurales, Gotoh *et coll.* ont observé une augmentation de l'immunomarquage de DARPP32, marqueur de tanocytes, associé à la phosphorylation de la β -adducine, protéine associée au cytosquelette, dans les tanocytes $\alpha 1$ lors de la mise à jeun ou d'un traitement au 2-DG chez le rat (2008). Nous avons observé le même phénomène chez la souris (Article 1, fig1, asterisk). Cette augmentation résulte d'une redistribution de la protéine

plutôt qu'à l'augmentation de son expression génique et est associée à une augmentation de la prise alimentaire.

Ainsi, sachant que les tanocytes contactant les vaisseaux de l'EM et du NA sont hautement plastiques et sont capables de détecter les variations métaboliques dans la circulation sanguine, Lechan *et coll.* (2004) ont émis l'hypothèse que les modifications d'expression génique et structurales des tanocytes pourraient moduler la perméabilité des vaisseaux du NA et l'accès des hormones et métabolites périphériques vers ce noyau hypothalamique. Dans ce cas, on peut aussi imaginer que l'apparition de problèmes d'accès des molécules périphériques au NA lors de déséquilibres énergétiques comme l'obésité soit due à un dérèglement de la fonction tanocytaire.

L'EM est idéalement placée à l'interface entre le sang, véhiculant les signaux métaboliques, et le noyau arqué, chef d'orchestre des réseaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire. Les deux constituants clés de l'EM, les vaisseaux fenêtrés et les tanocytes, étant des éléments extrêmement plastiques, il est concevable d'imaginer que cette interface régule, et module en fonction de l'état énergétique de l'individu, les échanges sang/cerveau, en vue de réguler la prise alimentaire.

Les données de la littérature reportées dans cette introduction mettent en évidence l'importance des interfaces sang/cerveau dans la régulation de la prise alimentaire. En effet, ces interfaces sont des lieux de passage des signaux métaboliques périphériques vers le système nerveux central, et peuvent être modulées selon l'état énergétique de l'individu afin d'optimiser la régulation de la prise alimentaire. Parmi ces interfaces, les organes circumventriculaires, grâce à leurs vaisseaux fenêtrés, semblent fortement favoriser les échanges sang/cerveau. Parmi ces organes circumventriculaires, l'éminence médiane, de part sa localisation à proximité du noyau arqué hypothalamique, son organisation structurale particulière et sa haute plasticité, pourrait jouer un rôle crucial dans le convoyage des molécules périphériques vers l'hypothalamus métabolique.

Lors de ce travail de thèse, nous avons cherché à comprendre comment sont régulés les échanges sang/cerveau au niveau de la région hypothalamique comprenant l'éminence médiane et le noyau arqué, et si ces échanges sont modulés selon l'état énergétique de la souris. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'organisation structurale des vaisseaux de l'éminence médiane et du noyau arqué ainsi qu'aux jonctions serrées des tanocytes formant le plancher du 3^{ème} ventricule lors d'un déséquilibre énergétique : le jeûne. En parallèle, des études de perméabilité avec l'utilisation à la fois de molécules inertes et fonctionnelles ont été menées afin d'étudier l'accès des molécules périphériques vers le noyau arqué.

Les objectifs de ma thèse ont donc été les suivants :

- Déterminer si le jeûne peut engendrer une **réorganisation structurale de l'interface sang/cerveau au niveau de l'éminence médiane et du noyau arqué.**
- Si cela est confirmé, identifier les **mécanismes engendrant cette réorganisation**, et déterminer les **conséquences sur les échanges sang/noyau arqué et sur la régulation de la prise alimentaire.**
- Déterminer si les **autres organes circumventriculaires**, dont certains jouent un rôle dans la régulation de la prise alimentaire tels que l'area postrema et l'organe subfornical, possèdent une **organisation neuroanatomique** similaire à celle de l'éminence médiane.

ARTICLE 1: Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting

Notre premier projet a été de déterminer si, lors d'un déséquilibre énergétique, l'éminence médiane subit une réorganisation structurale et fonctionnelle afin d'optimiser l'accès des molécules périphériques vers le noyau arqué hypothalamique. Pour cela, nous avons choisi de mettre des souris à jeun durant 24h et d'étudier l'organisation des vaisseaux fenêtrés et des jonctions serrées tanycytaires. En parallèle, l'injection de colorant ou d'hormones fonctionnelles en périphérique ainsi que des études comportementales nous ont permis d'évaluer respectivement l'accès des molécules périphériques vers le noyau arqué hypothalamique et le comportement alimentaire des souris.

Lors de cette étude, nous avons observé une réorganisation de l'interface sang/cerveau au niveau de l'éminence médiane et du noyau arqué caractérisée par une augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés dans cette région cérébrale et une redistribution des protéines de jonctions serrées au niveau du corps cellulaire des tanocytes formant le plancher du 3^{ème} ventricule. Cette plasticité cérébrale a pour origine l'hypoglycémie induite par le jeûne : celle-ci induit une augmentation de l'expression du VEGF-A au niveau des tanocytes, facteur de croissance à l'origine de la réorganisation de l'interface sang/cerveau. Enfin, cette réorganisation de l'interface sang/cerveau dans cette région cérébrale a été associée à un meilleur accès des molécules périphériques vers le NA et mise en relation avec la réponse physiologique développée par l'animal en réponse au jeûne, en l'occurrence une hyperphagie.

L'ensemble de ces données a fait l'objet d'une publication dans *Cell Metabolism*.

Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in Response to Fasting

Fanny Langlet,^{1,2,3} Barry E. Levin,^{4,5,‡} Serge Luquet,^{6,‡} Massimiliano Mazzone,^{7,‡} Andrea Messina,^{1,2,3,‡} Ambrose A. Dunn-Meynell,^{4,5} Eglantine Balland,^{1,2,3} Amelie Lacombe,⁶ Daniele Mazur,^{1,2,3} Peter Carmeliet,⁷ Sebastien G. Bouret,^{1,2,3,8} Vincent Prevot,^{1,2,3*} Bénédicte Dehouck^{1,2,3,9}

- ¹ Inserm, Jean-Pierre Aubert Research Centre, U837, Development and plasticity of the postnatal brain, F-59000 Lille, France
- ² UDSL, School of Medicine, Lille, F-59000, France
- ³ Univ Lille Nord de France, Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique, F-59000 Lille, France
- ⁴ Neurology Service, Veterans Affairs Medical Center, East Orange, NJ 07018-1095, USA
- ⁵ Department of Neurology and Neurosciences, New Jersey Medical School, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, Newark, NJ 07103, USA
- ⁶ Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, BFA, EAC 4413 CNRS, F-75205 Paris, France
- ⁷ VIB Vesalius Research Center, University of Leuven, B-3000 Leuven, Belgium
- ⁸ Neuroscience Program, The Saban Research Institute, Childrens Hospital Los Angeles, University of Southern California, Los Angeles, CA 90027, USA
- ⁹ Université d'Artois, F-62800 Liévin, France

‡ These authors contributed equally to this work

Running Title: Hypothalamic barriers in CNS control of feeding

Number of text pages: 24

Number of figures: 4

Number of tables: 0

* Corresponding author: Vincent Prevot, Ph.D., Inserm 837, Bâtiment Biserte, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France
Tel : +33 320-62-20-64
Fax : +33 320-53-85-62
E-mail : vincent.prevot@inserm.fr

Summary

The delivery of blood-borne molecules conveying metabolic information to neural networks that regulate energy homeostasis is restricted by brain barriers. The fenestrated endothelium of median eminence microvessels and tight junctions between tanycytes together compose one of these. Here, we show that the decrease in blood glucose levels during fasting alters the structural organization of this blood-hypothalamus barrier, resulting in the improved access of metabolic substrates to the arcuate nucleus. These changes are mimicked by 2-deoxyglucose-induced glucoprivation and reversed by raising blood glucose levels after fasting. Furthermore, we show that VEGF-A expression in tanycytes modulates these barrier properties. The neutralization of VEGF signaling blocks fasting-induced barrier remodeling and significantly impairs the physiological response to refeeding. These results implicate glucose in the control of blood-hypothalamus exchanges through a VEGF-dependent mechanism, and demonstrate a hitherto unappreciated role for tanycytes and the permeable microvessels associated with them in the adaptive metabolic response to fasting.

Introduction

Appetite, energy balance and metabolism are all controlled by select neurons of the hypothalamic arcuate nucleus (ARH) (see for reviews (Elmquist et al., 2005; Gao and Horvath, 2007; Levin et al., 2011; Sawchenko, 1998)). These interoceptive sensory neurons participate in neural networks that sense circulating factors such as glucose and adiposity hormones that signal changes in metabolic state (Cowley et al., 2001; Cowley et al., 2003; Dunn-Meynell et al., 2002; Elias et al., 1999; Hill et al., 2010; Liu et al., 2012). However, the physiological mechanisms that control the access of these factors to ARH circuits and their regulation in response to changes in feeding status remain largely unexplored.

Molecular traffic between the periphery and the central nervous system (CNS), including the hypothalamus, is restricted by regulated interfaces, such as the blood-brain barrier (BBB), composed of tight junctions between endothelial cells lining brain microvessels (Neuwelt et al., 2011). The blood-cerebrospinal-fluid (CSF) barrier, a lesser known interface, is composed of tanycytes, specialized hypothalamic glia that line the floor of the 3rd ventricle, and microvessels of the median eminence (ME), a circumventricular organ adjacent to the ARH (Mullier et al., 2010). While the endothelial cells of the ME are unique in being fenestrated, and thus highly permeable to blood-borne molecules, tight junction complexes between adjacent tanycytes act as a physical barrier preventing their diffusion to the rest of the brain via the CSF. Transcellular transport across the blood-brain and blood-CSF barriers is usually mediated by saturable carriers (Banks, 2006; Hawkins and Davis, 2005). However, whether specific hypothalamic areas that regulate energy balance, such as the ARH, directly access peripheral homeostatic signals through the fenestrated microvessel plexus in the adjacent ME is a matter of debate (Ciofi et al., 2009; Flier, 2004; Mullier et al., 2010).

Here we show that food deprivation, by inducing both tight junction complex reorganization in tanycytes and the increased fenestration and permeability of ME microvessel loops that reach the ventromedial ARH (vmARH) (Ambach and Palkovits, 1979), leads to such direct access. Refeeding, glucose infusion, the selective inhibition of vascular

endothelial growth factor (VEGF)-A expression in tanocytes and the manipulation of VEGF signaling all reverse these structural changes and the resulting ability of molecules to enter the ARH.

Results

Fasting-induced plasticity of the blood-hypothalamus barrier (BHB)

To investigate the role of BHB plasticity in the adaptive response to fasting, we compared the hypothalami of mice deprived of food for 24h and those fed *ad libitum* using immunofluorescence for two constitutive tight junction proteins, zonula occludens-1 (ZO-1) and occludin, expressed in BBB endothelial cells and tanycytes, and claudin-1, expressed in tanycytes at the blood-CSF barrier (Mullier et al., 2010). In parallel, antibodies to MECA-32 were used to selectively label the fenestral diaphragms of ME endothelial cells (Ciofi et al., 2009; Mullier et al., 2010).

Fasting increased the organization of tanycytic tight junction complexes in both the ME and ARH (Fig. 1A,B; Fig. S1A), but not in standard non-ARH hypothalamic vessels composing the BBB (Fig. S1B). Fasting intensified the honeycomb-like pattern of ZO-1 and occludin around the apical pole of tanycytes overlying the ME (Fig. 1A, insets 2,5; Fig. S1A, insets 3,6), and switched ZO-1 and occludin distribution from a diffuse apical pattern to a honeycomb pattern in tanycytes lining the third ventricle (3V) next to the ARH (Fig. 1A, insets 1,4; Fig. S1A, insets 2,5). Claudin-1 expression in ARH tanycytes also became organized in food-deprived mice (Fig. 1C,D). This reorganization was associated with increased protein levels of ZO-1, but not of occludin or claudin-1, in fasting animals (Fig. S1D). Finally, food-deprived mice refed for an additional 24h displayed a reappearance of the hypothalamic barrier phenotype of fed mice (Fig. 1B-D).

In fasting mice, ME microvessel loops, some of which extend up to the ARH, also demonstrated a marked increase in fenestration associated with changes in MECA-32 distribution (Fig. 1A, insets 1,4; Fig. 1B) and the appearance of fenestrated diaphragms at the ultrastructural level (Fig. 1E, inset 2; Fig. S1C). Western blotting revealed that this increased fenestration was accompanied by a significant increase in MECA-32 protein levels ($p < 0.05$; Fig. 1F). Together, the fasting-induced structural reorganization of the tight junction complexes of tanycytes lining the ventricular wall adjoining the ARH potentially limits

paracellular diffusion between the tissue and the CSF, while ME microvessels simultaneously become more leaky. These reversible morphological alterations at the BHB suggest that nutritional state modulates the access of metabolic signals from the periphery to ARH neurons critical for energy homeostasis.

Glucose deprivation mediates fasting-induced plasticity at the BHB

What nutritional factors underlie these profound morphological changes in fasting mice? Blood glucose acts as a metabolic signal that can alter the activity of hypothalamic neurons (Levin et al., 2011; Thorens and Larsen, 2004) and evokes robust signaling in tanycytes, which act as glucosensors (Frayling et al., 2011), suggesting that reduced glucose levels could underlie the morphological changes seen during fasting. As expected, blood glucose levels were significantly lower after 24h of food deprivation (Fig. 2A, $p < 0.001$). Levels were normalized and fasting-induced BHB reorganization prevented (Fig. 2B) by intravenous (i.v.) glucose (30%, 1-3 $\mu\text{l}/\text{min}$; $n = 6$) but not saline infusion ($n = 4$). On the other hand, central neuroglucopenia induced by the intraperitoneal (i.p.) or intracerebroventricular (i.c.v.) injection of 2-deoxy-D-glucose (2-DG, 300 mg/kg i.p. or 1 mg/mouse i.c.v.; $n = 4$ each, Fig. 2B; Fig. S2A), a glucose analog that inhibits glucose metabolism but can act on tanycytes (Frayling et al., 2011), caused the reorganization of tanycytic tight junction complexes and associated microvessel loops to resemble those in fasting mice. The central detection of glucose deprivation thus appears to play a key role in BHB reorganization after fasting.

VEGF promotes changes in ME microvessel loops and tanycytic tight junction complexes during fasting

Quantitative RT-PCR analyses showed that fasting induced a constellation of hypothalamic transcripts involved in controlling the structural plasticity of the brain (Fig. 2C). However, only VEGF-A expression was upregulated in both fasting and 2-DG-treated animals (Fig. 2C). VEGF protein levels increased in the hypothalamus of 24h-fasting mice when compared to fed mice ($p < 0.05$; Fig. 2D), and 2DG-treatment for 12h directly triggered VEGF secretion

from ME-ARH explants *in vitro* ($p < 0.05$; Fig. 2E). We therefore treated mice for 24h with Axitinib (25 mg/kg/12h, i.p. or 70 μ g/mouse, i.c.v.), a tyrosine kinase inhibitor that selectively inhibits VEGF receptors (VEGFR) 1, 2 and 3 (Mancuso et al., 2006). Axitinib reversed both fasting- and 2DG-evoked changes in tight junction complex organization in tanycytes and the associated microvessel loops in the ME/ARH region (Fig. 2B,F; Fig. S2A,B). Conversely, VEGF infusion (60 μ g/kg/12h, i.p. or 100 ng/mouse, i.c.v.) for 24h mimicked the effects of fasting on BHB plasticity in fed mice (Fig. 2F,G; Fig. S2B) without affecting tight junction organization in BBB capillaries (Fig. S1B).

Next, we examined the contribution of VEGFR1, 2 and 3, which are all expressed in the mediobasal hypothalamus (MBH; Fig. S2C), to fasting-induced BHB plasticity, by administering selective neutralizing monoclonal antibodies to each receptor (40 mg/kg, i.p.) (Pytowski et al., 2005; Wang et al., 2004). While antibodies to VEGFR1 and 3 bound to both hypothalamic BBB microvessels and the ME microvessel plexus, antibodies to VEGFR2 bound only to the latter (Fig. S2D). Importantly, the blockade of VEGFR2 and, to a lesser extent, VEGFR1, inhibited the BHB rearrangement observed after fasting (Fig. S2E,F), while antibodies to VEGFR3 had no effect on this plasticity (Fig. S2F). Together, these data suggest that increased hypothalamic VEGF levels during food deprivation target VEGFR1 and 2 in ME endothelial cells to promote microvessel permeability and tight junction complex reorganization in the ME and ARH.

Fasting-induced BHB plasticity requires tanycytic VEGF-A expression

VEGF-A mRNA expression in the hypothalamic tuberal region is restricted to tanycytes (Allen Brain atlas, <http://mouse.brain-map.org/experiment/show/74988747>, Fig. S3A), suggesting that these cells play a role in the control of VEGF-mediated BHB plasticity. Cell sorting experiments using *tdTomato*^{loxP/+} reporter mice in which the tat-cre fusion protein, whose cellular uptake is enhanced compared to cre recombinase (Peitz et al., 2002), was stereotaxically infused into the 3rd ventricle, where it selectively targeted tanycytes (Fig. S2G), to study fasting-dependent changes in tanycytic gene expression *in vivo* (Fig. 2H).

Sorted Tomato-positive cells abundantly expressed the tanycytic marker DARPP-32 (Hokfelt et al., 1988), which was barely detectable in Tomato-negative cells (Fig. S2I). Purified tanycytes also expressed GLUT1, GLUT2 and glucokinase transcripts, as suggested by others (Rodriguez et al., 2005), and low levels of VEGFR1 and 2, although VEGFR3 was undetectable (Fig. S2I). Intriguingly, fasting upregulated VEGF-A but not VEGF-B or VEGF-C mRNA expression in tanycytes (Fig. 2H; Fig. S2J), with a concomitant increase in the transcript for hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) (Fig. S2K), recently shown to be involved in hypothalamic glucosensing (Zhang et al., 2011) and known to promote VEGF expression (Carmeliet et al., 1998). Finally, *Vegfa* deletion in tanycytes by tat-cre infusion into the third ventricle of *Vegfa*^{loxP/loxP} mice (Fig. S3A) abolished fasting-induced BHB reorganization (n = 4; Fig. 2F) but did not affect BHB properties in animals fed *ad libitum* (n = 4; not shown). Together these data demonstrate that tanycytic VEGF-A expression plays a key role in regulating fasting-induced BHB plasticity.

BHB plasticity modulates the access of blood-borne metabolic factors to the ARH

To establish whether the morphological changes described in the MBH above were associated with altered permeability and access of blood-borne molecules to the ARH, the extravasation of intravenously-injected Evans Blue dye from brain microvessels into the hypothalamus was compared between 24h-fasting and fed mice. In fed mice, Evans Blue diffusion was restricted to the vascular bed of hypothalamic BBB microvessels and the ME (Fig. 3A, top panels), and did not spread to neighboring structures such as the ARH. In striking contrast, in 24h-fasting mice, the dye was observed in the ventromedial ARH (vmARH), where plastic BHB changes were observed in previous experiments (Fig. 3A,B). As with the morphological changes, refeeding reversed dye diffusion into the vmARH (Fig. 3B). Importantly, fasting did not promote dye extravasation from the intrinsic hypothalamic microvessels that compose the BBB (Fig. S3B). The inhibition of BHB reorganization in food-deprived mice by Axitinib, VEGFR2-neutralizing antibodies, *Vegfa* gene targeting or glucose infusion prevented dye diffusion into the ARH, whereas the induction of barrier plasticity with

VEGF in fed mice clearly elicited such diffusion (Fig. 3B). These findings strongly suggest that the anatomical changes at the BHB in fasting animals facilitate the access of blood-borne signals to the vmARH due to its increased permeability.

To directly test whether fasting-induced structural rearrangements at the BHB do indeed increase the access of critical metabolic substrates to the ARH, we simultaneously assessed glucose levels in the ARH and the adjacent ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) by microdialysis in fed or 24h-fasting rats (Fig. 3C). First, rats exhibited similar fasting-induced morphological and functional changes to the BHB as did mice (Fig. S3C-E). While ARH glucose levels in fed rats were comparable to those in the VMH (Fig. 3C), in 24h-fasting rats, ARH glucose levels were 300% higher than VMH levels (Fig. 3C). In keeping with the restricted occurrence of microvessels whose permeability changes in response to feeding status in the vmARH, and unlike what would have been expected if the BBB were completely permeable throughout the ARH, ARH glucose levels during fasting (\approx 2mM) never reached blood levels (\approx 5mM). However, these data do suggest that fasting-induced structural changes at the BHB create a privileged route for the access of circulating glucose to glucosensing ARH neurons, bypassing both the BBB and the blood-CSF barrier (Fig. 3F).

We further explored this hypothesis by examining the ability of exogenous leptin, a 16-kDa peptide hormone, to access ARH neurons by quantifying the leptin-stimulated phosphorylation of STAT3 in fasting and fed mice. Leptin (3 mg/kg, i.p.) induced a 30% increase in immunoreactivity for phosphorylated STAT3 (pSTAT3) in food-deprived mice when compared to fed mice (Fig. 3D). This increase was restricted to the vmARH (Fig. S3F). Axitinib (which inhibits BHB rearrangement; Fig. 2F) prevented the leptin-induced increase in pSTAT3 in fasting animals (Fig. 3D,E). Conversely, the treatment of fed mice (in which endogenous leptin levels are significantly higher than in fasting mice; Fig. S3G), with VEGF, which promotes BHB reorganization (Fig. 2F,G), markedly increased STAT3 activation in the ARH (Fig. 3D,E). This effect was blunted by the i.p. injection of a mutated recombinant leptin antagonist (LAN; 3 mg/kg) that is devoid of biological activity but effectively binds to the leptin

receptor (Niv-Spector et al., 2005) 45 min before death (Fig. 3D,E), suggesting that leptin access to the ARH is facilitated by VEGF treatment in fed mice. Together, these data suggest an important role for BHB plasticity in modulating the access of metabolic factors to the ARH.

BHB plasticity modulates feeding

To evaluate the functional consequences of BHB plasticity to feeding behavior, we measured refeeding after fasting in control and Axitinib-treated mice. Compared to vehicle-infused mice refed after a 24h fast, food intake was significantly lower in Axitinib-treated refed mice (Fig. 4A). This difference, which occurred primarily during the first 30 min of refeeding (Fig. 4A), was associated with decreased body weight gain 24h and 48h after Axitinib administration (Fig. 4B). Importantly, Axitinib alone did not inhibit food intake in animals fed *ad libitum* (Fig. 4A), suggesting that reduced feeding in fasting mice was not due to food aversion. Conversely, food intake significantly increased in the afternoon and at lights-off (when endogenous anorectic hormones are thought to stimulate food intake) in fed mice 24h after the initiation of VEGF treatment, when compared to vehicle-treated mice (Fig. 4C). Subsequently, we found that the anorectic and weight-loss-inducing effects of exogenous leptin were greater in fed mice treated with VEGF than in vehicle-treated controls (Fig. 4D). Together, these findings suggest that VEGF-mediated structural changes at the BHB, by modulating the access of blood-borne metabolic substrates to the ARH, play an important role in the adaptive response to fasting.

Discussion

Energy homeostasis requires increased food intake when energy stores are depleted, and a means of signaling this depletion to central neurons that control feeding behavior (Cowley et al., 2001; Cowley et al., 2003; Dunn-Meynell et al., 2002; Elias et al., 1999; Liu et al., 2012), such as ARH neurons (Hill et al., 2010). Here, we provide evidence that the BHB (Mullier et al., 2010) undergoes dynamic and reversible structural changes that modulate its permeability in response to glucose and tuncytic VEGF levels, thereby acting as a checkpoint in the access of peripheral metabolic signals to ARH neurons.

Our data show that fasting-evoked dips in blood glucose levels trigger VEGF-A expression in tuncytes and VEGF accumulation in the hypothalamic ME, which acts via VEGFR to promote endothelial cell fenestration. Tuncytes contacting these newly permeable microvessel loops then reorganize their tight junction complexes to seal the paracellular space between the parenchyma and the CSF. In consequence, some target neurons in the vmARH are no longer insulated by the blood-brain and blood-CSF barriers but become directly exposed to peripheral metabolic signals (Fig. 3F), a situation reversed upon refeeding. This increased accessibility is confirmed both by the leakage of intravenously injected dye into the vmARH and by higher physiological glucose levels in the ARH than in the adjacent VMH in the fasting state. Fasting-induced reorganization is blocked by the VEGFR inhibitor Axitinib, which, consistent with the importance of these changes in the adaptive response to fasting, reduces food intake and weight gain when food-deprived mice are refed. Even though Axitinib alone did not affect food intake in control animals fed *ad libitum*, chronic Axitinib treatment, which causes a marked reduction in endothelial cell (Kamba et al., 2006), is known to affect glucose homeostasis (Kamba et al., 2006) and to lead to decreased appetite and weight loss in patients (Fruehauf et al., 2011; Rini et al., 2009).

Conversely, triggering BHB permeability in mice fed *ad libitum* with exogenous VEGF, which signals food deprivation, significantly increases their food intake and sensitivity to the

anorectic effects of leptin. We used leptin as a surrogate for other large metabolic peptides such as ghrelin because we could assess its access to the vmARH by monitoring the activation of STAT3. In fact, leptin levels are decreased during fasting, leading to a marked anabolic state within the hypothalamus, with increased neuropeptide Y and agouti-related peptide (AgRP) and decreased proopiomelanocortin levels. This combination acts as a potent stimulus for the animal to seek and ingest food. Contrarily, ghrelin levels increase during fasting, and the increased permeability of ARH microvessels to this peptide could facilitate its selective activation of anabolic AgRP neurons (Elmqvist et al., 2005; Gao and Horvath, 2007; Levin et al., 2011; Sawchenko, 1998).

Falling blood glucose levels and decreased glucose metabolism appear to be critical signals for the initiation of the BHB response to starvation. Glucose replacement prevents this rearrangement while 2-DG-induced central glucopenia reproduces it. The molecular pathways that underlie the subsequent accumulation of VEGF in the ME are unknown. However, our results showing that VEGF-A inactivation in these cells blunts fasting-induced BHB plasticity strongly suggest that they are intrinsic to tanycytes, which directly and rapidly respond to changes in glucose levels (Frayling et al., 2011). This response could involve HIF-1 α , which is upregulated in tanycytes by fasting (Fig. S2J), and is known to be activated by glucoprivation and to promote VEGF expression (Carmeliet et al., 1998; Zhang et al., 2011).

VEGF has long been associated with increased vascular permeability (Esser et al., 1998; Ioannidou et al., 2006) and is required for ependymal cell function and the maintenance of key brain-periphery interfaces such as the choroid plexus (Maharaj et al., 2008). VEGF might also contribute to increased BBB permeability in diseased (Argaw et al., 2009) but not healthy brains (Hawkins et al., 2010) (Fig. S1B; Fig. S3A). Our data suggest that VEGF and its signaling receptor, VEGFR2, are key determinants of fasting-induced structural rearrangements at the BHB. Although VEGF involvement in endothelial cell fenestration and the expression of diaphragm proteins (named PV-1 in rats and MECA-32 in mice) is clearly documented (Esser et al., 1998; Kamba et al., 2006), the mechanisms underlying tight-

junction-complex remodeling in tanycytes, which express low levels of VEGFR2, are unknown. These could also involve VEGF signaling, which induces posttranslational modifications in tight junction proteins under some pathological conditions (Murakami et al., 2009), or other as-yet undiscovered signals released by endothelial cells upon fenestration.

Tight junction proteins such as occludin, whose organization is modified in tanycytes under fasting conditions, could also be involved in brain metabolic sensing and body-weight regulation. Occludin-null mice are leaner than their wild-type littermates (Saitou et al., 2000), and the i.c.v. infusion of antisense oligodeoxynucleotides to occludin restores leptin sensitivity in an animal model of diet-induced leptin resistance and hyperglycemia (Oh et al., 2005) in which fasting appears not to promote changes in BHB permeability (unpublished observations). This, together with recent findings showing that a high-fat diet triggers neurogenic activity in ME tanycytes (Lee et al., 2012), shows that these cells play a dynamic role in metabolic sensing and hold therapeutic potential in metabolic disorders.

Overall our data unveil a new physiological concept in the maintenance of energy homeostasis, in which blood glucose levels, by regulating tanycytic VEGF-A expression, modulate the organization of their tight junctions as well as the permeability of ME capillary loops in the vmARH, and thereby control the access of circulating homeostatic signals to brain circuits that regulate metabolism.

Experimental procedures

Animals

Male C57Bl/6 mice, 3-4 months old (Charles River, France) and male Sprague Dawley rats (Charles River, USA) were given *ad libitum* access to water and standard laboratory chow. *tdTomato*^{loxP/+} reporter mice were purchased from the Jackson laboratories (Maine, USA) and *Vegfa*^{loxP/loxP} mice (Gerber et al., 1999) were a gift from N. Ferrara (Novartis, USA). Animal studies were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Lille and the East Orange Veterans Affairs Medical Center.

Treatment protocols

Glucose infusion and 2-deoxy-D-glucose (2-DG) injection. Mice fed *ad libitum* and fasting mice were anesthetized with isoflurane and the jugular vein catheterized. After a 7-day recovery period, fed mice were infused with saline solution (0.9%) for 24h while fasting mice were infused with glucose (30% in saline) or saline. Moreover, mice fed *ad libitum* were given an i.p. or i.c.v. injection of 2-DG (RDS, France) in saline or an equal volume of saline alone, following procedures described previously (Mullier et al., 2010).

Anti-VEGF and VEGF treatments. Mice were subjected to an i.p. or i.c.v. infusion of Axitinib (in DMSO, LC Laboratories, France) or an equal volume of DMSO during the 24h fasting period. Finally, mice fed *ad libitum* were given an i.p. or i.c.v. infusion of recombinant mouse VEGF 164 (RDS, France) in PBS for 24h.

Tat-cre delivery. A tat-cre fusion protein produced as detailed previously (Peitz et al., 2002) was stereotaxically infused into the third ventricle (1.5 µl over 5 min at 2.1 mg/ml; AP: -1.7 mm, ML: 0 mm DV: - 5.6 mm) of isoflurane-anesthetized floxed mice 24h before experiments.

Fluorescence-activated cell-sorting and real-time PCR analyses

Tomato-positive cells were sorted and collected from ME explants microdissected from fasting and fed mice and processed for quantitative RT-PCR, as described in the Supplemental Experimental Procedures.

Physiological measurements

Food intake. Mice were housed 3 per cage with preweighed amounts of food dispensed through the wire cage tops, and food intake was measured every 30 min for the first 3 hours and every hour for 24 hours. The average and cumulative food intake of 3 mice was used for statistical comparisons (n = 4 cages per group).

In vivo leptin sensitivity test. Mice were housed in individual cages two days before the beginning of the experiment. Mice fed *ad libitum* and fed mice infused with VEGF were injected i.p. at 18:00 with vehicle (5 mM sodium citrate buffer, pH 4.0) or leptin (3 mg/kg, PeproTech, France). Body weight and food consumption were measured at 08:00 the next day.

Permeability assays, immunohistochemistry and image analysis

Mice were given i.v. injections of sterile 1% Evans Blue dye (Sigma, France) in 0.9% saline (50 μ l) into the tail vein and killed by decapitation 20 min later. Brains were processed for immunofluorescence as described previously (Mullier et al., 2010). The primary antibodies used were: polyclonal rabbit anti-zonula occludens-1 (ZO-1, 1:500, Zymed, USA), rabbit anti-claudin-1 (1:200, Zymed, USA), chicken anti-vimentin (1:2000, Chemicon, France), and rat anti-MECA-32 (1:200, gift from Pr Britta Engelhardt, Switzerland). Additional details appear in the Supplemental Experimental Procedures and Fig. S4.

For pSTAT3 immunolabeling and analysis, mice were injected i.p. with vehicle (5 mM sodium citrate buffer, n = 4 per group), leptin (PeproTech, France) or LAN (Protein Laboratories Rehovot Ltd, Israel) and perfused 45 min later with a 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were processed for pSTAT3 immunolabeling and

quantification as described previously (Bouret et al., 2012). Additional details appear in the Supplemental Experimental Procedures.

Microdialysis of the hypothalamus

Placement of hypothalamic cannulae and the assessment of ARH and VMH glucose levels in male rats (n = 9) was performed as described previously (Dunn-Meynell et al., 2009) and detailed in the Supplemental Experimental Procedures.

Immunoblotting

Frozen microdissected ME and MBH of mice fed *ad libitum* (n = 3) and those fasting for 24h (n = 3) were immunoblotted as described in the Supplemental Experimental Procedures. Rabbit anti-claudin-1 (1:1000, Zymed, USA), mouse anti-VEGF (1:500, SantaCruz), rat anti-MECA-32 (1:500, Santa Cruz) and goat anti-actin antibodies (1:500, Santa Cruz, France) were used in these experiments.

Statistical analysis

All values are expressed as means \pm SEM. Data were analyzed for statistical significance with SigmaPlot software (Version 11.0), using one-way or two-way ANOVA followed by a Tukey post hoc test when appropriate. P-values of less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Supplemental information

The supplemental information includes four figures, Supplemental Experimental Procedures, and Supplemental References.

Acknowledgments

This research was supported by the NEUROBESE International Associated Laboratory (Inserm, SABAN, University of Lille 2; to V.P. and S.G.B.), the Agence National pour la

Recherche (ANR, France) grants ANR-05-JCJC (NT_NV_18 to V.P.), ANR-09-BLAN-0267 (to V.P. and S.L.), and ANR 11 BSV1 02102 (to S.G.B. and S.L.) and the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM 2005, France to V.P.; Régulation Métabolique to S.G.B.; postdoctoral fellowship to A.M.), the Institut Fédératif de Recherche 114 (IFR114, France; imaging, electron microscopy cores), the National Institute of Diabetes, Digestive and Kidney Diseases and the Veterans Administration (BEL, AAD-M), the National Institute of Health (Grant DK84142, to S.G.B.), the EUFP7 Integrated Project (Grant agreement n°266408, Full4Health, to S.G.B.). F.L. was supported by a doctoral fellowship from the Ministère délégué à la Recherche et aux Nouvelles Technologies. We thank Drs. Britta Engelhardt and Philippe Ciofi for their generous gift of antibodies to MECA-32 and PV-1, respectively, Dr. S. Rasika for the editing of our manuscript, and Delphine Taillieu, Julien Devassine, Delphine Cappe (animal facility, IFR 114), Nathalie Jouy (cell sorting facility, IFR114) and Dr. Emilie Caron (metabolomic facility, IFR114) for expert technical assistance.

References

- Ambach, G., and Palkovits, M. (1979). The blood supply of the hypothalamus of the rat. In *Handbook of the hypothalamus*, P.J. Morgane, and J. Panksepp, eds. (New York, Marcel Dekker), pp. 267-377.
- Argaw, A.T., Gurfein, B.T., Zhang, Y., Zameer, A., and John, G.R. (2009). VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 1977-1982.
- Banks, W.A. (2006). Blood-brain barrier and energy balance. *Obesity (Silver Spring)* *14 Suppl 5*, 234S-237S.
- Bouret, S.G., Bates, S.H., Chen, S., Myers, M.G., Jr., and Simerly, R.B. (2012). Distinct roles for specific leptin receptor signals in the development of hypothalamic feeding circuits. *J Neurosci* *32*, 1244-1252.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., *et al.* (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* *394*, 485-490.
- Ciofi, P., Garret, M., Lapirot, O., Lafon, P., Loyens, A., Prevot, V., and Levine, J.E. (2009). Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* *150*, 5509-5519.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* *411*, 480-484.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschop, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., *et al.* (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* *37*, 649-661.
- Dunn-Meynell, A.A., Routh, V.H., Kang, L., Gaspers, L., and Levin, B.E. (2002). Glucokinase is the likely mediator of glucosensing in both glucose-excited and glucose-inhibited central neurons. *Diabetes* *51*, 2056-2065.

- Dunn-Meynell, A.A., Sanders, N.M., Compton, D., Becker, T.C., Eiki, J., Zhang, B.B., and Levin, B.E. (2009). Relationship among brain and blood glucose levels and spontaneous and glucoprivic feeding. *J Neurosci* 29, 7015-7022.
- Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R.S., Bjorbaek, C., Flier, J.S., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23, 775-786.
- Elmquist, J.K., Coppari, R., Balthasar, N., Ichinose, M., and Lowell, B.B. (2005). Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol* 493, 63-71.
- Esser, S., Wolburg, K., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T., and Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J Cell Biol* 140, 947-959.
- Flier, J.S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116, 337-350.
- Frayling, C., Britton, R., and Dale, N. (2011). ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J Physiol* 589, 2275-2286.
- Fruehauf, J., Lutzky, J., McDermott, D., Brown, C.K., Meric, J.B., Rosbrook, B., Shalinsky, D.R., Liao, K.F., Niethammer, A.G., Kim, S., *et al.* (2011). Multicenter, phase II study of axitinib, a selective second-generation inhibitor of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3, in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 17, 7462-7469.
- Gao, Q., and Horvath, T.L. (2007). Neurobiology of feeding and energy expenditure. *Annu Rev Neurosci* 30, 367-398.
- Gerber, H.P., Hillan, K.J., Ryan, A.M., Kowalski, J., Keller, G.A., Rangell, L., Wright, B.D., Radtke, F., Aguet, M., and Ferrara, N. (1999). VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 126, 1149-1159.
- Hawkins, B.T., and Davis, T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57, 173-185.
- Hawkins, B.T., Sykes, D.B., and Miller, D.S. (2010). Rapid, reversible modulation of blood-brain barrier P-glycoprotein transport activity by vascular endothelial growth factor. *J Neurosci* 30, 1417-1425.
- Hill, J.W., Elias, C.F., Fukuda, M., Williams, K.W., Berglund, E.D., Holland, W.L., Cho, Y.R., Chuang, J.C., Xu, Y., Choi, M., *et al.* (2010). Direct insulin and leptin action on pro-opiomelanocortin neurons is required for normal glucose homeostasis and fertility. *Cell Metab* 11, 286-297.
- Hokfelt, T., Foster, G., Schultzberg, M., Meister, B., Schalling, M., Goldstein, M., Hemmings, H.C., Jr., Ouimet, C., and Greengard, P. (1988). DARPP-32 as a marker for D-1 dopaminergic cells in the rat brain: prenatal development and presence in glial elements (tanycytes) in the basal hypothalamus. *AdvExpMedBiol* 235, 65-82.
- Ioannidou, S., Deinhardt, K., Miotla, J., Bradley, J., Cheung, E., Samuelsson, S., Ng, Y.S., and Shima, D.T. (2006). An in vitro assay reveals a role for the diaphragm protein PV-1 in endothelial fenestra morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16770-16775.
- Kamba, T., Tam, B.Y., Hashizume, H., Haskell, A., Sennino, B., Mancuso, M.R., Norberg, S.M., O'Brien, S.M., Davis, R.B., Gowen, L.C., *et al.* (2006). VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H560-576.
- Lee, D.A., Bedont, J.L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., Takiar, V., Charubhumi, V., Balordi, F., Takebayashi, H., *et al.* (2012). Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci* 15, 700-702.
- Levin, B.E., Magnan, C., Dunn-Meynell, A., and Le Foll, C. (2011). Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how? *Endocrinology* 152, 2552-2557.
- Liu, T., Kong, D., Shah, B.P., Ye, C., Koda, S., Saunders, A., Ding, J.B., Yang, Z., Sabatini, B.L., and Lowell, B.B. (2012). Fasting Activation of AgRP Neurons Requires NMDA Receptors and Involves Spinogenesis and Increased Excitatory Tone. *Neuron* 73, 511-522.

- Maharaj, A.S., Walshe, T.E., Saint-Geniez, M., Venkatesha, S., Maldonado, A.E., Himes, N.C., Matharu, K.S., Karumanchi, S.A., and D'Amore, P.A. (2008). VEGF and TGF-beta are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *J Exp Med* 205, 491-501.
- Mancuso, M.R., Davis, R., Norberg, S.M., O'Brien, S., Sennino, B., Nakahara, T., Yao, V.J., Inai, T., Brooks, P., Freemark, B., *et al.* (2006). Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest* 116, 2610-2621.
- Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., and Dehouck, B. (2010). Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 518, 943-962.
- Murakami, T., Felinski, E.A., and Antonetti, D.A. (2009). Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J Biol Chem* 284, 21036-21046.
- Neuwelt, E.A., Bauer, B., Fahlke, C., Fricker, G., Iadecola, C., Janigro, D., Leybaert, L., Molnar, Z., O'Donnell, M.E., Povlishock, J.T., *et al.* (2011). Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci* 12, 169-182.
- Niv-Spector, L., Gonen-Berger, D., Gourdou, I., Biener, E., Gussakovsky, E.E., Benomar, Y., Ramanujan, K.V., Taouis, M., Herman, B., Callebaut, I., *et al.* (2005). Identification of the hydrophobic strand in the A-B loop of leptin as major binding site III: implications for large-scale preparation of potent recombinant human and ovine leptin antagonists. *Biochem J* 391, 221-230.
- Oh, I.S., Shimizu, H., Sato, T., Uehara, Y., Okada, S., and Mori, M. (2005). Molecular mechanisms associated with leptin resistance: n-3 polyunsaturated fatty acids induce alterations in the tight junction of the brain. *Cell Metab* 1, 331-341.
- Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K., and Edenhofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4489-4494.
- Pytowski, B., Goldman, J., Persaud, K., Wu, Y., Witte, L., Hicklin, D.J., Skobe, M., Boardman, K.C., and Swartz, M.A. (2005). Complete and specific inhibition of adult lymphatic regeneration by a novel VEGFR-3 neutralizing antibody. *J Natl Cancer Inst* 97, 14-21.
- Rini, B.I., Wilding, G., Hudes, G., Stadler, W.M., Kim, S., Tarazi, J., Rosbrook, B., Trask, P.C., Wood, L., and Dutcher, J.P. (2009). Phase II study of axitinib in sorafenib-refractory metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 27, 4462-4468.
- Rodriguez, E.M., Blazquez, J.L., Pastor, F.E., Pelaez, B., Pena, P., Peruzzo, B., and Amat, P. (2005). Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *IntRevCytol* 247, 89-164.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11, 4131-4142.
- Sawchenko, P.E. (1998). Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: the anatomists weigh in. *J Comp Neurol* 402, 435-441.
- Thorens, B., and Larsen, P.J. (2004). Gut-derived signaling molecules and vagal afferents in the control of glucose and energy homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7, 471-478.
- Wang, E.S., Teruya-Feldstein, J., Wu, Y., Zhu, Z., Hicklin, D.J., and Moore, M.A. (2004). Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo. *Blood* 104, 2893-2902.
- Zhang, H., Zhang, G., Gonzalez, F.J., Park, S.M., and Cai, D. (2011). Hypoxia-inducible factor directs POMC gene to mediate hypothalamic glucose sensing and energy balance regulation. *PLoS Biol* 9, e1001112.

Figures

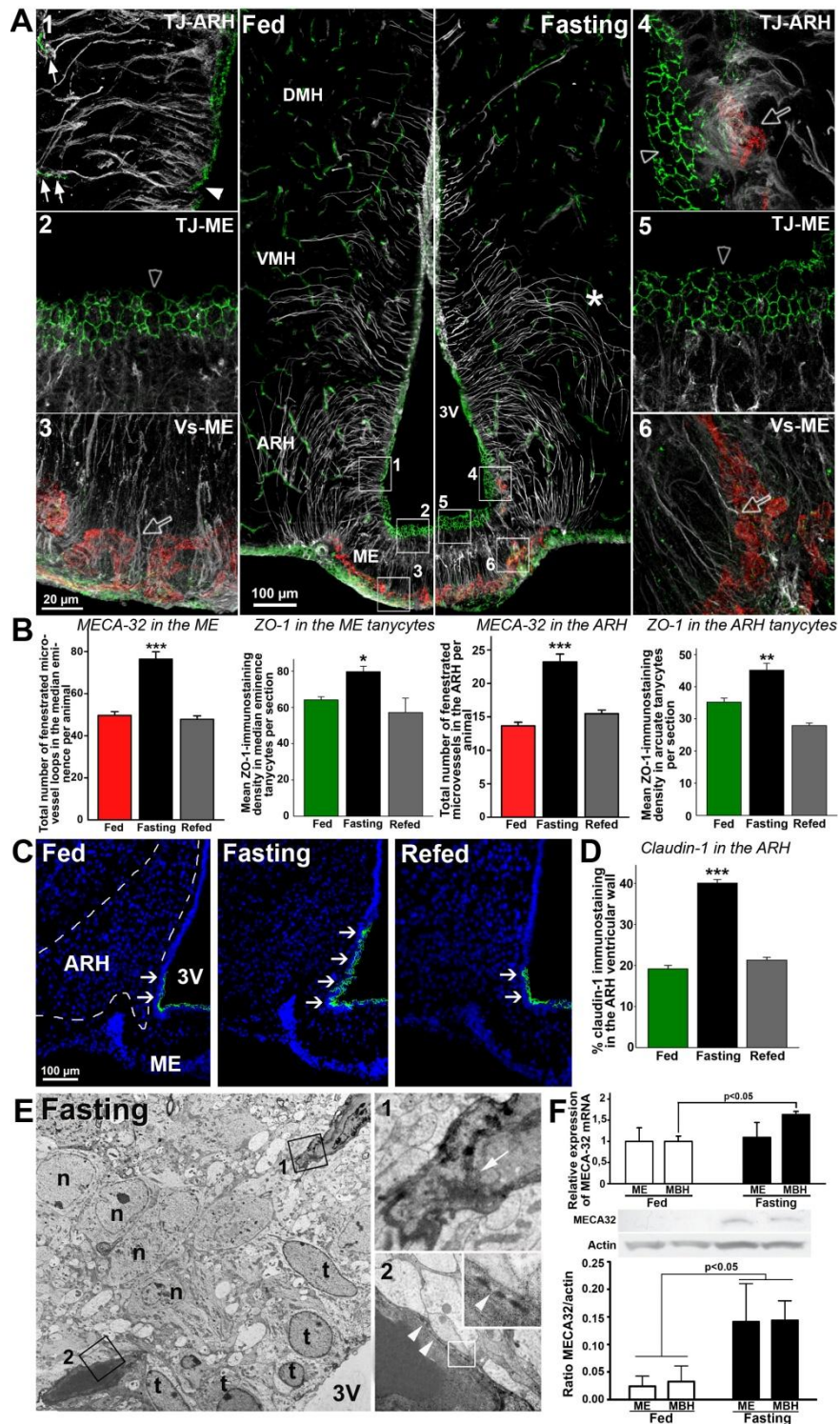


Figure 1. Fasting-induced fenestration of ME microvessel loops reaching the ARH, and tight junction complex reorganization in ARH tanycytes. (A) Vimentin (white), zonula occludens-1 (ZO-1, green) and MECA-32 (red) immunoreactivity in coronal sections of the hypothalamic tuberal region in fed and fasting mice. Tanycytic tight junction complexes exhibit a diffuse

pattern (arrowheads, inset 1) when interacting with ZO-1-positive blood vessels (arrows, inset 1) and a honeycomb pattern (empty arrowheads, insets 2,4 and 5) when interacting with MECA-32-positive vessels (empty arrows, insets 3,4 and 6). (B) MECA-32-positive microvessel loop number and ZO-1-positive tight junction complex density in the ME and ARH according to nutritional status (n = 4 per group). (C) Distribution of claudin-1 (arrows, green) in coronal sections of the hypothalamic tuberal region in fed, fasting and refed mice. (D) Proportion of the ventricular wall facing the ARH immunolabeled for claudin-1 (n = 4 per group). (E) Electron micrographs from fasting mice showing ARH capillaries with non-fenestrated (arrow, inset 1) and fenestrated endothelia (arrowheads, inset 2); n: neuronal cell bodies; t: tanycyte cell bodies. Scale bar: 10 μm (1 μm in insets). (F) Real-time PCR and immunoblotting for MECA-32 and actin from microdissected ME and MBH explants containing the ARH from fed and fasting mice (n = 3-4 per group). *** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05; fasting vs. fed and refed groups. DMH: dorsomedial nucleus of the hypothalamus.

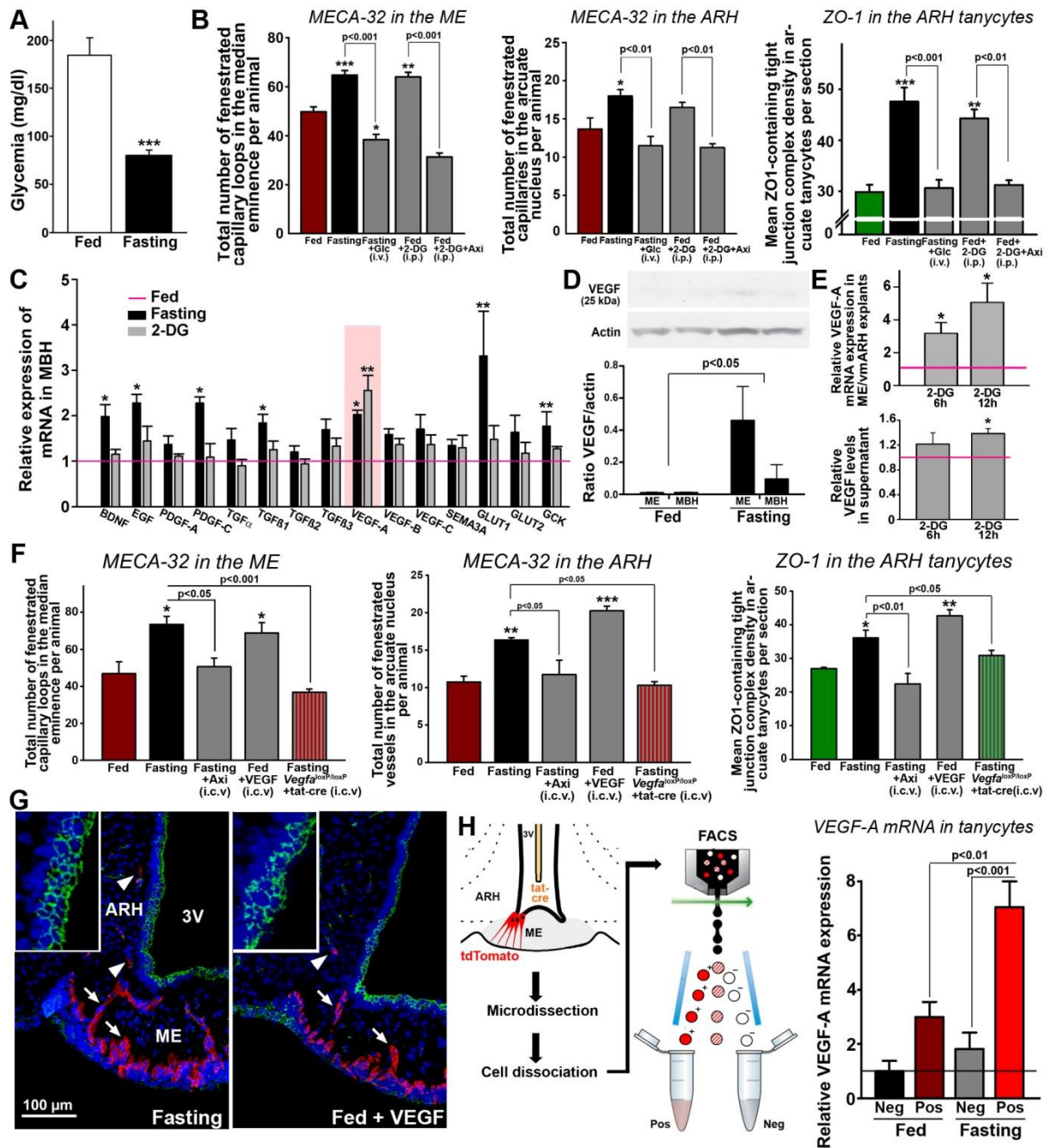


Figure 2. Fasting-induced BHB plasticity is mediated by glucose deprivation and tanyctic VEGF-A expression. (A) Blood glucose levels in fed and fasting mice ($n = 6$ per group). (B) Structural changes at the blood-CSF barrier in fasting mice infused with glucose (Glc; $n = 6$) or not ($n = 6$) and fed mice treated i.p. with 2-DG in the presence ($n = 4$) or absence of Axitinib (Axi; $n = 4$) compared to vehicle-treated fed mice ($n = 3$). (C) Real-time PCR analysis of genes involved in brain plasticity and glucosensing in the MBH of fasting and 2-DG-treated mice, normalized to values in mice fed *ad libitum* (red line) ($n = 4$ per group). (D) VEGF

accumulates in the ME and MBH of fasting mice, as seen by immunoblotting (n = 3 per group). (E) 2-DG application to ME/vmARH explants increases VEGF secretion when compared to vehicle (red line) (n = 4 per group). (F) Quantification of MECA-32 and ZO-1 immunolabeling in fasting wild-type or *Vegfa*^{loxP/loxP} mice infused i.c.v. with Axitinib (n = 4) or tat-cre recombinant protein (n = 4), and fed mice treated with VEGF (n = 4) or vehicle (n = 10). (G) MECA-32 (red) and ZO-1 (green) immunolabeling in fasting mice and fed mice treated with VEGF or vehicle. Long MECA-32-positive microvessel loops reach the ependymal layer of the ME (arrows); arrowheads: MECA-32-positive intrainfundibular loop reaching the ARH. (H) Tanycyte isolation by FACS and real-time PCR analysis of VEGF-A mRNA in Tomato-positive (pos; tanycytes) and -negative cells (neg) in fed and fasting mice (n = 4 each). *** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05; various treatment groups vs. untreated fed mice.

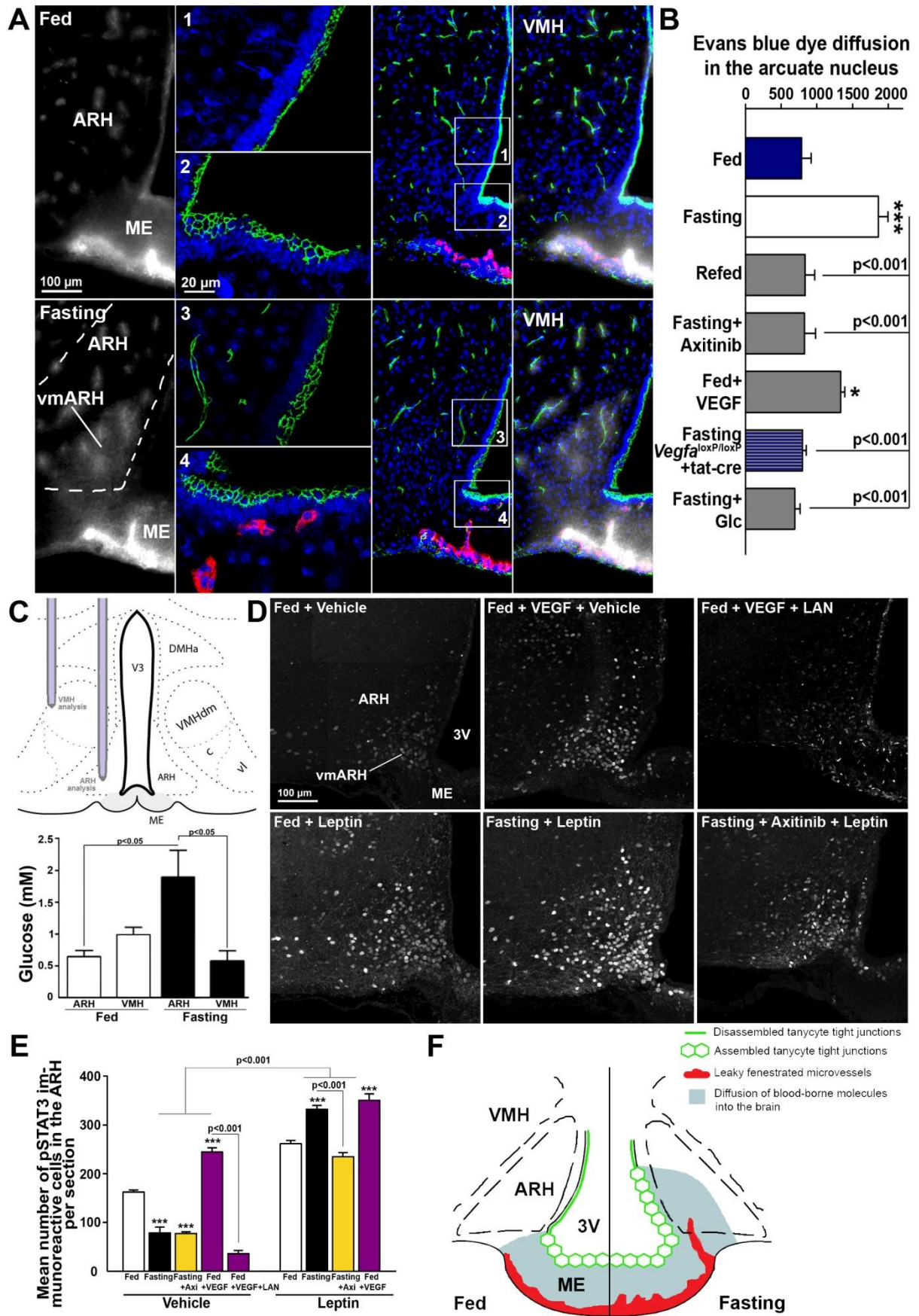


Figure 3. Fasting-induced structural changes at the BHB facilitate the access of blood-borne metabolic signals to the ARH. (A) Evans Blue dye diffusion (gray) and MECA-32 (red) and ZO-1 (green) immunolabeling in the hypothalamic tuberal region in fed and fasting mice. (B) Quantification of Evans Blue diffusion into the ARH in fasting mice infused with Axitinib (n = 4) or glucose (Glc; n = 5), food-deprived tat-cre-treated *Vegfa*^{loxP/loxP} mice (n = 4), fed VEGF-treated mice (n = 5), food-deprived mice after refeeding for 24h (Refed; n = 4) and vehicle-treated fed mice (n = 7). (C) Placement of microdialysis cannulae (upper panel) for the simultaneous measurement of ARH and VMH glucose levels in fed and fasting rats, reported in the bar graph (lower panel, n = 4-5 per group). (D) Distribution of pSTAT3 immunoreactivity (white) in coronal sections of the ARH in fed and fasting mice treated or not with VEGF and Axitinib (Axi) after the i.p. administration of leptin (n = 4 per group), LAN (n = 3) or vehicle (n = 3-4 per group). (E) Quantification of pSTAT3 immunoreactive cells. (F) Structural differences between the ME and ARH of mice fed *ad libitum* and fasting mice, and their effects on the diffusion of blood-borne signals into the brain. *** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05; various treatment groups vs. untreated fed mice.

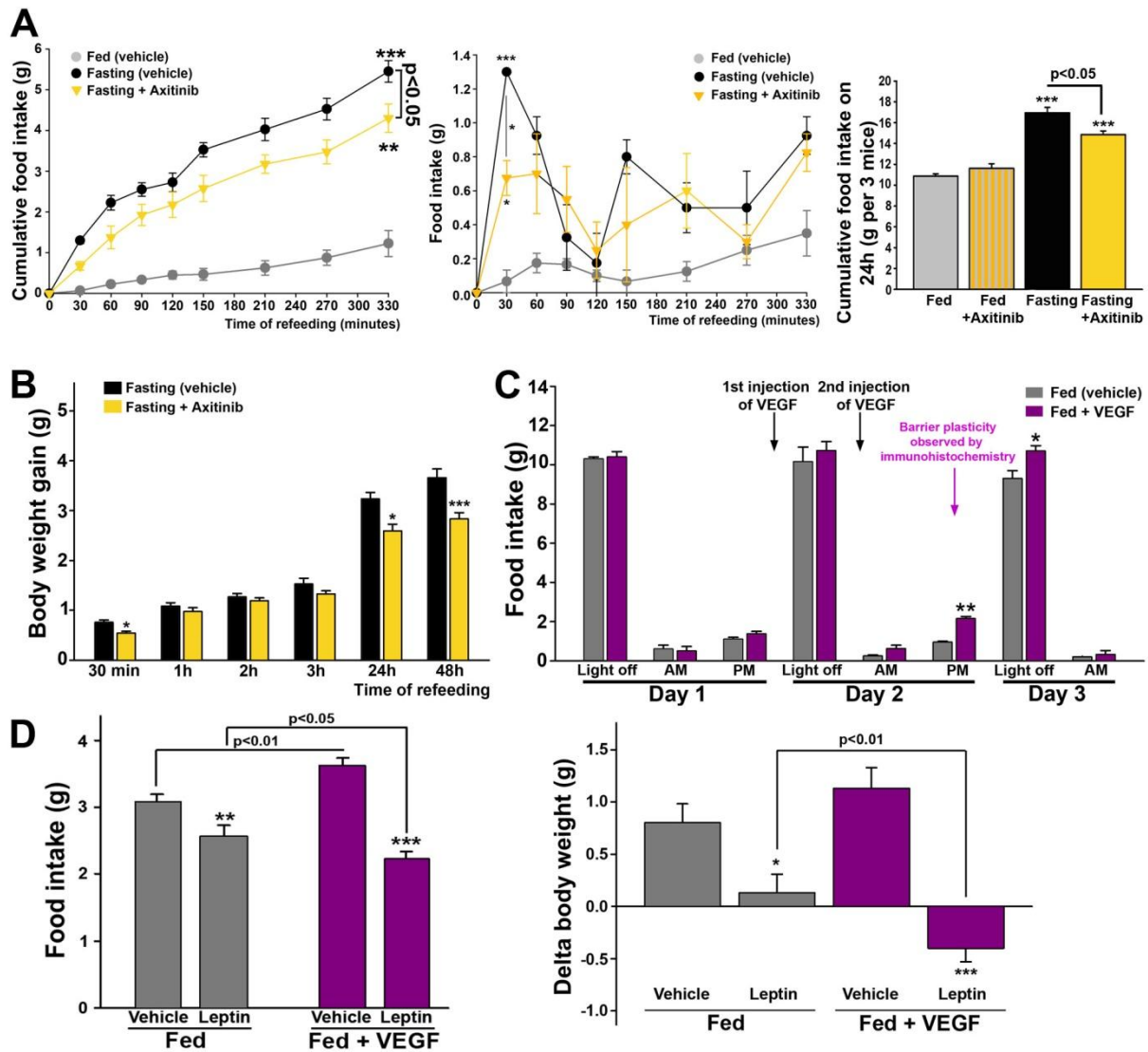


Figure 4. BHB plasticity modulates feeding behavior. (A) Cumulative and absolute food intake in fasting mice with or without i.p. Axitinib injection (orange; n = 4 per group) during refeeding after a 24h fast, and in vehicle-treated (gray; n = 4) or Axitinib-treated mice (gray and yellow stripes; n = 3-4) fed *ad libitum*. (B) Body weight gain during the first 48h of refeeding in mice previously food-deprived for 24h, and that were (orange; n =4) or not treated with Axitinib (black; n = 4). (C) Absolute food intake in mice fed *ad libitum* infused with VEGF (purple; n = 3) or not (gray; n = 4) for 3 days. (D) Anorectic and weight-loss-inducing effects of leptin and vehicle in mice fed *ad libitum* subjected to VEGF treatment or not (n = 10 per group). *** p<0.001; ** p<0.01; * p<0.05; various treatment groups vs. untreated fed mice.

ARTICLE 2: Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons

Ma seconde étude résulte d'une collaboration avec l'institut de génomique fonctionnelle de Montpellier. Elle concerne également l'accès des molécules périphériques, en l'occurrence d'une ghréline fluorescente, au noyau arqué hypothalamique via l'éminence médiane. La ghréline est une hormone fonctionnellement importante lors du jeûne : en effet, son taux augmente et son action sur les neurones du noyau arqué participe à l'induction d'une prise alimentaire. Son accès vers le noyau arqué représente donc une étape clé dans la régulation de la prise alimentaire.

Après son injection en intraveineuse, le passage de la ghréline fluorescente au niveau des fenestrations des vaisseaux de l'éminence médiane a été observé par microscopie bi-photon. De plus, des techniques d'immunohistochimie et de microscopie à fluorescence nous ont permis de déterminer la cible de cette ghréline fluorescente : suite à son entrée dans le parenchyme cérébral, elle se fixe sur des neurones présents dans l'éminence médiane et le noyau arqué. Les populations neuronales ciblées correspondent en partie aux neurones à NPY/AgRP et à POMC/CART. Enfin, ces mêmes expériences ont été réalisées chez des souris mises à jeun afin de déterminer si l'accès de la ghréline et les populations neuronales touchées sont modifiés lors d'un déséquilibre énergétique. Lors du jeûne, un plus grand nombre de neurones à NPY/AgRP fixe la ghréline. De plus, ces neurones sont préférentiellement situés à proximité de vaisseaux fenêtrés suggérant que ces derniers constituent une porte d'entrée pour les hormones périphériques vers le noyau arqué.

L'ensemble de ces données a fait l'objet d'une publication dans *PNAS*.

Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons

Marie Schaeffer^{a,b,c,1}, Fanny Langlet^{d,e,1}, Chrystel Lafont^{a,b,c}, Francois Molino^{a,b,c}, David J. Hodson^{a,b,c,2}, Thomas Roux^f, Laurent Lamarque^f, Pascal Verdié^g, Emmanuel Bourrier^f, Bénédicte Dehouck^{d,e,h}, Jean-Louis Banères^g, Jean Martinez^g, Pierre-Francois Méry^{a,b,c}, Jacky Marie^g, Eric Trinquet^f, Jean-Alain Fehrentz^g, Vincent Prévot^{d,e}, Patrice Mollard^{a,b,c,3}.

^aCNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34000 Montpellier, France; ^bINSERM, U661, F-34000 Montpellier, France; ^cUniversities of Montpellier 1 & 2, UMR-5203, F-34000 Montpellier, France

^dInserm, Jean-Pierre Aubert Research Center, U837, F-59000 Lille, France,

^eUniversité droit et santé de Lille, Faculté de Médecine, F59000 Lille, France

^fCisbio Bioassays, Parc Technologique Marcel Boiteux, BP 84175, 30200, Codolet, France,

^gCNRS, UMR 5247, Institut des Biomolécules Max Mousseron, Universities of Montpellier 1&2, Faculty of Pharmacy, F-34093 Montpellier cedex 5, France,

^hUniversité d'Artois, F-62800, Liévin, France

²Current address: Department of Medicine, Section of Cell Biology, Division of Diabetes Endocrinology and Metabolism, Imperial College London, London SW7 2AZ, United Kingdom.

¹M.S. and F.L. contributed equally to this work

³To whom correspondence may be addressed:

Dr. Patrice Mollard,

Department of Endocrinology, Institute of Functional Genomics, Montpellier
34094, France

Fax: +33467542432

Patrice.Mollard@igf.cnrs.fr

Running title: in vivo molecule entry into the metabolic brain

Conflict of interest statement:

The authors declare no conflict of interest.

ABSTRACT

To maintain homeostasis, hypothalamic neurons in the arcuate nucleus must dynamically sense and integrate a multitude of peripheral signals. Blood-borne molecules must therefore be able to circumvent the tightly-sealed vasculature of the blood-brain-barrier to rapidly access their target neurons. Yet, how information encoded by circulating appetite-modifying hormones is conveyed to central hypothalamic neurons remains largely unexplored. Using *in vivo* multiphoton microscopy together with fluorescently-labeled ligands, we demonstrate that strategic positioning of neurons in the vicinity of fenestrated capillaries allows rapid and nutrient-dependent sensing of ghrelin, one of the most versatile regulators of energy expenditure and feeding behavior. Thus, by virtue of its vascular connections, the hypothalamus is able to directly sense peripheral signals, modifying energy status accordingly.

ABBREVIATIONS

ARH: arcuate nucleus of the hypothalamus; ME: median eminence; 3V: third ventricle; NPY: neuropeptide Y, POMC: proopiomelanocortin; BBB: blood-brain barrier; GHS-R-1a: Growth Hormone Secretagogue Receptor-1a

INTRODUCTION

Continuous integration of peripheral signals by neurons belonging to the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) is critical for central regulation of energy balance and neuroendocrine function (1). To dynamically report alterations to homeostasis and ensure an appropriate neuronal response, blood-borne factors such as hormones must rapidly access the central nervous system (CNS). This is particularly evident in the case of food intake, which is regulated by a plethora of circulating satiety signals (2) whose levels fluctuate in an ultradian manner. Despite this, it remains unclear how key energy status-signaling hormones such as ghrelin can be rapidly sensed by target neurons to alter feeding responses (3). Elucidation of the mechanisms underlying molecule entry into the brain is important not only for understanding normal maintenance of homeostasis, but also how this is perturbed during common pathologies such as obesity and diabetes (4, 5).

Although molecule transport mechanisms within the ARH are poorly characterized, they likely assume one of two forms. Firstly, chronic feedback may be accomplished by uptake of circulating molecules into the ARH via saturable receptor-mediated transport at the level of the choroid plexus and/or blood-brain barrier (BBB) (6-9). Secondly, the ARH is morphologically located in close apposition to the median eminence (ME), a circumventricular organ composed of fenestrated capillaries. Since these vessels project towards the ventromedial ARH (vmARH), they could represent a direct vascular input for passive diffusion of peripheral molecules into the hypothalamus (10-13). So far, study of the functional importance of fenestrated capillaries in molecule entry into the metabolic brain has been impeded by lack of appropriate tools.

To evaluate the role of fenestrated ME/ARH capillaries in rapid detection of peripheral signals by the hypothalamus, we used a recently developed *in vivo* imaging approach to visualize in real-time the extravasation of fluorescent molecules (14). Ghrelin was chosen as a candidate hormone since it stimulates food intake through activation of appetite-modifying neurons resident in the ARH (15, 16), possesses a short circulating half life, and rapidly evokes feeding behavior (17). Thus, ghrelin-sensing needs to be rapid, largely precluding active transport processes.

Here, we show that circulating fluorescently-labeled ghrelin diffuses through fenestrated capillaries of the ME which project to the vmARH before rapidly binding and activating nearby neuropeptide Y (NPY) - and proopiomelanocortin (POMC) -expressing neurons, the two functionally opposing neuron populations implicated in regulation of feeding behavior. Furthermore, we demonstrate that this process is inherently plastic as it can be manipulated in a nutrient-dependent manner by simply employing a controlled fasting-refeeding paradigm. As such, the hypothalamus is able to monitor peripheral energy balance directly through its vascular inputs, allowing rapid organismal adaptation to prevailing metabolic state.

RESULTS

***In vivo* permeability of fenestrated vessels in the median eminence.**

To access deep structures on the ventral surface of the brain and directly visualize vessels of the ME *in vivo*, surgical approaches developed for functional imaging of the pituitary (14) were combined with a multiphoton microscope adapted with long-working distance (2 cm) objectives (Fig. 1A). A coronal view of the ME and the ARH is schematized in Fig. 1A (left panel), and a representative image of the median eminence vasculature (ventral view) is shown in Fig. 1A (right panel). Fluorescence intensity variations in the ME parenchyma were recorded *in vivo* following i.v. injection of fluorescent dextrans (Fig. 1B, Video S1), and a transient increase in fluorescence intensity could be detected in the parenchyma when molecules were able to diffuse through the capillaries (Fig. 1B). Fluorescence intensity variations over time post-injection in selected regions of interest were measured (color bars, Fig. 1B), allowing calculation of extravasation rates across fenestrated capillaries for each fluorescent molecule (Fig. 1C). Molecule size cut-off was below 70 kDa, with a step-like decrease in permeability rate between 20 kDa and 40 kDa (Fig. 1C) (n = 4-16 movies from 3-8 animals/molecule).

To investigate the transfer rate of ghrelin (3.3 kDa), a recently developed bioactive fluorescently-labeled ghrelin derivative (3.8 kDa), capable of specifically binding and activating Growth-Hormone Secretagogue Receptor-1a (GHS-R-1a) (18, 19), was employed. The extravasation rate of fluorescent ghrelin across the ME capillary barrier was comparable to that of 4 kDa FITC-conjugated dextran ($\approx 0.8 \mu\text{m/s}$) (Fig. 1C, Video S2) (n = 8 movies from 3 animals), suggesting that ghrelin extravasates passively but rapidly (second-range) through fenestrated capillary branches of the ME which are known to project to the vmARH (Fig. 2A, asterisk) (12, 13).

Ghrelin rapidly and specifically binds to neurons in the vicinity of fenestrated capillaries in the ARH.

We assessed rapid peptide binding in the vicinity of fenestrated capillaries projecting deeper within the ARH (Fig. 2A, asterisk), by injecting a bolus of bioactive fluorescent ghrelin i.v. before euthanizing animals 5-10 min later. Fluorescent ghrelin binding was localized to cell bodies in both the ME and vmARH, corresponding to hypothalamic HuC/D-positive neurons (100%, n = 18 slices from 3 animals) (Fig. 2B). Intracellular labeling was consistent with rapid internalization of Growth Hormone Secretagogue Receptor-1a (GHS-R-1a) bound to fluorescent-ghrelin (20). Supporting a functional role of fenestrated capillaries in fast hormone entry into the ARH was the observation that ghrelin-labeled neurons were located significantly closer to capillary branches which did not express the BBB marker Glut1 compared to BBB-protected Glut1-positive vessels (26.6 ± 1.6 vs. $100.8 \pm 2.9 \mu\text{m}$, mean \pm s.e.m., 123 to 250 neurons/animal, n = 4 animals) (Fig. 2C and D).

To assess whether fluorescent ghrelin could activate hypothalamic neurons *in vivo*, induction levels of the early gene activation marker cFos were measured following treatment (Fig. 3A). Two

hours post fluorescent ghrelin injection, an increase in cFos expression was observed in the ARH, comparable to that obtained following i.v. injection of native rat/mouse ghrelin and GHS-R-1a agonists JMV4336 and MK-0677 (Fig. 3A and B, n = 3 animals/condition). Specificity of fluorescent ghrelin binding was assessed by competition experiments using pre-treatment with excess native hormone or GHS-R-1a agonist; complete displacement of fluorescent ghrelin from neurons could be achieved (Fig. 3C, n = 3 animals/condition). In addition, injection i.v. of 25 nmoles of either fixable 3 kDa-rhodamine labeled dextran or inactive FITC-labeled ghrelin prior to sacrifice failed to label any cells in the ME/ARH region (n = 3 animals/condition).

Ghrelin labels primarily appetite-modifying neurons in a metabolic state-dependent manner.

To determine specificity of fluorescent ghrelin binding in known ghrelin-responsive neuron populations, we used neuropeptide Y (NPY)-eGFP transgenic mice (21) and performed immunostaining for β -endorphin, a marker of proopiomelanocortin (POMC)-neurons (16) (Fig. S1A). Out of the 340 \pm 19 (mean \pm s.e.m.) ghrelin-labeled neurons detected in the ARH (1200 μ m in length; divided into 24 slices, 50 μ m thick) (n = 11 animals, fed on standard chow), 35 \pm 4% and 41 \pm 3% corresponded to NPY- and β -endorphin-expressing neurons, respectively (n = 4 animals/group) (Fig. S1B). Of note, only a small proportion of the total NPY- and β -endorphin-expressing neuron population was labeled (up to 3%, n = 4 animals/group), suggesting that only a subset of neurons was targeted by ghrelin.

Finally, we investigated whether feeding status of the animals could alter fluorescent ghrelin binding, by subjecting animals to a controlled fasting-refeeding schedule. A significant increase in numbers of both total and NPY fluorescent ghrelin-positive neurons was detected in 24 h starved animals, and this could be reversed by refeeding the mice over a 24 h period (Fig. 4A and B) (n = 11 and 4 animals, respectively). By contrast, the number of ghrelin-labeled POMC neurons did not significantly vary (Fig. 4A and B) (n = 4 animals).

DISCUSSION

The regulation of a variety of homeostatic functions depends upon central integration of peripheral feedback signals. Brain-periphery cross-talk therefore requires tight control of molecule entry and/or dynamic sensing to adapt responses to physiological state. With obesity and diabetes reaching epidemic proportions, research efforts have focused on understanding how hormones such as ghrelin, insulin or leptin functionally target appetite-regulating neurons of the hypothalamus. However, the fundamental mechanisms by which peripherally-secreted hormones access hypothalamic neurons remain poorly characterized. By using tractable bioactive ghrelin together with *in vivo* multiphoton imaging techniques, we have uncovered a functional role for fenestrated vessels of the ME/ARH in rapid blood-borne molecule sensing by the metabolic brain. It is anticipated that these findings will not

only be valuable for understanding the basic mechanisms underlying appetite regulation, but can also be extended to a range of other homeostatic functions which rely on integration of peripheral signals by the CNS.

Fenestrated capillaries of the ME possess pores of 50-80 nm in diameter, encompassed by a permeable diaphragm composed of radial fibrils (22, 23). Passive molecule diffusion through fenestrae can be both size- and charge-limited (24), and it is reasonable to assume that the ME displays similar selectivity. To study passive diffusion of molecules and exclude other potential rate-limited transport mechanisms, it is necessary to follow the time course of events at the blood–brain interface in real-time. Using our approaches, we were able to show that relatively small circulating molecules (≤ 40 kDa in size) could freely and rapidly diffuse through fenestrated capillaries of the ME, a finding with implications for the study of non-receptor-dependent mechanisms of hormone and drug uptake into the CNS. Furthermore, as saturable transporters are modulated by physiological status and pathological conditions (25, 26), modifications in vessel permeability could constitute yet another level of regulation for molecule diffusion into the metabolic brain.

Since diffusion dynamics for inert sugars may differ from those for bioactive hormones, we investigated the diffusion of functional fluorescently-labeled ghrelin, a pleiotropic hormone for which mechanism of entry into the ARH remains elusive (27). Our results demonstrate that ghrelin also crosses fenestrated capillaries in the ME through passive diffusion. Although we cannot exclude a role for receptor-mediated transport processes, no specific ghrelin uptake mechanisms could be identified in the murine BBB (28), and the rate of transport of ghrelin across the BBB was much lower when studied by brain perfusion versus intravenous injection (29). In addition, ghrelin was found to rapidly (< 5 min) label neurons in the ARH. The close proximity of ghrelin-labeled neurons to fenestrated capillaries projecting from the ME into the ARH supports an important functional role for this vascular route in rapid molecule entry into the metabolic brain. Given that ME/ARH fenestrated capillaries are permissive for molecules as large as 20-40 kDa, it is not unfeasible that other key hormones involved in energy homeostasis such as leptin (16 kDa), insulin (5.8 kDa), or GLP-1 (4.1 kDa) might also use this vascular route to access metabolic-sensing neurons.

Reflecting its role in food intake regulation, fluorescent ghrelin primarily bound appetite-modifying NPY and POMC neurons, and cytoplasmic labeling was consistent with the rapid internalization of a receptor-hormone complex (20). Although numbers of ghrelin-labeled ARH neurons were relatively small ($\sim 3\%$ of the population), they are within the range of that recently shown to stimulate food intake (~ 300 neurons and above) (30). In addition, feeding status dynamically regulated the number of ghrelin-labeled neurons. While the number of POMC ghrelin-labeled neurons remained unchanged, as would be expected from a neuronal population which displays minimal activity in the fasted state (31), we observed a reversible increase in the number of NPY ghrelin-labeled neurons following 24 h fasting. These results appear to be consistent with the physiological necessity to secure robust feeding responses following a fasting period, the direct correlation between

quantity of ingested food and number of stimulated NPY neurons (30), and the increase in GHS-R-1a mRNA expression in the ARH following short-term fasting (32). The unique vmARH milieu irrigated by fenestrated capillaries may therefore not only support a population of “scout neurons” that are able to rapidly sense peripheral signals and coordinate more global responses, but may also provide a niche for the recently described ME-derived tanycytes shown to be involved in adult neurogenesis (33).

In summary, we have demonstrated that: 1) circulating hormones like ghrelin can freely and rapidly diffuse through fenestrated capillaries of the ME and into their site of action within the ventromedial ARH; 2) the number of labeled NPY neurons is compatible with that recently shown to underlie acute ghrelin effects on food intake (30); and 3) feeding status modifies the capacity of NPY neurons to bind ghrelin. The use of *in vivo* imaging in combination with the development of fluorescently-labeled ligands that retain biological activity could therefore help unveil access routes and *in vivo* neuronal targets not only for endogenous molecules, but also for novel appetite-modifying drugs intended for weight management.

MATERIALS AND METHODS

A brief outline is provided; for full details, see *SI Materials and Methods*.

Mice and *in vivo* surgery. C57BL/6 mice were purchased from Janvier-SAS (Le-Genest-St-Isle, France). NPY-eGFP mice (21) on a C57BL/6 background were sourced from the Jackson Laboratory (Maine, USA). In all experiments, 7 to 15 week-old male mice were used. All animal studies complied with the animal welfare guidelines of the European Community and were approved by the Direction of Veterinary Departments of Hérault and Nord, France (59-350134), and the Languedoc Roussillon Institutional Animal Care and Use Committees (CE-LR-0818). The median eminence (ME) was exposed using a surgery approach previously described for *in vivo* studies of the pituitary gland (17).

Long working distance multiphoton imaging of fluorescent molecule extravasation *in vivo*. Imaging of fluorescent molecule extravasation in the ME’s parenchyma *in vivo* was performed using a multiphoton microscope (Zeiss 7MP) adapted with a long-working distance objective M Plan Apo NIR ×20, 0.4 NA, 2.0 cm WD (Mitutoyo). Fluorescently-labeled molecules were injected through an indwelling jugular catheter. Recordings in areas rich in tortuous vessels at the level of the ME and at a depth between 15 and 40 μm below the meninges, were started at the time of injection. Details of extravasation rates calculation are provided in *SI Materials and Methods*.

Fluorescent hormones synthesis and binding *in vivo*. Both bioactive and inactive fluorescent ghrelin derivatives were developed by Cisbio Bioassays in collaboration with the Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier, France (18). Active fluorescent ghrelin (25 nmoles/animal) was injected i.v. into the tail vein or into the jugular vein under ketamine/xylazine anesthesia, and animals were

sacrificed 5 to 10 min post-injection, to assess *in vivo* binding. To test influence of metabolic state on ghrelin binding, active fluorescent-ghrelin (25 nmoles) was injected in either wild-type or NPY-eGFP mice (21) fed on standard chow (RM3, Special Diet Services), after 24 h of fasting, or after 24 h of fasting followed by a 24 h refeeding period, and animals were sacrificed 5 to 10 min post-injection.

Confocal imaging. Terminally anesthetized mice were perfused via the heart with 10 ml of PBS followed by 30 ml of 4% paraformaldehyde solution. In some experiments, vessels were labeled using rhodamine-labeled lectin (400 μ g per mouse, Vector Laboratories) diluted in the perfusate (PBS). Brains were collected and prepared for confocal imaging. Details are provided in *SI Materials and Method*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. B. Engelhardt for antibodies to MECA-32, Dr. P. Le Tissier and Prof. D. G. Grattan for useful comments on the manuscript, and P. Fontanaud, M. Asari, G. Osterstock, M. Granier and P. Samper for technical assistance. Authors were supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) (Gliodiabesity, PCV08_323168), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Universities of Montpellier 1 and 2, University of Lille 2, National Biophotonics and Imaging Platform (Ireland) (NBIPI), IBiSA, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Diabetes UK (RD Lawrence Fellowship), Institut Fédératif de Recherches No. 3 and 114, and Région Languedoc Roussillon (IPAM).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MS, PFM, VP, and PM designed experiments; MS, FL, and CL performed experiments; MS, FL, CL, FM and DJH performed analysis; TR, LL, EB, PV, JLB, JM, ET, and JAF synthesized and characterized ligands; MS, DJH and PM wrote the paper.

REFERENCES

1. Cowley MA, *et al.* (2001) Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411(6836):480-484.
2. Elmquist JK, Coppari R, Balthasar N, Ichinose M, & Lowell BB (2005) Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol* 493(1):63-71.
3. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, & Baskin DG (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778):661-671.

4. Schwartz MW, Peskind E, Raskind M, Boyko EJ, & Porte D, Jr. (1996) Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 2(5):589-593.
5. Wilding JP (2002) Neuropeptides and appetite control. *Diabet Med* 19(8):619-627.
6. Pi XJ & Grattan DR (1998) Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *J Comp Neurol* 394(4):462-474.
7. Banks WA & Lebel CR (2002) Strategies for the delivery of leptin to the CNS. *J Drug Target* 10(4):297-308.
8. Banks WA (2006) The blood-brain barrier as a regulatory interface in the gut-brain axes. *Physiol Behav* 89(4):472-476.
9. Skipor J & Thiery JC (2008) The choroid plexus--cerebrospinal fluid system: undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68(3):414-428.
10. Cheunsuang O, Stewart AL, & Morris R (2006) Differential uptake of molecules from the circulation and CSF reveals regional and cellular specialisation in CNS detection of homeostatic signals. *Cell Tissue Res* 325(2):397-402.
11. Palkovits M (2008) Stress-induced activation of neurons in the ventromedial arcuate nucleus: a blood-brain-CSF interface of the hypothalamus. *Ann N Y Acad Sci* 1148:57-63.
12. Ciofi P, *et al.* (2009) Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 150(12):5509-5519.
13. Ciofi P (2011) The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. *Neurosci Lett* 487(2):187-190.
14. Lafont C, *et al.* (2010) Cellular in vivo imaging reveals coordinated regulation of pituitary microcirculation and GH cell network function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(9):4465-4470.
15. Tschöp M, Smiley DL, & Heiman ML (2000) Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407(6806):908-913.
16. Cowley MA, *et al.* (2003) The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 37(4):649-661.
17. Grouselle D, *et al.* (2008) Pulsatile cerebrospinal fluid and plasma ghrelin in relation to growth hormone secretion and food intake in the sheep. *J Neuroendocrinol* 20(10):1138-1146.
18. Leyris JP, *et al.* (2010) Homogeneous time-resolved fluorescence-based assay to screen for ligands targeting the growth hormone secretagogue receptor type 1a. *Anal Biochem* 408(2):253-262.
19. Kern A, Albarran-Zeckler R, Walsh HE, & Smith RG (2012) Apo-ghrelin receptor forms heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2 agonism. *Neuron* 73(2):317-332.

20. Camina JP, *et al.* (2004) Desensitization and endocytosis mechanisms of ghrelin-activated growth hormone secretagogue receptor 1a. *Endocrinology* 145(2):930-940.
21. van den Pol AN, *et al.* (2009) Neuromedin B and gastrin-releasing peptide excite arcuate nucleus neuropeptide Y neurons in a novel transgenic mouse expressing strong Renilla green fluorescent protein in NPY neurons. *J Neurosci* 29(14):4622-4639.
22. Bearer EL & Orci L (1985) Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study. *J Cell Biol* 100(2):418-428.
23. Stan RV, Kubitza M, & Palade GE (1999) PV-1 is a component of the fenestral and stomatal diaphragms in fenestrated endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23):13203-13207.
24. Ballermann BJ & Stan RV (2007) Resolved: capillary endothelium is a major contributor to the glomerular filtration barrier. *J Am Soc Nephrol* 18(9):2432-2438.
25. Zlokovic BV, *et al.* (2000) Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology* 141(4):1434-1441.
26. Burguera B, *et al.* (2000) Obesity is associated with a decreased leptin transport across the blood-brain barrier in rats. *Diabetes* 49(7):1219-1223.
27. Fry M & Ferguson AV (2010) Ghrelin: central nervous system sites of action in regulation of energy balance. *Int J Pept pii*: 616757.
28. Banks WA, Tschop M, Robinson SM, & Heiman ML (2002) Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J Pharmacol Exp Ther* 302(2):822-827.
29. Banks WA, Burney BO, & Robinson SM (2008) Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. *Peptides* 29(11):2061-2065.
30. Aponte Y, Atasoy D, & Sternson SM (2011) AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci* 14(3):351-355.
31. Cone RD (2005) Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8(5):571-578.
32. Kim MS, *et al.* (2003) Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport* 14(10):1317-1320.
33. Lee DA, *et al.* (2012) Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci* 15(5):700-702.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. *In vivo* extravasation of molecules through fenestrated vessels in the median eminence.

(A) Schematic representation of the imaging set-up (left), and representative image of the median eminence (ME) vasculature acquired *in vivo* (right). Z-projection of a 100 μm stack. Green: 150 kDa dextran-FITC. Scale bar: 130 μm . (B) Fluorescence variation in the ME parenchyma at 2 time points post i.v. injection of fluorescent ghrelin (top), 4 kDa dextran (middle) and 70 kDa dextran (bottom). Fluorescence variations were measured in regions of interest (color bars). Scale bar: 20 μm . Green: FITC. (C) Molecule extravasation rate *in vivo* as a function of molecular weight (mean \pm s.e.m., n = 4-16 movies from 3-8 animals/molecule).

Figure 2. Fluorescent ghrelin binds to neurons in the ME/ARH region in proximity to BBB-free vessels.

(A, B, C) Confocal images of brain frozen sections 5-10 min post i.v. injection of fluorescent ghrelin (B, C). Scale bar: 100 μm . (A, B) Blue: nuclei (Hoechst). (A) Capillaries (rhodamine-lectin, red) in the ME/ARH express the fenestration marker MECA-32 (green) and project to the ARH (asterisk). (C) Fluorescent ghrelin (white) labels hypothalamic neurons (HuC/D, red). (C) Ghrelin-labeled neurons (white) are primarily located in the vicinity of vessels (CD31, red) not expressing the blood-brain barrier marker Glut1 (green) (pink arrowheads). (D) Distances between ghrelin-labeled neurons and nearest Glut1-negative or Glut1-positive vessel (>600 neurons, n=4 animals). Wilcoxon rank-sum test of medians (left) and Kolmogorov-Smirnov analysis of cumulative frequency distributions (bin size = 2.5 μm) (right) indicates ghrelin-labeled neurons are in closer vicinity to Glut1-negative vessels (**P < 0.001).

Figure 3. Fluorescent ghrelin activity and binding specificity.

(A, C) Representative confocal images of coronal sections of the ME/ARH region. 20 μm z-projections. Scale bar: 150 μm . (A) Fluorescent bioactive ghrelin induces cFos expression in the ARH. Images of brain slices from mice sacrificed 2h post i.v. injection of NaCl 0.9% (left panel), 25 nmoles inactive fluorescent ghrelin (middle panel), or 25 nmoles active fluorescent ghrelin (right panel). Blue: Hoechst, red: cFos. White arrows indicate cFos positive nuclei. (B) Quantification of the number of cFos positive nuclei in the ARH per 20 μm thick slice following treatment with different GHS-R-1a agonists. All active agonists induced cFos in a significant manner compared to saline or inactive ghrelin (One-way ANOVA, ***P < 0.001, n = 12-30 slices from 3 animals/condition). (C) Competition experiment. Injection i.v. of commercial ghrelin (rat, mouse) 15 min prior to i.v. injection of active fluorescent ghrelin prevented labeling of cell bodies in the ARH (right panel versus control left panel) (n = 3 animals/condition). White: active fluorescent ghrelin.

Figure 4. Fluorescent ghrelin labels NPY but not beta-endorphin-expressing neurons in a metabolic state-dependent manner. (A) Confocal images of ME/ARH region following i.v. injection of fluorescent ghrelin; NPY-eGFP transgenic mouse (top) (green: GFP) and beta-endorphin immunostaining (bottom) (red). Orange arrowheads indicate ghrelin-labeled (white) NPY (top) or beta-endorphin (bottom) neurons under control conditions (left panels), following 24 h fasting (middle panels), and 24 h fasting + 24 h re-feeding (right panels). Scale bar: 100 μ m. (B) Quantification of ghrelin-labeled neurons in the whole ME/ARH region under control conditions, following 24 h fasting, and 24 h fasting + 24 h re-feeding (15-24 slices/animal, n = 4-11 animals/condition). Numbers were normalized to correspond to total ME length (1200 μ m; 24 slices, 50 μ m thick). Fasting induced a significant increase in both total number and number of NPY ghrelin-labeled neurons, which was reversed by re-feeding (one-way ANOVA, ***P<0.001), while fasting had no significant effect on the total number of ghrelin-labeled beta-endorphin expressing neurons (one-way ANOVA, P>0.05).

Figure 1

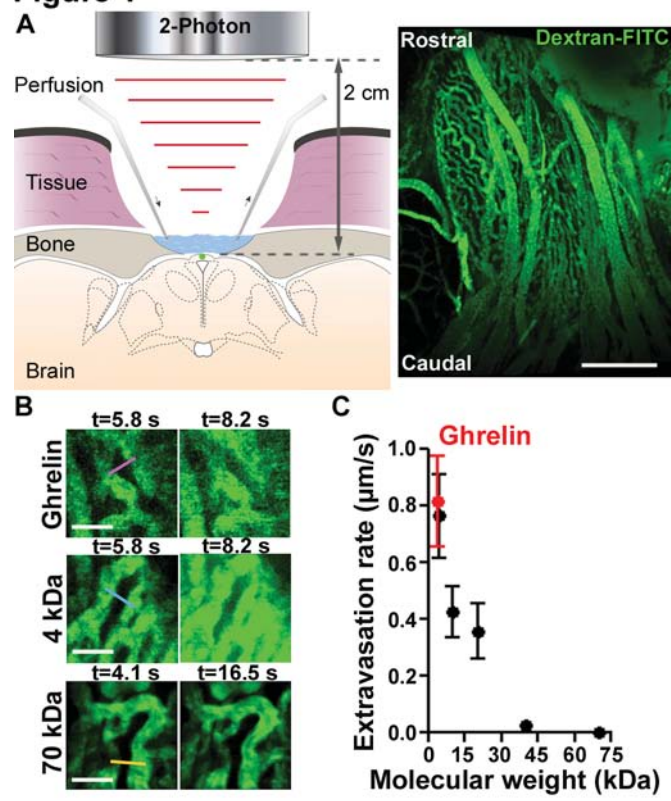
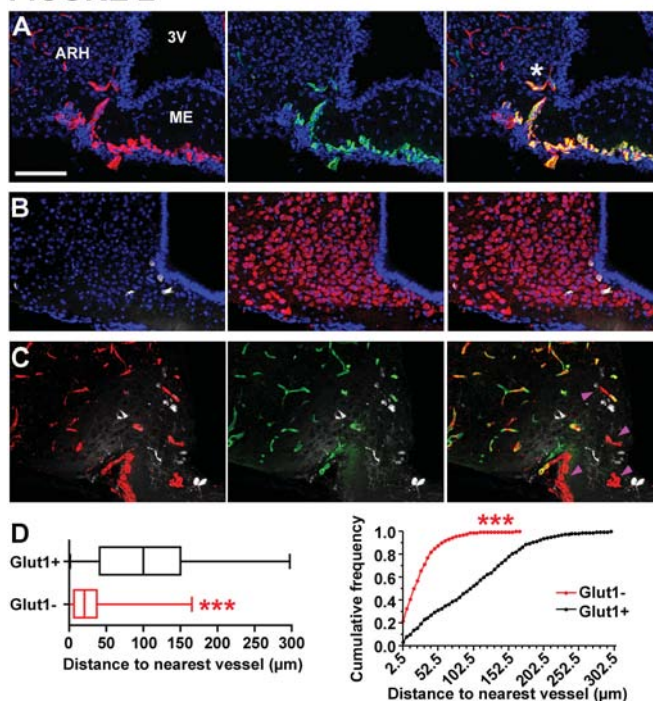


FIGURE 2



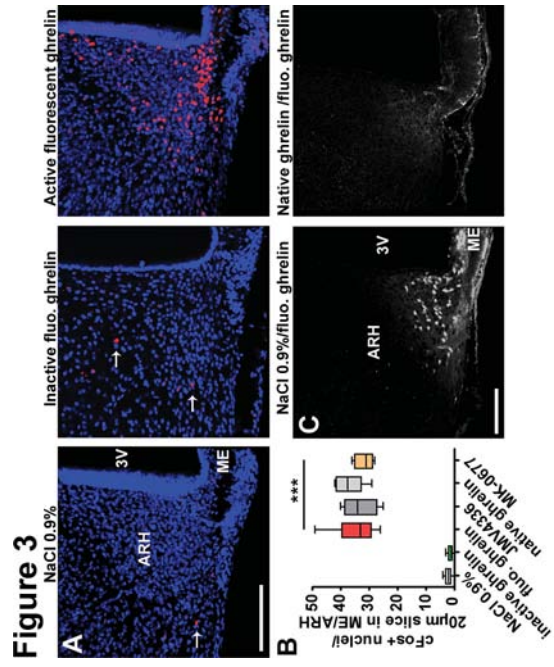
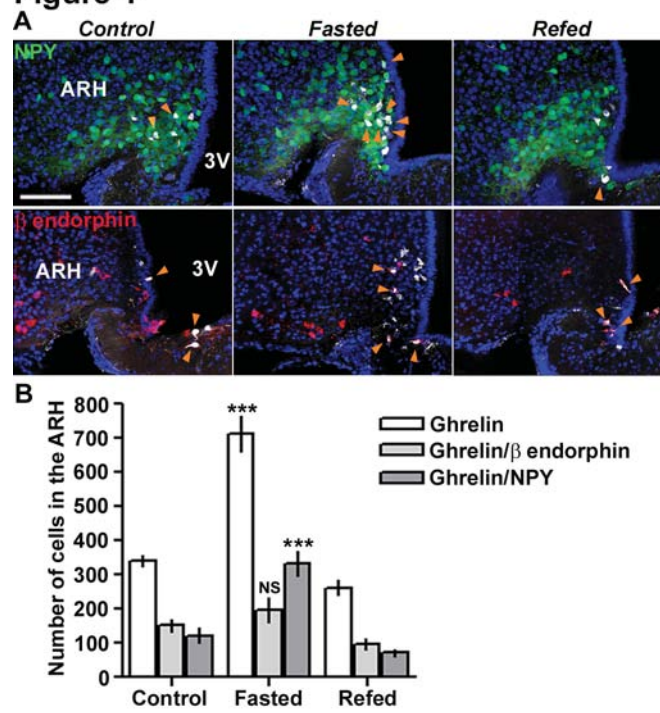


Figure 4



ARTICLE 3: Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain

Mes deux premières études ont porté sur le rôle de l'éminence médiane dans la régulation de la prise alimentaire étant donné sa proximité avec le noyau arqué. Cependant, d'autres organes circumventriculaires sont présents dans le système nerveux central et certains, comme l'organe subfornical ou l'area postrema, sont également impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Ma troisième étude a donc consisté à étudier l'organisation neuroanatomique de 4 autres organes circumventriculaires, à savoir l'organe vasculaire de la lame terminale, l'organe subfornical, l'organe subcommissural et l'area postrema. Pour cela, nous avons tiré partie de l'étude de Mullier *et coll.* publiée par le laboratoire en 2010 et comparé ces organes circumventriculaires à l'éminence médiane grâce à des techniques d'immunohistochimie.

Des similarités ont été retrouvées entre l'organisation de l'éminence médiane et celle des autres organes circumventriculaires. Comme décrit dans la littérature, nous avons observé des vaisseaux fenêtrés dans le parenchyme des organes circumventriculaires (excepté pour l'organe subcommissural). De plus, les cellules épendymaires longeant les ventricules de ces régions cérébrales possèdent un long prolongement cytoplasmique envoyé dans le parenchyme cérébral au contact des vaisseaux fenêtrés. Ces cellules épendymaires, morphologiquement semblables aux tanocytes de l'éminence médiane, expriment également des protéines de jonctions serrées organisées en nid d'abeille : la claudine 1, une protéine spécifiquement retrouvée au niveau des tanocytes de l'éminence médiane et des cellules épithéliales des plexus choroïdes, a notamment été observée. En parallèle, nous avons injecté un traceur, soit dans la circulation sanguine soit dans le ventricule latéral, qui a révélé que le mur ventriculaire au niveau des organes circumventriculaires est très étanche.

L'ensemble de ces données a fait l'objet d'une publication dans *Journal of Comparative Neurology*.

Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain

Fanny Langlet^{1,2,3}, Amandine Mullier^{1,2,3}, Sébastien G. Bouret^{1,2,3,4}, Vincent Prévot^{1,2,3} and Bénédicte Dehouck^{1,2,3,5*}

¹Inserm U837, JPARC Development and Plasticity of the Postnatal Brain, 59045 Lille cedex, France

²NEUROBESE International Associated Laboratory, 59045 Lille cedex, France

³Univ Lille Nord de France, School of Medicine, 59046 Lille cedex, France

⁴Neuroscience Program, The Saban Research Institute, Childrens Hospital Los Angeles, University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

⁵Univ Artois, Liévin, France

Abbreviated title: Tanycyte barrier in the circumventricular organs

Key Words: Ependymocytes, tight junction protein, area postrema, subfornical organ, subcommissural organ, organum vasculosum laminae terminalis

Grant support: This work was supported by funding from the NEUROBESE International Associated Laboratory (INSERM, SABAN, University of Lille2, to VP and SGB), the “Centre National de la Recherche Scientifique” (CNRS, to SGB), the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR, to VP – GLIODIABESITY - and to SGB – PROGRALEP and -LIPOBRAIN), the National Institute of Health (Grant DK84142), and the EU FP7 integrated project (grant agreement n° 266408, “Full4Health”), FL is a Ph.D. student supported by a fellowship from the French Department for Research and New Technologies.

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as an ‘Accepted Article’, doi: 10.1002/cne.23355

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Received: Dec 18, 2012; Revised: Apr 15, 2013; Accepted: Apr 25, 2013

*Correspondence to: Bénédicte Dehouck, Inserm U837, Bâtiment Biserte, Place de Verdun, 59045

Lille Cedex, France. Phone: +33 320-62-20-65. E-mail: benedicte.dehouck@inserm.fr

Accepted Article

Abstract

Tanycytes are highly specialized ependymal cells that form a blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier at the level of the median eminence (ME), a circumventricular organ (CVO) located in the tuberal region of the hypothalamus. This ependymal layer harbors well-organized tight junctions, a hallmark of central nervous system barriers that is lacking in the fenestrated portal vessels of the ME. The displacement of barrier properties from the vascular to the ventricular side allows the diffusion of blood-borne molecules into the parenchyma of the ME while tanycyte tight junctions control their diffusion into the CSF, thus maintaining brain homeostasis. In the present work, we combined immunohistochemical and permeability studies to investigate the presence of tanycyte barriers along the ventricular walls of other brain CVOs. Our data indicate that, unlike cuboidal ependymal cells, ependymal cells bordering the CVOs possess long processes that project into the parenchyma of the CVOs to reach the fenestrated capillary network. Remarkably, these tanycyte-like cells display well-organized tight junctions around their cell bodies. Consistent with these observations, permeability studies show that this ependymal layer acts as a diffusion barrier. Together, our results suggest that tanycytes are a characteristic feature of all CVOs and yield potential new insights into their involvement in regulating the exchange between the blood, the brain and the CSF within these “brain windows”.

Introduction

The circumventricular organs (CVOs) are atypical brain structures lining the third and fourth ventricles, and are found in the brain of all vertebrates. They play a role in regulating body homeostasis based on blood-brain communication (Gross and Weindl, 1987). In the CVOs, the blood-brain interface is formed by a rich capillary plexus harboring a fenestrated endothelium (Ciofi, 2011; Ciofi et al., 2009; Duvernoy and Risold, 2007) and lacking tight junction complexes, the hallmark of CNS barriers (Schulz and Engelhardt, 2005). This permits the two-way exchange of metabolic information: the delivery of neurohormones into the bloodstream by secretory organs, and the sensing of blood-borne molecules by neurons in sensory organs (Fry et al., 2007; Johnson and Gross, 1993; Prevot et al., 1998; Prevot et al., 2010). This circumventing of the blood-brain barrier by fenestrated vessels is why CVOs are described as “brain windows” (Gross and Weindl, 1987; Weindl and Sofroniew, 1981). However, several authors have noted that in the CVOs, the tight junction protein zonula occludens-1 (ZO-1) is expressed by ependymal as opposed to fenestrated endothelial cells (Petrov et al., 1994; Smith and Shine, 1992), suggesting that the barrier has been shifted from the vascular to the ventricular side. Recently, we carried out complementary immunohistochemical and permeability studies in the median eminence (ME), the neurohemal organ located in the tuberal region of the hypothalamus (Langlet et al., 2013; Mullier et al., 2010; Myers, 2013). This study revealed the barrier properties of a class of highly specialized ependymal cells called tanycytes, which line the third ventricle and are apposed to the fenestrated portal vessels of the ME. Unlike multiciliated ependymal cells, tanycytes are devoid of cilia but possess long processes that extend up to the perivascular space of the capillary network of the ME that they border with specialized end-feet (De Seranno et al., 2004; Prevot, 2002). Thus, the tanycyte ependymal domain links the ventricular and vascular compartments, forming a blood/cerebrospinal fluid (CSF) interface in the tuberal region of the hypothalamus.

In the ME, adhesion between adjacent tanycytes is mediated by a complex of various tight junction proteins, including ZO-1, occludin, claudin 5 and claudin 1, that prevent the free passage

of molecules through the paracellular pathway. The resultant displacement of the barrier from the vascular to the ventricular surface of the CVOs allows the diffusion of blood-borne molecules through the permeable vasculature into the parenchyma of the ME, while tanycyte tight junctions control their diffusion into the CSF, thus maintaining brain homeostasis (Langlet et al., 2013; Mullier et al., 2010).

Intriguingly, the anatomical structure controlling blood-brain exchanges in other brain CVOs (ie sensory and secretory structures lining the third and fourth ventricles) remains unknown. Based on our recent findings (Mullier et al., 2010), the present work combines immunohistochemical and permeability studies to test for the presence of tanycyte barriers along the ventricular walls of the organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), the subfornical organ (SFO), the area postrema (AP) and the subcommissural organ (SCO).

Materials and methods

Animals and tissue preparation

Twelve 2-3 months male C57BL/6 mice (Charles River, France) were used in this study. Animals were housed in a temperature-controlled room (21-22°C) under a controlled light cycle (12 hours on/12 hours off) and provided with food and water *ad libitum* (Special Diet Services, RM3, 801180). All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of November 24th, 1986 (86/609/EEC) regarding mammalian research and in compliance with INSERM guidelines for the care and the use of laboratory animals. Moreover, animal experimentation protocols were approved by the Directorate of Veterinary Departments of the North Region.

Mice (n=6) were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of a Ketamine/Xylazine solution (100mg/kg and 20mg/kg, respectively). For most immunohistochemical studies, three animals were perfused transcardially with 0.9% saline and their brain quickly removed, embedded in ice-cold OCT medium (Optimal cutting temperature embedding medium, Tissue Tek®, Sakura, France, Villeneuve d'Ascq), frozen in isopentane (-55°C) and stored at -80°C until use. For the detection of detyrosinated tubulin, three animals were perfused transcardially with 0.9% saline followed by an ice-cold solution of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4. The brains were quickly removed, postfixed in the same fixative for 2 hours at 4°C, and immersed in 20% sucrose in 0.02 M phosphate buffered saline (PBS) at 4°C overnight. The brains were finally embedded in ice-cold OCT and frozen on dry ice.

Immunohistochemistry

Brains were cut into 20 µm-thick coronal or sagittal sections and processed for immunohistochemistry as described previously (Mullier et al., 2010). Briefly, slide-mounted sections were (1) fixed by immersion for 1 minute in methanol/acetone (vol/vol) at -20°C or for 10 minutes in 2% paraformaldehyde at 4 °C for HuC/D neuronal immunolabeling; (2) blocked for 30

minutes using a solution containing 4% normal goat serum and 0.3% Triton X-100; (3) incubated overnight at 4°C with primary antibodies followed by 1h at room temperature with a cocktail of secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies (1:500, Molecular Probes, Invitrogen, San Diego, CA); (4) counterstained with Hoechst (1:10000, Molecular Probes, Invitrogen), and coverslipped using Mowiol (Calbiochem, USA). For triple immunofluorescence labeling experiments, anti-vimentin antibodies were visualized using a biotinylated goat anti-chicken antibody (1:500, 1h at room temperature; Vector Laboratories, Burlingame, CA) and AMCA-conjugated streptavidin (1:500, 1h at room temperature; Vector Laboratories).

Antibody characterization

All primary antibodies used are listed in Table 1.

The zonula occludens-1 (ZO-1) antiserum stained the expected band of 225 kDa molecular weight on Western blots of mouse brain (Beauchesne et al., 2009; Stamatovic et al., 2005) and produced a pattern of staining in endothelial cells (Fig. 3, empty arrow), choroids plexus (Fig. 3E, 8C) and tanycytes of the median eminence (Fig. 3B, 8A) similar to that described elsewhere in the literature (Mullier et al., 2010; Smith and Shine, 1992; Wolburg et al., 2001).

The occludin antiserum stained the expected band of 65kDa molecular weight on Western blots of mouse brain (Beauchesne et al., 2009; Koedel et al., 2002), and stained a pattern of membrane-associated structures in endothelial cells (Fig. 4A, empty arrow) and choroid plexus (Fig. 5A) that is identical with previous reports (Hirase et al., 1997; Mullier et al., 2010).

The claudin 1 antiserum had been previously characterized for immunocytochemical use by others in claudin 1 knockout mice (Furuse et al., 2002), and stained apical membrane associated structures that exhibit the classical morphology of tight junction protein complexes (Fig. 4F, arrow) that is identical with previous reports (Mullier et al., 2010; Wolburg et al., 2001).

The detyrosinated tubulin antiserum (Gundersen et al., 1984) was shown to stain microtubules in neural tissue (Paturle-Lafanechere et al., 1994), ependymal cilia (Mullier et al., 2010), and primary

cilia *in vitro* (Gundersen and Bulinski, 1986).

The vimentin antiserum produced a pattern of staining similar to that described elsewhere by others (Kameda et al., 2003; Mullier et al., 2010; Prevot, 2002; Sanchez et al., 2009) (Fig. 1).

The MECA 32 antiserum (Leppink et al., 1989) was raised against a mouse endothelial cell surface antigen as described previously by others (Streeter et al., 1988). This antibody has been shown to selectively recognize fenestrated capillaries in the circumventricular organs (Fig 1) and the choroid plexus (Fig. 1E) (Hallmann et al., 1995; Schulz and Engelhardt, 2005). It was a generous gift from Professor Britta Engelhardt (University of Bern, Switzerland).

The mouse monoclonal anti-HuC/D antibody is prepared against human peptide QAQRFRLDNLN-C-KLH conjugate. The antiserum recognized the Elav family members HuC, HuD and Hel-N1, which are all neuronal proteins. The antibody labeled neuronal cell nuclei and and perikarya (Caron et al., 2010; Ciofi et al., 2009). The expression pattern of HuC/D proteins was similar to that of reported mRNA (Allen Brain Atlas).

Rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP, Dako, Z0334) was produced from purified bovine spinal cord isolate (manufacturer's information). Specificity of this antibody in mouse brain has been confirmed by immunohistochemistry in GFP Knockout mice (Hanbury et al., 2003). The antibody produced a pattern of staining similar to that described elsewhere by others ((Castellano et al., 1991). Chicken polyclonal antibody against GFAP (Millipore, AB5541) was produced from purified bovine GFAP and recognizes bands of 50 and 55 kDa on mouse brain homogenates in western blot analysis (manufacturer's information). The staining pattern of this antibody was identical to that of rabbit polyclonal antibody against GFAP (Dako, Z0334).

Permeability assays

Mice were subjected to intravenous (i.v.) (n = 3) or intracerebroventricular (i.c.v.) (n = 3) injections of Evans blue (Sigma), as described previously (Mullier et al., 2010). Briefly, unanesthetized animals received an injection of Evans blue solution (50 µl; 1% in saline) into the tail vein and were

killed by decapitation 20 minutes later. For i.c.v. injections, 2 μ l of 0.1% Evans blue solution was injected over 2 min into the left lateral ventricle (1 mm lateral and 0.3 mm posterior to the Bregma, according to the mouse brain atlas of Paxinos & Franklin, 2001) using an infusion pump (KD Scientific, Holliston, MA). The cisterna magna was then exposed to the atmosphere and the mice killed by decapitation. Brains were quickly removed, frozen in O.C.T. and stored at -80°C until use. Serial coronal and sagittal sections, 20 μm -thick, were cut and mounted onto slides. Evans blue staining was directly visualized in these sections and imaged using a fluorescent microscope. The sections were then fixed with methanol/acetone (vol/vol) at -20°C for 1 minute, dried at room temperature and processed immediately for immunohistochemistry.

Microscopic analysis

Sections were analyzed using an Axio Imager.Z1 ApoTome microscope, equipped with a motorized stage and an AxioCam MRm camera (Zeiss, Germany). Specific filter cubes were used for the visualization of green (EX: 475/40 nm, DM: 500nm, BA: 530/50nm), red (EX: 550/25 nm, DM: 570nm, BA: 605/70nm), and blue (Hoechst or AMCA, amino-methyl-coumarin-acetate) fluorescence (EX: 365 nm, DM: 395nm, BA: 445/50nm).

To create photomontages, single-plane images were captured using the MosaiX module of the AxioVision 4.6 system (Zeiss, Germany) and a Zeiss 20X objective (N.A.0.8) for each fluorophore sequentially, or using a Zeiss 5X objective (N.A.0.16) for Hoechst counterstaining. High-magnification microphotographs represent maximal intensity projections derived from 18-22 triple-ApoTome images collected using the z-stack module of the AxioVision 4.6 system and a Zeiss 40X or 63X oil-immersion objective (N.A. 1.3 and N.A. 1.4, respectively). All images were captured in a stepwise fashion over a defined z-focus range corresponding to all visible fluorescence within the section and consistent with the optimum step size for the corresponding objective and the wavelength (500 nm).

Adobe Photoshop (Adobe Systems, San Jose, CA) was used to process (i.e. adjust brightness and contrast) and merge images.

Accepted Article

Results

Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT), subfornical organ (SFO), area postrema (AP) and median eminence (ME)

First, we investigated the presence of tanycyte-like cells in the CVOs by examining the morphology of vimentin-positive ependymal cells lining their ventricular walls, and the association of these cells with fenestrated capillaries (Fig.1). Intense vimentin immunoreactivity was seen throughout the lining of the third and fourth ventricles, including the ependymal cells bordering the CVOs. In the parenchyma of the CVOs, vimentin immunolabeling revealed long and slender fibers extending from the ependymal cell bodies towards MECA 32-positive fenestrated capillaries, where they formed a dense network surrounding these capillaries. These results suggest that the ventricular walls of the OVLT, SFO and AP is formed by process-bearing ependymal cells that link the ventricular and fenestrated-blood-vessel compartments, as described in the ME (Fig. 1B). Furthermore, unlike multiciliated cuboidal ependymal cells, ependymal cells of the CVOs do not appear to possess any cilia on their apical surfaces, as no immunoreactivity for deetyrosinated tubulin was observed along the ventricular wall of the CVOs (Fig.2).

The characterization of these tanycyte-like cells was extended by an analysis of tight junction complexes along the ventricular walls of the CVOs (Fig. 3, 4, 5, 6 and Table 2). The expression and distribution of three tight junction proteins known to play key functional roles in CNS diffusion barriers - namely zonula occludens-1 (ZO-1), occludin and claudin 1- were examined (Abbott et al., 2010; Mullier et al., 2010). ZO-1 and occludin immunolabeling was observed at the level of cells lining the third and fourth ventricles, including the specialized ependymal cells that form the ventricular wall of the CVOs. High-magnification images showed that ZO-1 and occludin immunoreactivity formed a continuous belt around the cell bodies of vimentin-positive ependymal cells, giving rise to a honeycomb-like shape. Although this honeycomb pattern was observed along the entire ventricular wall, there was a distinct increase in signal strength at the level of the tanycyte-like cells forming the ventricular wall of the CVOs, when

compared to cuboidal ependymal cells lining adjacent structures (Table 2). The distinction between these two cell types – tanycyte-like cells versus multiciliated cuboidal ependymal cells - was also revealed by claudin 1 immunoreactivity, which was restricted to the ependymal cells lining the CVOs (Fig. 4-6). Claudin 1 immunoreactivity also exhibited a honeycomb pattern, similar to that of ZO-1 and occludin. These data demonstrate the differential expression patterns of tight junction proteins in the tanycyte-like cells bordering the CVOs versus cuboidal ependymal cells.

To determine whether tight junction protein expression patterns reflect diffusion barriers, mice were injected with Evans blue dye into either the tail vein or the lateral ventricle of the brain, as described in the materials and methods (Fig.7). After i.v. injection, the dye was restricted in most brain regions to the vascular bed of blood-brain barrier capillaries – known to possess highly efficient tight junctions - and to the endothelium of the choroid plexi - known to be surrounded by an epithelial barrier. Interestingly, the dye was also found surrounding the fenestrated vascular bed and throughout the parenchyma of the CVOs, where HuC/D immunoreactive neurons reside (Fig. 7). Importantly, the Evans blue dye had diffused up to the ventricular walls of the CVOs, reaching the tanycyte-like cell bodies that display the honeycomb pattern of ZO-1, occludin and claudin 1 immunoreactivity. In contrast when the dye was injected into the lateral ventricle, both the ventricular walls and the parenchyma of the CVOs remained dye-free, whereas the Evans blue dye was seen in ependyma lining the third and fourth ventricles outside of the CVOs. These data suggest that the highly specialized ependymal cell domain that forms the ventricular wall of the OVLT, SFO and AP displays barrier properties.

We next investigated the distribution of astrocytes, known to mediate blood-brain barrier properties in the CNS, by studying GFAP immunoreactivity (Fig. 8). As expected, GFAP immunoreactivity was observed throughout the nervous tissue, with a denser signal around brain capillaries. GFAP immunoreactivity was also detected throughout the parenchyma of the CVOs. However, this labeling was more intense close to the ventricular surface of the CVOs, where it formed a dense

ribbon associated with the cell bodies of tanycyte-like cells displaying a honeycomb pattern of tight junction proteins (Fig. 8).

Subcommissural organ (SCO)

As described in the literature, immunolabeling for HuC/D revealed the absence of neural cells in the parenchyma of the SCO (Fig.7). Another known characteristic of the SCO is the absence of MECA 32 immunoreactivity (Fig. 1 and 9). Consequently, following the permeability study, no blood-derived Evans blue dye was noted in the SCO parenchyma (Fig. 7). The vimentin immunoreactivity revealed tall elongated cells delimiting the SCO in the nervous tissue (Fig. 1, 2, 3 and 9). Their long cytoplasm extended towards the ventricular lumen and lined the ventricular wall (Fig. 9). These cells display also vimentin-positive basal processes extending into brain parenchyma (Fig. 1, 3, 9) and for few of them projecting to BBB capillaries (Fig. 9). Interestingly, detyrosinated-tubulin-positive structures were associated with the apical poles coating the ventricular wall of the SCO. An examination of tight junction protein expression showed intense ZO-1, occludin and claudin 1 immunolabeling at the wall of the third ventricle connecting the vimentin-positive protruded apical poles (Fig. 2 and 9). Tight junction proteins exhibited a similar pattern of expression when compared to the other CVOs: indeed, high-magnification images reveal the honeycomb pattern of tight junction protein immunoreactivity bordering the third ventricle (Fig. 2 and 9). Ependymal cells displaying this honeycomb pattern were associated with the distribution of GFAP-positive cells, since GFAP immunolabeling formed a dense ribbon around SCO ependymal cell bodies. Moreover, GFAP is also present in some SCO ependymal cells (Fig.8).

Figure 10 summarizes the localization and features of the tanycyte-like cells in the CVOs.

DISCUSSION

Brain homeostasis requires the maintenance of barriers between the brain and the periphery, enforced by brain microvessels in the blood-brain barrier and epithelial cells in the choroid plexi. In the present study, we provide evidence that CVOs - often described as “brain windows” - also possess a blood-CSF barrier at the ventricular wall composed of tanycyte-like cells. This barrier facing the fenestrated vessels of the CVOs may confine blood-borne molecules to these “brain windows” and prevent their diffusion into the cerebrospinal fluid, thus controlling their diffusion to the rest of the brain.

Tanycytes are highly specialized ependymal cells that have mainly been described in the ME, the CVO located in the tuberal region of the hypothalamus (Akmayev and Fidelina, 1976; 1981; Akmayev et al., 1973; Akmayev and Popov, 1977; Rodriguez et al., 2005). The presence of tanycytes has been also suggested in the AP and the OVLT (Del Brio et al., 1990; Gotow and Hashimoto, 1979; Maolood and Meister, 2009). Here, our observations confirm that ependymal cells that form the ventricular wall of the OVLT, SFO and AP, share some morphological and functional features with tanycytes that have been described in the ME. In contrast with multiciliated cuboidal ependymal cells, these tanycyte-like cells are devoid of cilia, and possess long processes that extend into the parenchyma of the CVOs to reach the fenestrated capillary network (Mullier et al., 2010; Weindl and Joynt, 1972). Moreover we have shown that these tanycyte-like cells are immunoreactive for occludin, zonula occludens-1 (ZO-1), and claudin 1, three tight junction proteins known to play key functional roles in CNS diffusion barriers, and that have been already described in the blood-CSF barrier of the median eminence (ME) (Abbott et al., 2010; Mullier et al., 2010). Remarkably, claudin 1 expression is restricted to the ependymal cells of the CVOs, as no immunoreactivity is detected in blood-brain barrier capillaries or in ciliated ependymal cells. These results are consistent with our previous data showing that claudin 1 expression characterizes

ependymal cells in close contact with fenestrated vessels, e.g. tanycytes in the ME and epithelial cells in the choroid plexi. Occludin, ZO-1, and claudin 1 proteins encircle each tanycyte-like cell in the ependymal layer, giving rise to the honeycomb pattern of tight junction proteins (Mullier et al., 2010; Petrov et al., 1994) associated with barrier properties (Coisne et al., 2005; Mullier et al., 2010; Wolburg et al., 2001). Consistent with these neuroanatomical observations, the diffusion marker Evans blue, when injected directly into the CSF, reaches the ventricular wall of the CVOs without penetrating the ependymal layer composed of tanycyte-like cell bodies, demonstrating that these specialized ependymogial cells are joined at their apices by functional tight junctions. In contrast, the Evans blue dye was seen in the ependyma, which cover the ventricular walls outside of the CVOs. This diffusion is associated with weak and discontinuous ZO-1 and occludin immunoreactivity (Del Bigio, 1995; Petrov et al., 1994). These findings are consistent with those from the ME (Mullier et al., 2010). Importantly, this highly specialized ependymal layer with barrier properties is composed of tanycyte-like cells that are in contact with the fenestrated vessels of the CVOs. The vasculature of the CVOs differs from typical brain vessels in that they harbor a fenestrated endothelium that lacks tight junction complexes (Maalood and Meister, 2009). This structural characteristic and the presence of various blood-borne molecules in the parenchyma of the CVOs indicate the enhanced permeability of this type of vasculature (Broadwell et al., 1983; Ciofi, 2011; Morita and Miyata, 2012). In this study, we combined both neuroanatomical investigations - using antibodies to the neuronal marker HuC/D and to the marker for fenestrated capillaries, MECA 32 - and the assessment of vascular permeability. After injection into the blood, the diffusion marker Evans blue was found in the parenchyma of the OVLT, SFO and AP, matching the localization of fenestrated vessels and the distribution of neuronal cell bodies. These results confirm the permeability of the fenestrated vessels (Morita and Miyata, 2012) and are consistent with the proposed role of these OCVs in sensing blood-borne molecules and conveying the information they contain to other brain regions (Johnson and Gross, 1993). However, our findings show that in the CVOs, the blood-CNS barrier subverted by the fenestrated endothelium is in fact

shifted from the vascular to the ventricular side, where it takes the form of a tanyocyte-like barrier. This displacement allows the diffusion of blood-borne molecules into the parenchyma of the CVOs, while controlling the access of these peripheral molecules to the rest of the brain by preventing their diffusion into the CSF.

Tight junctions, described here as complexes that prevent diffusion through the paracellular cleft, are also known to contribute to cell polarity by restricting the migration of apical and basolateral membrane components. In this way, tight junctions maintain the spatial cues necessary for the establishment of receptor-mediated transcytosis across the blood-brain barrier and the epithelium of the choroid plexi (Cerejido et al., 1998; Shin et al., 2006). The presence of effective tight junctions together with neuroanatomical studies showing the presence of microvilli (Klara and Brizzee, 1975; 1977), bulbous protrusions at the ependymal surface of CVOs (Mestres and Rascher, 1994), as well as of vesicles within the ependymal cells bordering the CVOs (Akmayev and Popov, 1977; Gotow and Hashimoto, 1979; Peruzzo et al., 2004; Rodriguez et al., 2005) suggest that, like other CNS barriers, the tanyocyte barrier is also capable of transporting macromolecules between the blood and CSF compartments via transcytosis.

Since the CNS barrier in the CVOs is composed of tanyocyte-like cells that directly contact permeable fenestrated capillaries, it is possible that its barrier properties are related to this distinct anatomical feature. In addition, our study indicates that the CVOs also contain many GFAP-immunoreactive cells, as reported in the literature (Bennett et al., 2009). The rich astrocyte population of the CVOs could also participate to the establishment of the tanyocyte barrier. Indeed, studies show that astroglial cells play an important role in the integrity of the blood-brain barrier (Abbott et al., 2006; Dehouck et al., 1994; Goldstein, 1988). Moreover, astrocytes may play a key role in the functioning of the CVOs because they are implicated in the generation and regulation of the flow of information within the brain through their control of both synaptic transmission and neurosecretion (Prevot, 2002; Prevot et al., 2010; Theodosis et al., 2008).

Our study included the SCO, considered a CVO in spite of its lack of fenestrated vessels. We show that the SCO displays vimentin-positive elongated cells as described in the literature (Chouaf et al., 1989; Didier-Bazes et al., 2001). These cells display apical long cytoplasm forming the ventricular wall (Meiniel, 2007) and basal processes extending into brain parenchyma and for few of them projecting to BBB capillaries (Rodriguez et al., 1984; Rodriguez et al., 1992; Rodriguez et al., 1998). Tight junctions are located at the apical pole of the ependymal cells with the typical honeycomb pattern. Our study supports the view that the SCO is sequestered within a double-barrier system (Rodriguez et al., 1992; Rodriguez et al., 1998) and supplements the work of Szathmari and co-authors, who demonstrated claudin 3 immunoreactivity in ependymal cells of the SCO (Szathmari et al., 2012). Importantly, in contrast with the ependymal cells of other CVOs, ependymal cells in the SCO display numerous cilia that coat the ventricular wall and project into the ventricular lumen (Meiniel, 2007). These results corroborate the view that this CVO is involved in the secretion of substances into the CSF (Rodriguez et al., 1986; Vio et al., 2008).

To our knowledge, this is the first detailed study that combined both anatomical investigation and the assessment of vascular/ependymal permeability to demonstrate the barrier properties of CVOs in the adult mouse brain. Our data are consistent with the description of CVOs as “brain windows“, but extend this description to the potential role of tanycytes at these ventricular interfaces, where they regulate the exchange between the blood, brain and CSF. The tanycyte barrier could thus contribute to the delivery of blood-borne molecules conveying metabolic information to the sensory neurons of the CVOs while ensuring brain homeostasis.

Other Acknowledgements

MECA 32 antibodies were kindly provided by Professor Britta Engelhardt (Switzerland). We thank Doctor. S. Rasika for the editing of our manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Role of authors

Study concept and design: BD and VP. Acquisition of data: FL and AM. Analysis and interpretation of data: FL and BD. Drafting of the manuscript: FL and BD. Critical revision of the manuscript for important intellectual content: SGB and VP. Obtained funding: SGB and VP. Study supervision: BD.

Accepted Article

LITERATURE CITED

- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 37(1):13-25.
- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. 2006. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7(1):41-53.
- Akmayev IG, Fidelina OV. 1976. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VI. The tanycytes: their relation to the sexual differentiation of the hypothalamus. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res* 173(3):407-416.
- Akmayev IG, Fidelina OV. 1981. Tanycytes and their relation to the hypophyseal gonadotrophic function. *Brain Res* 210(1-2):253-260.
- Akmayev IG, Fidelina OV, Kabolova ZA, Popov AP, Schitkova TA. 1973. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. IV. Medial basal hypothalamus. An experimental morphological study. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 137(4):493-512.
- Akmayev IG, Popov AP. 1977. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VII. The tanycytes: Their relation to the hypophyseal adrenocorticotrophic function. An ultrastructural study. *Cell Tissue Res* 180(2):263-282.
- Beauchesne E, Desjardins P, Hazell AS, Butterworth RF. 2009. Altered expression of tight junction proteins and matrix metalloproteinases in thiamine-deficient mouse brain. *Neurochem Int* 55(5):275-281.
- Bennett L, Yang M, Enikolopov G, Iacovitti L. 2009. Circumventricular organs: a novel site of neural stem cells in the adult brain. *Mol Cell Neurosci* 41(3):337-347.
- Broadwell RD, Balin BJ, Salzman M, Kaplan RS. 1983. Brain-blood barrier? Yes and no. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(23):7352-7356.
- Caron E, Sachot C, Prevot V, Bouret SG. 2010. Distribution of leptin-sensitive cells in the postnatal and adult mouse brain. *J Comp Neurol* 518(4):459-476.
- Castellano B, Gonzalez B, Dalmau I, Vela JM. 1991. Identification and distribution of microglial cells in the cerebral cortex of the lizard: a histochemical study. *J Comp Neurol* 311(3):434-444.
- Cereijido M, Valdes J, Shoshani L, Contreras RG. 1998. Role of tight junctions in establishing and maintaining cell polarity. *Annu Rev Physiol* 60:161-177.
- Chouaf L, Didier-Bazes M, Aguera M, Tardy M, Sallanon M, Kitahama K, Belin MF. 1989. Comparative marker analysis of the ependymocytes of the subcommissural organ in four different mammalian species. *Cell Tissue Res* 257(2):255-262.
- Ciofi P. 2011. The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. *Neurosci Lett* 487(2):187-190.
- Ciofi P, Garret M, Lapirot O, Lafon P, Loyens A, Prevot V, Levine JE. 2009. Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 150(12):5509-5519.
- Coisne C, Dehouck L, Faveeuw C, Delplace Y, Miller F, Landry C, Morissette C, Fenart L, Cecchelli R, Tremblay P, Dehouck B. 2005. Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* 85(6):734-746.
- De Seranno S, Estrella C, Loyens A, Cornea A, Ojeda SR, Beauvillain JC, Prevot V. 2004. Vascular endothelial cells promote acute plasticity in ependymogial cells of the neuroendocrine brain. *J Neurosci* 24(46):10353-10363.
- Dehouck B, Dehouck MP, Fruchart JC, Cecchelli R. 1994. Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol* 126(2):465-473.
- Del Bigio MR. 1995. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 14(1):1-13.
- Del Brio MA, Riera P, Garcia JM, Alvarez-Uria M. 1990. Ultrastructural study of the cellular components of the organum vasculosum lamina terminalis of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *J Submicrosc Cytol Pathol* 22(2):303-309.
- Didier-Bazes M, Chouaf-Lakhdar L, Dutuit M, Aguera M, Belin MF. 2001. Cell lineage of the subcommissural organ secretory ependymocytes: differentiating role of the environment. *Microsc Res Tech* 52(5):461-467.
- Duvernoy HM, Risold PY. 2007. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res Rev* 56(1):119-147.

- Fry M, Hoyda TD, Ferguson AV. 2007. Making sense of it: roles of the sensory circumventricular organs in feeding and regulation of energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 232(1):14-26.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. 2002. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 156(6):1099-1111.
- Goldstein GW. 1988. Endothelial cell-astrocyte interactions. A cellular model of the blood-brain barrier. *Ann N Y Acad Sci* 529:31-39.
- Gotow T, Hashimoto PH. 1979. Fine structure of the ependyma and intercellular junctions in the area postrema of the rat. *Cell Tissue Res* 201(2):207-225.
- Gross PM, Weindl A. 1987. Peering through the windows of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 7(6):663-672.
- Gundersen GG, Bulinski JC. 1986. Microtubule arrays in differentiated cells contain elevated levels of a post-translationally modified form of tubulin. *Eur J Cell Biol* 42(2):288-294.
- Gundersen GG, Kalnoski MH, Bulinski JC. 1984. Distinct populations of microtubules: tyrosinated and nontyrosinated alpha tubulin are distributed differently in vivo. *Cell* 38(3):779-789.
- Hallmann R, Mayer DN, Berg EL, Broermann R, Butcher EC. 1995. Novel mouse endothelial cell surface marker is suppressed during differentiation of the blood brain barrier. *Dev Dyn* 202(4):325-332.
- Hanbury R, Ling ZD, Wu J, Kordower JH. 2003. GFAP knockout mice have increased levels of GDNF that protect striatal neurons from metabolic and excitotoxic insults. *J Comp Neurol* 461(3):307-316.
- Hirase T, Staddon JM, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S, Rubin LL. 1997. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 110 (Pt 14):1603-1613.
- Johnson AK, Gross PM. 1993. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J* 7(8):678-686.
- Kameda Y, Arai Y, Nishimaki T. 2003. Ultrastructural localization of vimentin immunoreactivity and gene expression in tanycytes and their alterations in hamsters kept under different photoperiods. *Cell Tissue Res* 314(2):251-262.
- Klara PM, Brizzee KR. 1975. The ultrastructural morphology of the squirrel monkey area postrema. *Cell Tissue Res* 160(3):315-326.
- Klara PM, Brizzee KR. 1977. Ultrastructure of the feline area postrema. *J Comp Neurol* 72(3):409-431.
- Koedel U, Winkler F, Angele B, Fontana A, Pfister HW. 2002. Meningitis-associated central nervous system complications are mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cereb Blood Flow Metab* 22(1):39-49.
- Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, Balland E, Lacombe A, Mazur D, Carmeliet P, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. 2013. Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in Response to Fasting. *Cell Metab* 17(4):607-617.
- Leppink DM, Bishop DK, Sedmak DD, Henry ML, Ferguson RM, Streeter PR, Butcher EC, Orosz CG. 1989. Inducible expression of an endothelial cell antigen on murine myocardial vasculature in association with interstitial cellular infiltration. *Transplantation* 48(5):874-877.
- Maolood N, Meister B. 2009. Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the brainstem area postrema-nucleus tractus solitarius region. *J Chem Neuroanat* 37(3):182-195.
- Meinzel A. 2007. The secretory ependymal cells of the subcommissural organ: which role in hydrocephalus? *Int J Biochem Cell Biol* 39(3):463-468.
- Mestres P, Rascher K. 1994. The ventricular system of the pigeon brain: a scanning electron microscope study. *J Anat* 184 (Pt 1):35-58.
- Morita S, Miyata S. 2012. Different vascular permeability between the sensory and secretory circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res* 349(2):589-603.
- Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B. 2010. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* 518(7):943-962.
- Myers MG, Jr. 2013. How Is the Hungry Brain like a Sieve? *Cell Metab* 17(4):467-468.

- Paturle-Lafanechere L, Manier M, Trigault N, Pirollet F, Mazarguil H, Job D. 1994. Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci* 107 (Pt 6):1529-1543.
- Peruzzo B, Pastor FE, Blazquez JL, Amat P, Rodriguez EM. 2004. Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat. *Cell Tissue Res* 317(2):147-164.
- Petrov T, Howarth AG, Krukoff TL, Stevenson BR. 1994. Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 21(3-4):235-246.
- Prevot V. 2002. Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol* 14(3):247-255.
- Prevot V, Dutoit S, Croix D, Tramu G, Beauvillain JC. 1998. Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroscience* 84(1):177-191.
- Prevot V, Hanchate NK, Bellefontaine N, Sharif A, Parkash J, Estrella C, Allet C, de Seranno S, Campagne C, de Tassigny X, Baroncini M. 2010. Function-related structural plasticity of the GnRH system: a role for neuronal-glia-endothelial interactions. *Front Neuroendocrinol* 31(3):241-258.
- Rodriguez EM, Blazquez JL, Pastor FE, Pelaez B, Pena P, Peruzzo B, Amat P. 2005. Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol* 247:89-164.
- Rodriguez EM, Herrera H, Peruzzo B, Rodriguez S, Hein S, Oksche A. 1986. Light- and electron-microscopic immunocytochemistry and lectin histochemistry of the subcommissural organ: evidence for processing of the secretory material. *Cell Tissue Res* 243(3):545-559.
- Rodriguez EM, Oksche A, Hein S, Rodriguez S, Yulis R. 1984. Spatial and structural interrelationships between secretory cells of the subcommissural organ and blood vessels. An immunocytochemical study. *Cell Tissue Res* 237(3):443-449.
- Rodriguez EM, Oksche A, Hein S, Yulis CR. 1992. Cell biology of the subcommissural organ. *Int Rev Cytol* 135:39-121.
- Rodriguez EM, Rodriguez S, Hein S. 1998. The subcommissural organ. *Microsc Res Tech* 41(2):98-123.
- Sanchez E, Vargas MA, Singru PS, Pascual I, Romero F, Fekete C, Charli JL, Lechan RM. 2009. Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology* 150(5):2283-2291.
- Schulz M, Engelhardt B. 2005. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Res* 2:8.
- Shin K, Fogg VC, Margolis B. 2006. Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:207-235.
- Smith GM, Shine HD. 1992. Immunofluorescent labeling of tight junctions in the rat brain and spinal cord. *Int J Dev Neurosci* 10(5):387-392.
- Stamatovic SM, Shakui P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV. 2005. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab* 25(5):593-606.
- Streeter PR, Rouse BT, Butcher EC. 1988. Immunohistologic and functional characterization of a vascular addressin involved in lymphocyte homing into peripheral lymph nodes. *J Cell Biol* 107(5):1853-1862.
- Szathmari A, Champier J, Ghersi-Egea JF, Jouveta A, Watrin C, Wierinckx A, Fevre Montange M. 2012. Molecular characterization of circumventricular organs and third ventricle ependyma in the rat: potential markers for periventricular tumors. *Neuropathology*.
- Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH. 2008. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev* 88(3):983-1008.
- Vio K, Rodriguez S, Yulis CR, Oliver C, Rodriguez EM. 2008. The subcommissural organ of the rat secretes Reissner's fiber glycoproteins and CSF-soluble proteins reaching the internal and external CSF compartments. *Cerebrospinal Fluid Res* 5:3.
- Weindl A, Joynt RJ. 1972. Ultrastructure of the ventricular walls. Three-dimensional study of regional specialization. *Arch Neurol* 26(5):420-427.
- Weindl A, Sofroniew MV. 1981. Relation of neuropeptides to mammalian circumventricular organs. *Adv Biochem Psychopharmacol* 28:303-320.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B. 2001. Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci Lett* 307(2):77-80.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Photomicrographs showing the association of vimentin-positive cells bearing processes with MECA 32-immunoreactive fenestrated capillaries in sagittal sections of mouse CVOs. **A:** Low-magnification photomontage of Hoechst counterstaining (blue) showing the location of CVOs in the mouse brain. **B, C, E, F, H:** High-magnification images showing the distribution of vimentin (red) and MECA 32 (white) immunoreactivity in each CVO (**B**, ME; **C**, OVLT; **E**, SFO; **F**, AP; **H**, SCO). **Insets in B, E:** High-magnification images of the areas indicated. **D, G:** High-magnification images corresponding to the areas indicated in **C** and **F**. All sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and determine the morphological limits of each brain structure.

Vimentin immunoreactivity (red) is distributed throughout the cells lining the third (3V in **B, C, D, E, H**) and fourth ventricles (4V in **F, G**). Notably, vimentin-positive ependymal cells send processes into the parenchyma of the CVOs (asterisk in **B-H**). MECA 32 positive vessels (white) are observed in the choroid plexus (CP in **E**) and CVOs (**B-G**), but not in the SCO (**H**). Remarkably, high-magnification images show the association between vimentin-positive cells and MECA 32 immunoreactive fenestrated capillaries via vimentin-positive processes (arrowheads in **B, D, E, G**). 3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle; ME, median eminence; SCO, subcommissural organ; SFO, subfornical organ; OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; AP, area postrema; CP, choroid plexus; PC, posterior commissure. Scale bar = 1000 μm in **A**; 100 μm in **B, C, E, F, H**; 10 μm in **D, G** and inserts in **B, E**.

Figure 2: Photomicrographs showing the distribution of vimentin and deetyrosinated-tubulin immunoreactivity in coronal sections of mouse CVOs. **A, D, G, J:** Low-magnification photomontage of deetyrosinated tubulin (green) and vimentin (red) immunofluorescence in each CVO, with Hoechst counterstaining (blue) (**A**, OVLT; **D**, SFO; **G**, AP; **J**, SCO). (**B, C**), (**E, F**), (**H, I**), (**K, L**): High-magnification images of areas indicated in **A, D, G** and **J**, respectively. Vimentin immunoreactivity is distributed throughout the cells lining the third (3V in **A-H, J-L**) and fourth ventricles (4V in **G-I**). Note that deetyrosinated-tubulin-immunoreactive cilia (green) observed along the ventricular wall (empty arrowhead in **B, E, H, K**) are absent in ependymal cells bordering the OVLT, SFO and AP (**C, F, I**). Interestingly, ependymal cells lining the SCO display numerous deetyrosinated-tubulin-positive structures (green) that coat the ventricular wall and project into the ventricular lumen (**L**). Coordinates relative to bregma for coronal sections of CVOs: OVLT (+0.35), SFO (-0.60), AP (-7,20), SCO (-2.55). Scale bar = 100 μm in **A, D, G, J**; 20 μm in **B, C, E, F, H, I, K, L**.

3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle; SCO, subcommissural organ; SFO, subfornical organ; OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; AP, area postrema.

Figure 3. Expression of the tight junction protein ZO-1 in vimentin-positive ependymal cells bearing processes in sagittal sections of mouse CVOs (section adjacent to that shown in Figure 1). **A:** Low-magnification photomontage of Hoechst counterstaining (blue) showing the location of CVOs in the mouse brain. **B, C, E, F, H:** High-magnification images showing the distribution of vimentin (red) and ZO-1 (green) immunoreactivity in each CVO (**B**, ME; **C**, OVLT; **E**, SFO; **F**, SCO; **H**, AP). **Insets** in **B, E, H:** High-magnification images corresponding to the areas indicated. **D, G:** High-magnification images corresponding to the areas indicated in **C, F**, respectively. All sections are counterstained with Hoechst (blue).

ZO-1 is expressed in brain capillaries (green, empty arrows in **B, C, E, F, H**) and in the choroid plexus (CP in **E**), which are known to display well-differentiated tight junction complexes. Notably,

in the ME (inset in **B**), the OVLT (**D**), the SFO (inset in **E**), the AP (inset in **H**) and SCO (**G**), vimentin-positive ependymal cells (red) express ZO-1 (green) in a distinct honeycomb pattern around their cell bodies (arrow). 3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle; ME, median eminence; SCO, subcommissural organ; SFO, subfornical organ; OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; AP, area postrema; CP, choroid plexus; PC, posterior commissure. Scale bar = 1000 μm in **A**; 100 μm in **B**, **C**, **E**, **F**, **H**; 10 μm in **D**, **G** and inset in **B** (applies also to **E**, **H**).

Figure 4. Expression pattern of tight junction proteins in vimentin-positive ependymal cells and their association with MECA 32-immunoreactive fenestrated capillaries in coronal sections of the mouse OVLT. **A, B:** Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red) and occludin (green) immunoreactivity. **C, D:** Photomicrographs showing the distribution of ZO-1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. **E, F:** Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red), claudin 1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. **B, D, F:** High-magnification images corresponding to areas indicated in **A, C, E** respectively. **A-D:** sections are counterstained with Hoechst (blue).

Vimentin is expressed in both brain capillaries (red, empty arrow in **A, E**) and ependymal cells. In the OVLT, vimentin-positive ependymal cells extend processes into the brain parenchyma (asterisk, **A, B, E, F**) and contact (arrowheads in **F**) MECA 32-positive fenestrated vessels (white) localized in the parenchyma of the CVO. Importantly, these ependymal cells display immunoreactivity for the tight junction proteins occludin (**A, B**), ZO-1 (**C, D**) and claudin 1 (**E, F**) (green). Tight junction proteins are expressed in a honeycomb pattern around ependymal cell bodies (arrows). Notably, brain vessels in neighboring structures are MECA 32 negative, ZO-1- and occludin-positive and claudin 1-negative (empty arrows in **A, C, E**). 3V, third ventricle; VmPO, ventromedial preoptic nucleus. Coordinates relative to bregma for coronal sections: **A** (+0.50), **C** (+0.35), **E** (+0.40). Scale bar = 100 μm in **A, C, E**; 10 μm in **F** (applies also to **B, D**).

Figure 5. Expression pattern of tight junction proteins in vimentin-positive ependymal cells and their association with MECA 32-immunoreactive fenestrated capillaries in coronal sections of the mouse SFO. **A, B:** Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red) and occludin (green) immunoreactivity. **C, D:** Photomicrographs showing the distribution of ZO-1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. **E, F:** Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red), claudin 1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. **B, D, F:** High-magnification images corresponding to areas indicated in **A, C, E**, respectively. **A-D:** sections are counterstained with Hoechst (blue).

Vimentin is expressed in both brain capillaries (red, empty arrow in **A, E**) and ependymal cells. In the SFO, vimentin-positive ependymal cells extend processes into the brain parenchyma (asterisk, **A, B, E, F**) and contact (arrowheads in **F**) MECA 32-positive fenestrated vessels (white) localized in the parenchyma of the CVO. Importantly, these ependymal cells display immunoreactivity for the tight junction proteins occludin (**A, B**), ZO-1 (**C, D**) and claudin 1 (**E, F**) (green). Tight junction proteins are expressed in a honeycomb pattern around ependymal cell bodies (arrows). Notably, brain vessels in neighboring structures are MECA 32 negative, ZO-1- and occludin-positive and claudin 1-negative (empty arrows in **A, C, E**). 3V, third ventricle; CP, choroid plexus; SFO, subformical organ; vhc, ventral hippocampal commissure. Coordinates relative to bregma for coronal sections: A (-0.60), C (-0.50), E (-0.50). Scale bar = 100 μm in A, C, E; 10 μm in F (applies also to B, D).

Figure 6. Expression pattern of tight junction proteins in vimentin-positive ependymal cells and their association with MECA 32-immunoreactive fenestrated capillaries in coronal sections of the mouse AP. **A, D:** Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red) and occludin (green) immunoreactivity. **B, E:** Photomicrographs showing the distribution of ZO-1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. **C, F:** Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red), claudin 1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. **D, E, F:** High-magnification images

corresponding to areas indicated in **A, B, C**, respectively. **A, B, D, E**, sections are counterstained with Hoechst (blue).

Vimentin is expressed in both brain capillaries (red, empty arrow in **A, C**) and ependymal cells. In the AP, vimentin-positive ependymal cells extend processes into the brain parenchyma (asterisk, **A, C, D, F**) and contact (arrowheads in **F**) MECA 32-positive fenestrated vessels (white) localized in the parenchyma of the CVO. Importantly, these ependymal cells display immunoreactivity for the tight junction proteins occludin (**A, D**), ZO-1 (**B, E**) and claudin 1 (**C, F**) (green). Tight junction proteins are expressed in a honeycomb pattern around ependymal cell bodies (arrows). Notably, brain vessels in neighboring structures are MECA 32 negative, ZO-1- and occludin-positive and claudin 1-negative (empty arrows in **A, B, C**). AP, area postrema; NTS, nucleus of the solitary tract. Coordinates relative to bregma for coronal sections: A (-7,20), B (-7,35), C (-7,30). Scale bar = 100 μm in A-C; 20 μm in F (applies also to B, D).

Figure 7. Evans blue dye permeability studies associated with HuC/D and ZO-1 immunolabeling in mouse CVOs. **A, E, I, M:** Low-magnification photomontages showing HuC/D immunoreactivity in coronal sections of each CVO. All CVOs (OVL, **A**; SFO, **E**; AP, **I**) except the SCO (**M**) display HuC/D positive-neuronal cell bodies (grey). **B, F, J, N:** Low-magnification photomontages showing fluorescence after an intravenous injection of Evans blue dye (red). When injected into the blood, Evans blue reaches the parenchyma of the OVL, SFO and AP, but is confined to brain vessels in neighboring structures. Evans blue diffusion is limited to the parenchyma of the CVOs (dotted-line), delineating the CVOs and matching the distribution of HuC/D immunoreactivity. Note that the parenchyma of the SCO is free of the blood-borne dye. **C, G, K, O:** Low-magnification photomontages showing fluorescence after an intracerebroventricular injection of Evans blue dye (red) in association with ZO-1 immunoreactivity (green). **D, H, L, P:** High-magnification images corresponding to the areas indicated in **C, G, K, O**, respectively. Evans blue reaches and crosses the walls of the third and fourth ventricles (empty arrowheads), except at the level of the CVOs, where

both the ventricular wall and parenchyma (asterisk) remain dye-free. Importantly, the honeycomb pattern of ZO-1 expression (green, arrow in **D, H, L, P**) corresponds to the non-diffusion of the dye across the ventricular wall. OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; SFO, subfornical organ; AP, area postrema; SCO, subcommissural organ; 3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle; CP, choroid plexus; iv, intravenous injection; icv, intracerebroventricular injection. Coordinates relative to bregma for coronal sections: OVLT (+0.35), SFO (-0.60), AP (-7,30), SCO (-2.55). Scale bar = 100 μm in A-C, E-G, I-K, M-O; 20 μm in P (applies also to D, H, L).

Figure 8. Photomicrographs showing the distribution GFAP and ZO-1 immunoreactivity in coronal sections of each CVO. **A:** ME, **B:** OVLT. **C:** SFO. **D:** AP. **E:** SCO. **Insets** in **A-E:** High-magnification images of the areas indicated. The tight junction protein ZO-1 is expressed in blood-brain barrier capillaries (green, empty arrow in **A-E**) and in the choroid plexus (CP in **C, D**). Notably, ZO-1 expression displays a typical honeycomb pattern at the ventricular wall (green, arrow in **A-E**). GFAP immunoreactivity is observed throughout the nervous tissue, with an increase in the signal around ZO-1-positive brain capillaries (white, empty arrow in **A-E**) which are known to display well-differentiated tight junction complexes. Importantly, at the level of the CVOs, although GFAP-positive cells were found throughout the parenchyma of the CVOs, predominant GFAP immunoreactivity was observed close to the ventricular surface forming a dense ribbon associated with the honeycomb pattern of tight junction proteins displayed by ependymal cell bodies (arrows, insets in **A-E**). In the SCO, GFAP is also expressed in some cell bodies (inset in **E**). ME, median eminence; OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; SFO, subfornical organ; AP, area postrema; SCO, subcommissural organ; 3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle; CP, choroid plexus. Coordinates relative to bregma for coronal sections: ME (-1,70), OVLT (+0.35), SFO (-0.50), AP (-7,20), SCO (-2.55). Scale bar = 100 μm in **A, B, C, D, E**; 20 μm in insets.

Figure 9. Expression pattern of tight junction proteins in vimentin-positive cells in coronal sections of the mouse SCO. **A, D:** Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red) and occludin

(green) immunoreactivity. **B, E**: Photomicrographs showing the distribution of ZO-1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. **C, F**: Images showing the distribution of vimentin (red), claudin 1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. **D, E, F**: High-magnification images corresponding to areas indicated in **A, B, C** respectively. **A, B, D, E**, sections are counterstained with Hoechst (blue).

No MECA 32 immunoreactivity was observed in SCO and neighboring structures. Vimentin immunoreactivity is distributed throughout the cells lining the third ventricle (3V in **A, C, D, F**). Remarkably, vimentin-positive elongated cell bodies (red in **A, C, D, F**) delimit the SCO in the brain parenchyma and line the ventricular wall. High-magnification images of the ventricular wall of the SCO showing occludin (**A, D**), ZO-1 (**B, E**) and claudin 1 (**C, F**) immunoreactivity organized in a continuous belt around vimentin-positive cell bodies, giving rise to the characteristic honeycomb pattern (arrows in **D, E, F**). These cells display also vimentin-positive basal processes extending into brain parenchyma (asterisk in **A, C**) and for few of them projecting to occludin-positive capillaries (empty arrow in **A**). Notably, brain vessels in neighboring structures are ZO-1- and occludin-positive and claudin 1-negative (empty arrows in **A, B, C**). 3V, third ventricle; PC, posterior commissure; PAG, periaqueductal gray. Coordinates relative to bregma for coronal sections: **A-C** (-2.55). Scale bar = 100 μm in **A-C**; 20 μm in **D-F**.

Figure 10.

Representative figure summarizing the type of ependymal cells and the distribution of tight junction proteins in each CVO (**A**, OVLT; **B**, SCO; **C**, SFO; **D**, AP) of the mouse brain. OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; SCO, subcommissural organ; SFO, subfornical organ; AP, area postrema; 3V, third ventricle; PO, preoptic nucleus; OC, optic chiasma; MPA, medial preoptic area; PC, posterior commissure; PrC, precommissural nucleus; PAG, periaqueductal grey; vhc, ventral hippocampal commissure; CP, choroid plexus; sm, stria medullaris; 4V, fourth ventricle; NTS, nucleus of the solitary tract; TJ: tight junction.

Table 1. Primary antibodies used in this study

Table 2. Tight junction protein expression in blood-brain barrier capillaries, classic ependymal cells, choroid plexus and each of the CVOs of the mouse brain. The density of protein expression is indicated as very high (++++), high (+++), moderate (++) , low (+) or undetectable (-) based on signal strength. ZO-1 and occludin are found in blood-brain barrier capillaries, ependymal cells and in the endyma of CVOs. Interestingly, claudin 1 immunolabeling is found exclusively in CVO ependymal cells and the choroid plexus (considered a CVO by some authors) but not in brain capillaries or ependymal cells located outside the CVOs. The SCO and the choroid plexus express the most dense immunolabeling for tight junction proteins, whereas the SFO possesses the least dense immunolabeling. ME: median eminence; OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; SFO, subfornical organ; AP, area postrema; SCO, subcommissural organ.

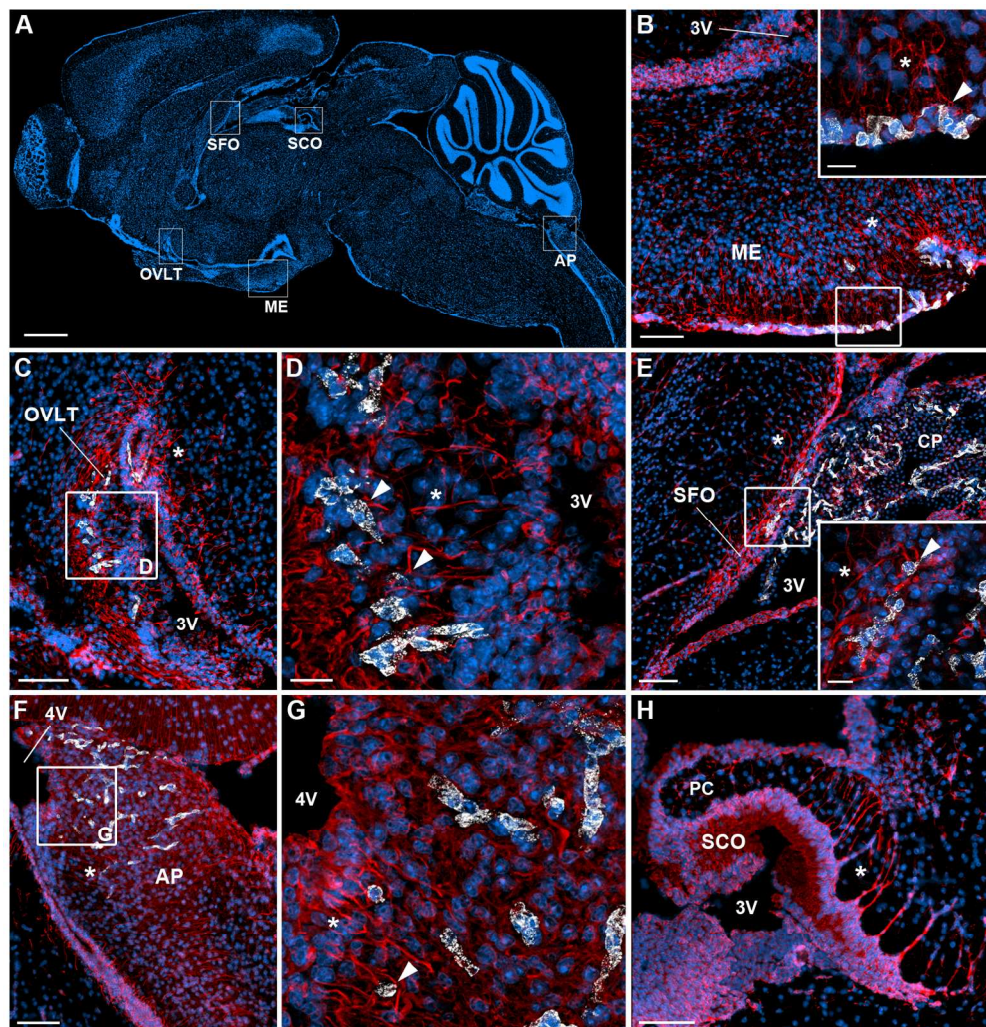


Figure 1. Photomicrographs showing the association of vimentin-positive cells bearing processes with MECA 32-immunoreactive fenestrated capillaries in sagittal sections of mouse CVOs. A: Low-magnification photomontage of Hoechst counterstaining (blue) showing the location of CVOs in the mouse brain. B, C, E, F, H: High-magnification images showing the distribution of vimentin (red) and MECA 32 (white) immunoreactivity in each CVO (B, ME; C, OVLT; E, SFO; F, AP; H, SCO). Insets in B, E: High-magnification images of the areas indicated. D, G: High-magnification images corresponding to the areas indicated in C and F. All sections are counterstained using Hoechst (blue) to visualize cell nuclei and determine the morphological limits of each brain structure.

Vimentin immunoreactivity (red) is distributed throughout the cells lining the third (3V in B, C, D, E, H) and fourth ventricles (4V in F, G). Notably, vimentin-positive ependymal cells send processes into the parenchyma of the CVOs (asterisk in B-H). MECA 32 positive vessels (white) are observed in the choroid plexus (CP in E) and CVOs (B-G), but not in the SCO (H). Remarkably, high-magnification images show the association between vimentin-positive cells and MECA 32 immunoreactive fenestrated capillaries via vimentin-positive processes (arrowheads in B, D, E, G). 3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle; ME, median eminence; SCO, subcommissural organ; SFO, subfornical organ; OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; AP, area postrema; CP, choroid plexus; PC, posterior commissure. Scale bar = 1000 μ m in A; 100 μ m in B, C, E, F, H; 10 μ m in D, G and inserts in B, E.

153x158mm (300 x 300 DPI)

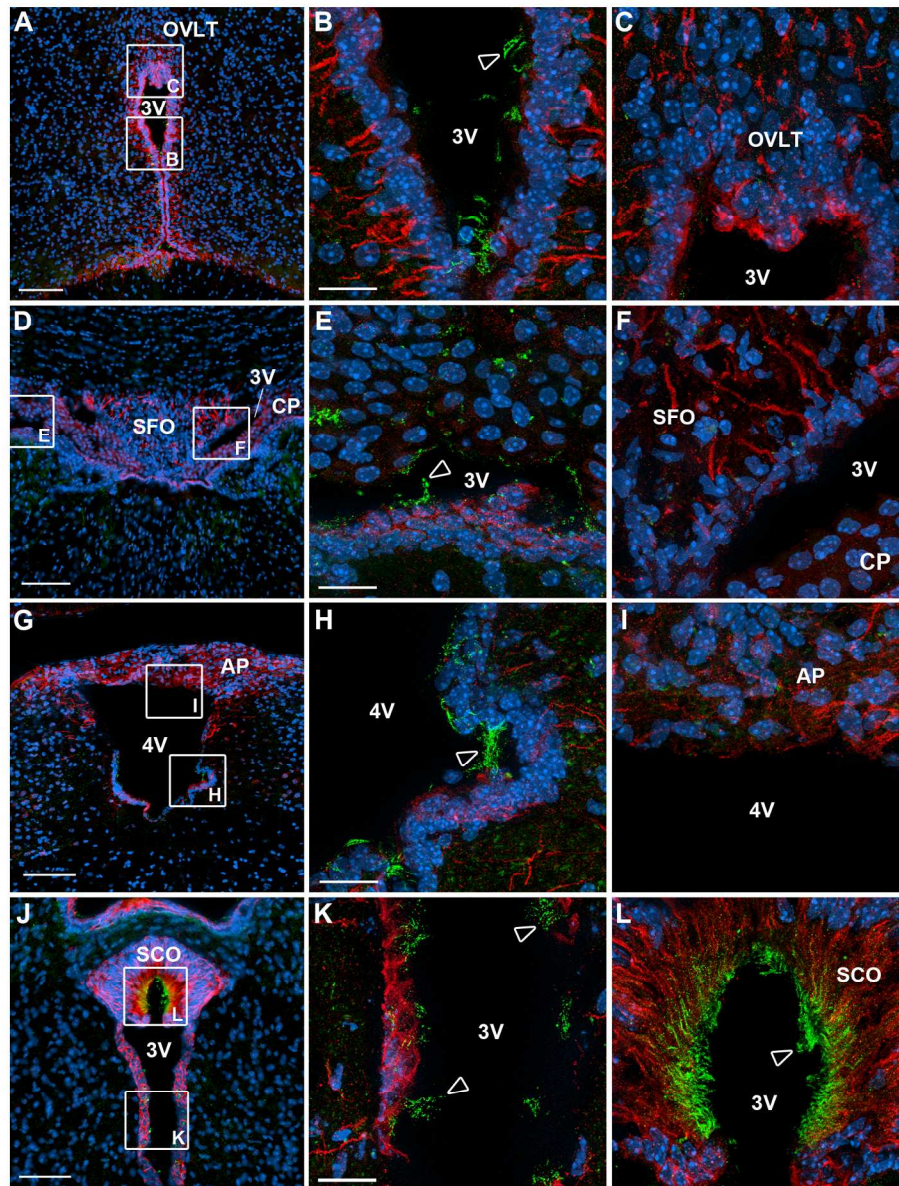


Figure 2: Photomicrographs showing the distribution of vimentin and detyrosinated-tubulin immunoreactivity in coronal sections of mouse CVOs. A, D, G, J: Low-magnification photomontage of detyrosinated tubulin (green) and vimentin (red) immunofluorescence in each CVO, with Hoechst counterstaining (blue) (A, OVLT; D, SFO; G, AP; J, SCO). (B, C), (E, F), (H, I), (K, L): High-magnification images of areas indicated in A, D, G and J, respectively. Vimentin immunoreactivity is distributed throughout the cells lining the third (3V in A-H, J-L) and fourth ventricles (4V in G-I). Note that detyrosinated-tubulin-immunoreactive cilia (green) observed along the ventricular wall (empty arrowhead in B, E, H, K) are absent in ependymal cells bordering the OVLT, SFO and AP (C, F, I). Interestingly, ependymal cells lining the SCO display numerous detyrosinated-tubulin-positive structures (green) that coat the ventricular wall and project into the ventricular lumen (L). Coordinates relative to bregma for coronal sections of CVOs: OVLT (+0.35), SFO (-0.60), AP (-7,20), SCO (-2.55). Scale bar = 100 μ m in A, D, G, J; 20 μ m in B, C, E, F, H, I, K, L.

3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle; SCO, subcommissural organ; SFO, subfornical organ; OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; AP, area postrema.

155x203mm (300 x 300 DPI)

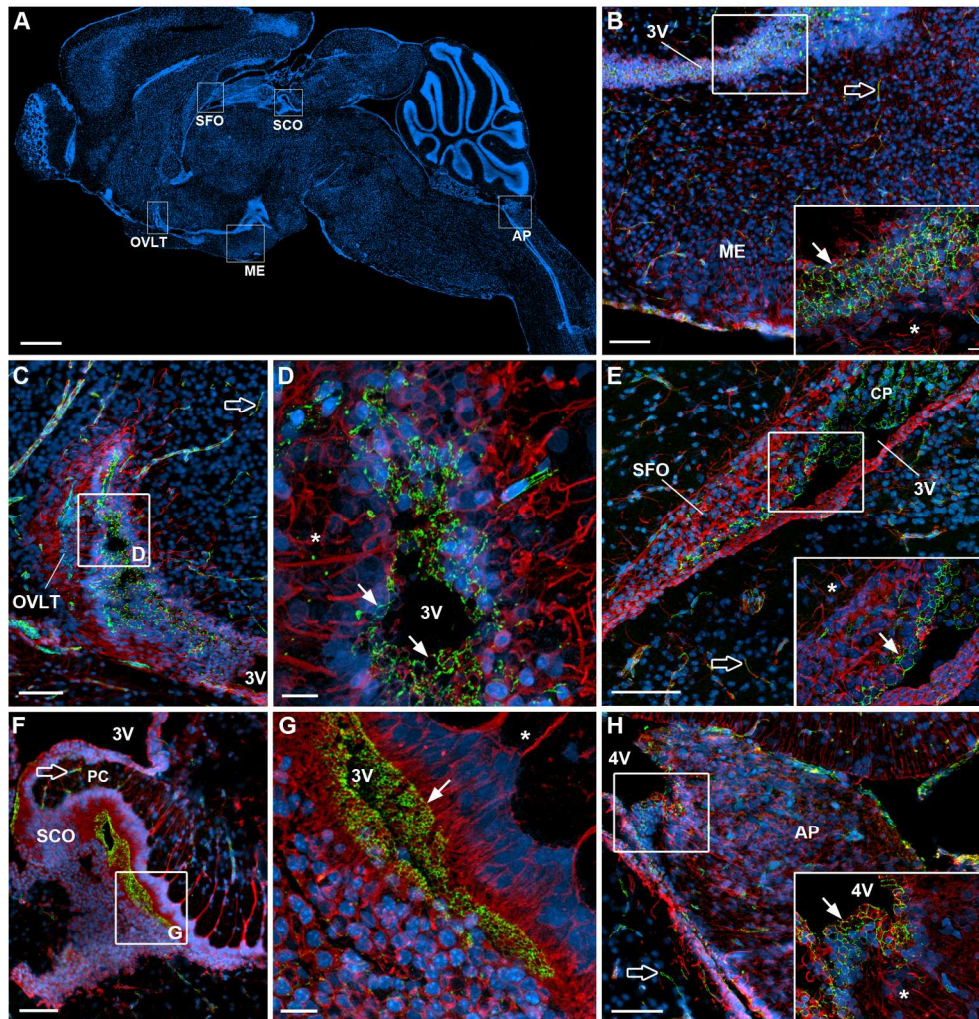


Figure 3. Expression of the tight junction protein ZO-1 in vimentin-positive ependymal cells bearing processes in sagittal sections of mouse CVOs (section adjacent to that shown in Figure 1). A: Low-magnification photomontage of Hoechst counterstaining (blue) showing the location of CVOs in the mouse brain. B, C, E, F, H: High-magnification images showing the distribution of vimentin (red) and ZO-1 (green) immunoreactivity in each CVO (B, ME; C, OVL; E, SFO; F, SCO; H, AP). Insets in B, E, H: High-magnification images corresponding to the areas indicated. D, G: High-magnification images corresponding to the areas indicated in C, F, respectively. All sections are counterstained with Hoechst (blue). ZO-1 is expressed in brain capillaries (green, empty arrows in B, C, E, F, H) and in the choroid plexus (CP in E), which are known to display well-differentiated tight junction complexes. Notably, in the ME (inset in B), the OVL (D), the SFO (inset in E), the AP (inset in H) and SCO (G), vimentin-positive ependymal cells (red) express ZO-1 (green) in a distinct honeycomb pattern around their cell bodies (arrow). 3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle; ME, median eminence; SCO, subcommissural organ; SFO, subfornical organ; OVL, organum vasculosum laminae terminalis; AP, area postrema; CP, choroid plexus; PC, posterior commissure. Scale bar = 1000 μ m in A; 100 μ m in B, C, E, F, H; 10 μ m in D, G and inset in B (applies also to E, H). 176x182mm (300 x 300 DPI)

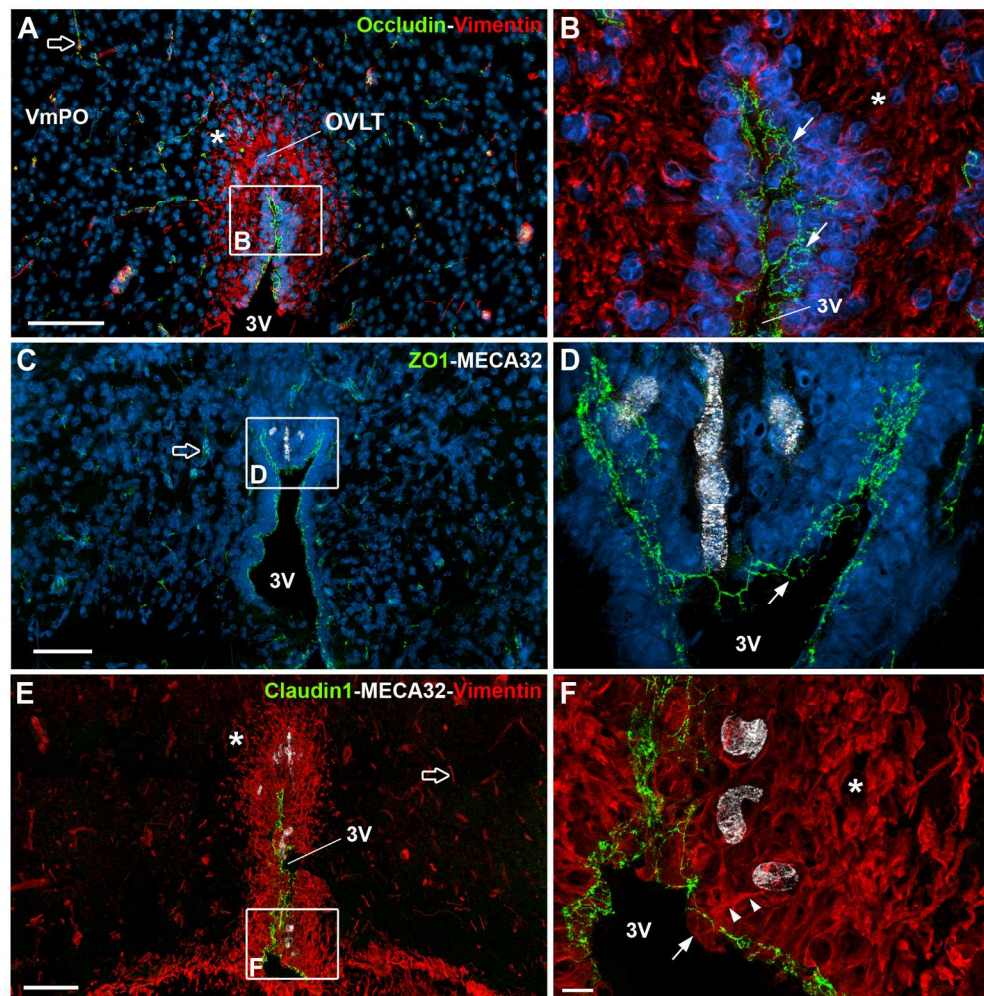


Figure 4. Expression pattern of tight junction proteins in vimentin-positive ependymal cells and their association with MECA 32-immunoreactive fenestrated capillaries in coronal sections of the mouse OVLT. A, B: Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red) and occludin (green) immunoreactivity. C, D: Photomicrographs showing the distribution of ZO-1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. E, F: Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red), claudin 1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. B, D, F: High-magnification images corresponding to areas indicated in A, C, E respectively. A-D: sections are counterstained with Hoechst (blue). Vimentin is expressed in both brain capillaries (red, empty arrow in A, E) and ependymal cells. In the OVLT, vimentin-positive ependymal cells extend processes into the brain parenchyma (asterisk, A, B, E, F) and contact (arrowheads in F) MECA 32-positive fenestrated vessels (white) localized in the parenchyma of the CVO. Importantly, these ependymal cells display immunoreactivity for the tight junction proteins occludin (A, B), ZO-1 (C, D) and claudin 1 (E, F) (green). Tight junction proteins are expressed in a honeycomb pattern around ependymal cell bodies (arrows). Notably, brain vessels in neighboring structures are MECA 32 negative, ZO-1- and occludin-positive and claudin 1-negative (empty arrows in A, C, E). 3V, third ventricle; VmPO, ventromedial preoptic nucleus. Coordinates relative to bregma for coronal sections: A (+0.50), C (+0.35), E (+0.40). Scale bar = 100 μ m in A, C, E; 10 μ m in F (applies also to B, D). 167x168mm (300 x 300 DPI)

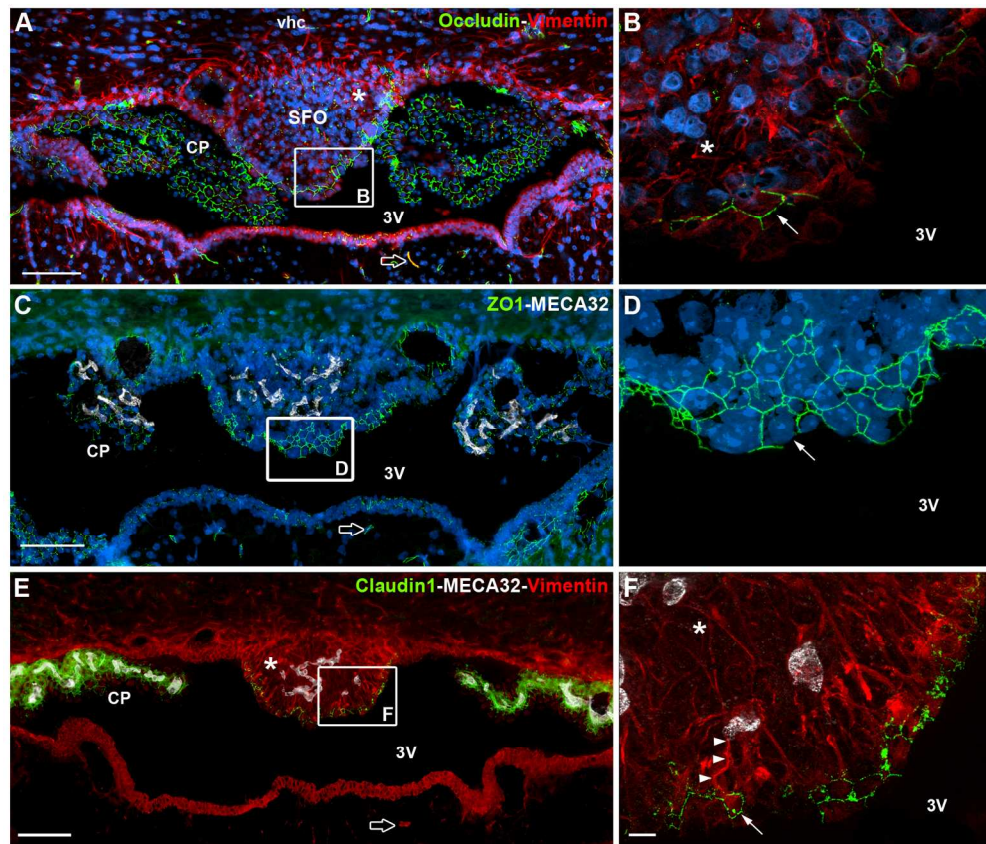


Figure 5. Expression pattern of tight junction proteins in vimentin-positive ependymal cells and their association with MECA 32-immunoreactive fenestrated capillaries in coronal sections of the mouse SFO. A, B: Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red) and occludin (green) immunoreactivity. C, D: Photomicrographs showing the distribution of ZO-1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. E, F: Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red), claudin 1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. B, D, F: High-magnification images corresponding to areas indicated in A, C, E, respectively. A-D: sections are counterstained with Hoechst (blue). Vimentin is expressed in both brain capillaries (red, empty arrow in A, E) and ependymal cells. In the SFO, vimentin-positive ependymal cells extend processes into the brain parenchyma (asterisk, A, B, E, F) and contact (arrowheads in F) MECA 32-positive fenestrated vessels (white) localized in the parenchyma of the CVO. Importantly, these ependymal cells display immunoreactivity for the tight junction proteins occludin (A, B), ZO-1 (C, D) and claudin 1 (E, F) (green). Tight junction proteins are expressed in a honeycomb pattern around ependymal cell bodies (arrows). Notably, brain vessels in neighboring structures are MECA 32 negative, ZO-1- and occludin-positive and claudin 1-negative (empty arrows in A, C, E). 3V, third ventricle; CP, choroid plexus; SFO, subfornical organ; vhc, ventral hippocampal commissure. Coordinates relative to bregma for coronal sections: A (-0.60), C (-0.50), E (-0.50). Scale bar = 100 μ m in A, C, E; 10 μ m in F (applies also to B, D). 165x140mm (300 x 300 DPI)

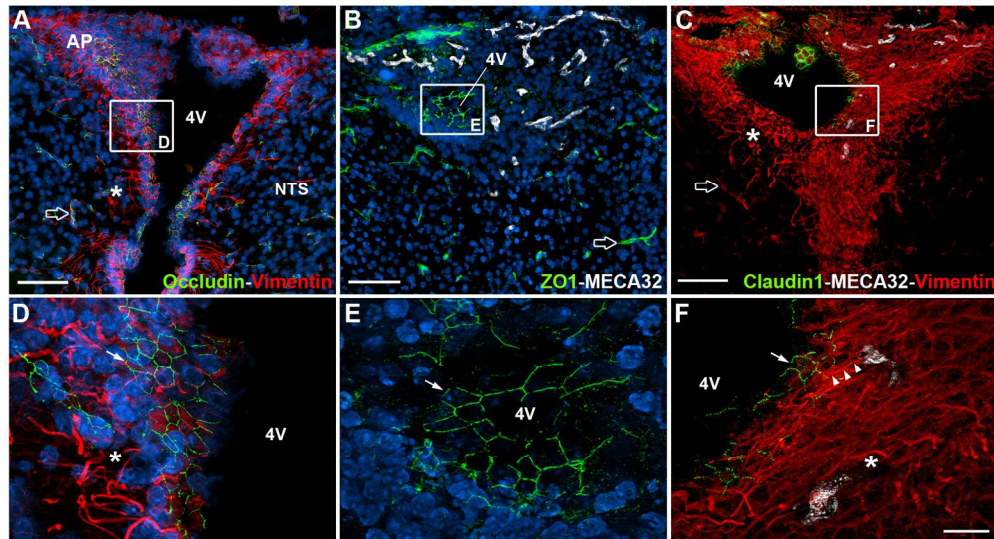


Figure 6. Expression pattern of tight junction proteins in vimentin-positive ependymal cells and their association with MECA 32-immunoreactive fenestrated capillaries in coronal sections of the mouse AP. A, D: Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red) and occludin (green) immunoreactivity. B, E: Photomicrographs showing the distribution of ZO-1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. C, F: Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red), claudin 1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. D, E, F: High-magnification images corresponding to areas indicated in A, B, C, respectively. A, B, D, E, sections are counterstained with Hoechst (blue). Vimentin is expressed in both brain capillaries (red, empty arrow in A, C) and ependymal cells. In the AP, vimentin-positive ependymal cells extend processes into the brain parenchyma (asterisk, A, C, D, F) and contact (arrowheads in F) MECA 32-positive fenestrated vessels (white) localized in the parenchyma of the CVO. Importantly, these ependymal cells display immunoreactivity for the tight junction proteins occludin (A, D), ZO-1 (B, E) and claudin 1 (C, F) (green). Tight junction proteins are expressed in a honeycomb pattern around ependymal cell bodies (arrows). Notably, brain vessels in neighboring structures are MECA 32 negative, ZO-1- and occludin-positive and claudin 1-negative (empty arrows in A, B, C). AP, area postrema; NTS, nucleus of the solitary tract. Coordinates relative to bregma for coronal sections: A (-7,20), B (-7,35), C (-7,30). Scale bar = 100 μ m in A-C; 20 μ m in F (applies also to B, D). 165x91mm (300 x 300 DPI)

Acce

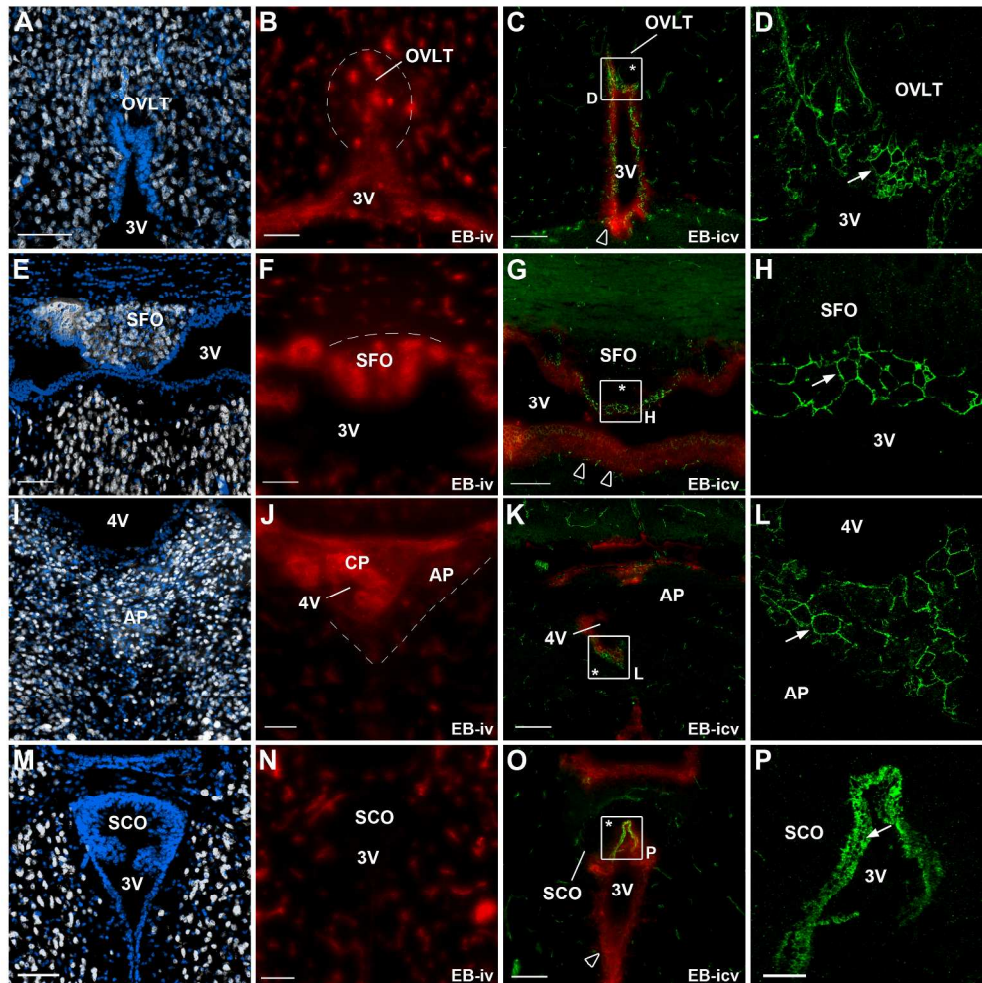


Figure 7. Evans blue dye permeability studies associated with HuC/D and ZO-1 immunolabeling in mouse CVOs. A, E, I, M: Low-magnification photomontages showing HuC/D immunoreactivity in coronal sections of each CVO. All CVOs (OVLT, A; SFO, E; AP, I) except the SCO (M) display HuC/D positive-neuronal cell bodies (grey). B, F, J, N: Low-magnification photomontages showing fluorescence after an intravenous injection of Evans blue dye (red). When injected into the blood, Evans blue reaches the parenchyma of the OVLT, SFO and AP, but is confined to brain vessels in neighboring structures. Evans blue diffusion is limited to the parenchyma of the CVOs (dotted-line), delineating the CVOs and matching the distribution of HuC/D immunoreactivity. Note that the parenchyma of the SCO is free of the blood-borne dye. C, G, K, O: Low-magnification photomontages showing fluorescence after an intracerebroventricular injection of Evans blue dye (red) in association with ZO-1 immunoreactivity (green). D, H, L, P: High-magnification images corresponding to the areas indicated in C, G, K, O, respectively. Evans blue reaches and crosses the walls of the third and fourth ventricles (empty arrowheads), except at the level of the CVOs, where both the ventricular wall and parenchyma (asterisk) remain dye-free. Importantly, the honeycomb pattern of ZO-1 expression (green, arrow in D, H, L, P) corresponds to the non-diffusion of the dye across the ventricular wall. OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; SFO, subfornical organ; AP, area postrema; SCO, subcommissural organ; 3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle; CP, choroid plexus; iv, intravenous injection; icv, intracerebroventricular injection. Coordinates relative to bregma for coronal sections: OVLT (+0.35), SFO (-0.60), AP (-7,30), SCO (-2.55). Scale bar = 100 μ m in A-C, E-G, I-K, M-O; 20 μ m in P (applies also to D, H, L).

234x233mm (300 x 300 DPI)

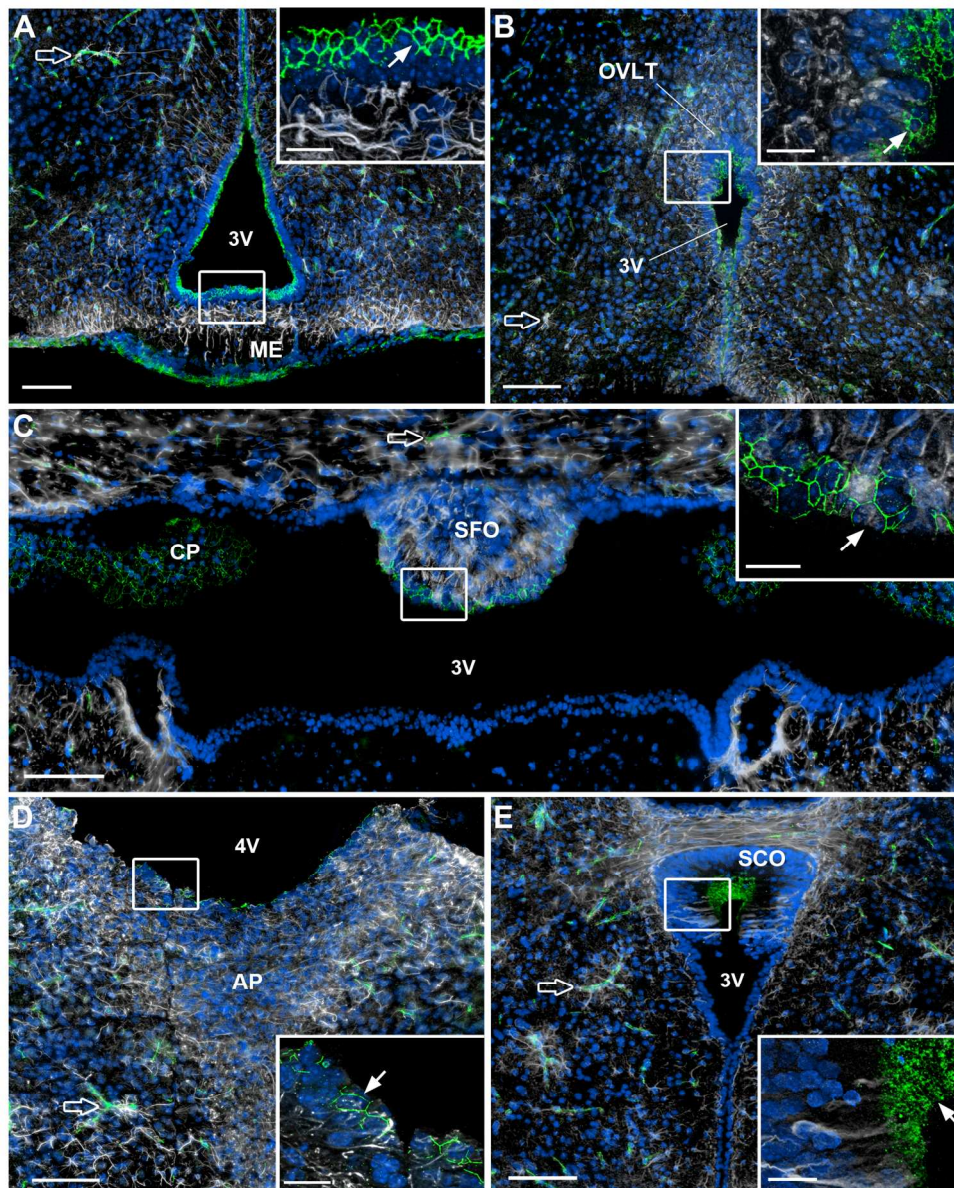


Figure 8. Photomicrographs showing the distribution GFAP and ZO-1 immunoreactivity in coronal sections of each CVO. A: ME, B: OVLT. C: SFO. D: AP. E: SCO. Insets in A-E: High-magnification images of the areas indicated. The tight junction protein ZO-1 is expressed in blood-brain barrier capillaries (green, empty arrow in A-E) and in the choroid plexus (CP in C, D). Notably, ZO-1 expression displays a typical honeycomb pattern at the ventricular wall (green, arrow in A-E). GFAP immunoreactivity is observed throughout the nervous tissue, with an increase in the signal around ZO-1-positive brain capillaries (white, empty arrow in A-E) which are known to display well-differentiated tight junction complexes. Importantly, at the level of the CVOs, although GFAP-positive cells were found throughout the parenchyma of the CVOs, predominant GFAP immunoreactivity was observed close to the ventricular surface forming a dense ribbon associated with the honeycomb pattern of tight junction proteins displayed by ependymal cell bodies (arrows, insets in A-E). In the SCO, GFAP is also expressed in some cell bodies (inset in E). ME, median eminence; OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; SFO, subfornical organ; AP, area postrema; SCO, subcommissural organ; 3V, third ventricle; 4V, fourth ventricle; CP, choroid plexus. Coordinates relative to bregma for coronal

sections: ME (-1,70), OVLT (+0.35), SFO (-0.50), AP (-7,20), SCO (-2.55). Scale bar = 100 μ m in A, B, C, D, E; 20 μ m in insets.
154x190mm (300 x 300 DPI)

Accepted Article

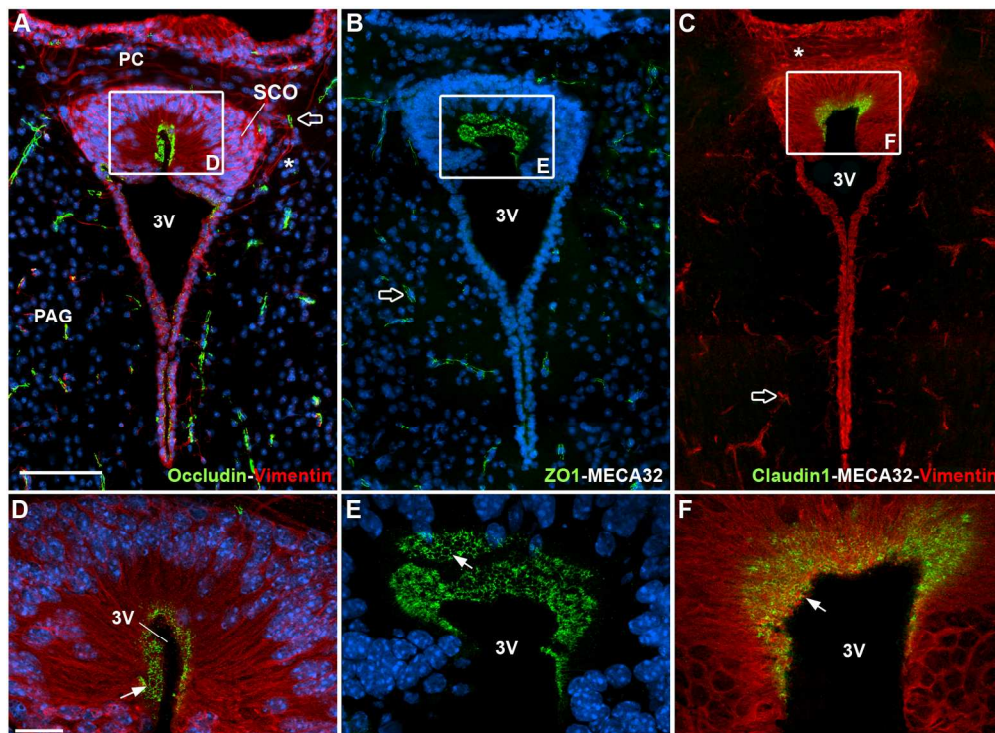


Figure 9. Expression pattern of tight junction proteins in vimentin-positive cells in coronal sections of the mouse SCO. A, D: Photomicrographs showing the distribution of vimentin (red) and occludin (green) immunoreactivity. B, E: Photomicrographs showing the distribution of ZO-1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. C, F: Images showing the distribution of vimentin (red), claudin 1 (green) and MECA 32 (white) immunoreactivity. D, E, F: High-magnification images corresponding to areas indicated in A, B, C respectively. A, B, D, E, sections are counterstained with Hoechst (blue).

No MECA 32 immunoreactivity was observed in SCO and neighboring structures. Vimentin immunoreactivity is distributed throughout the cells lining the third ventricle (3V in A, C, D, F). Remarkably, vimentin-positive elongated cell bodies (red in A, C, D, F) delimit the SCO in the brain parenchyma and line the ventricular wall. High-magnification images of the ventricular wall of the SCO showing occludin (A, D), ZO-1 (B, E) and claudin 1 (C, F) immunoreactivity organized in a continuous belt around vimentin-positive cell bodies, giving rise to the characteristic honeycomb pattern (arrows in D, E, F). These cells display also vimentin-positive basal processes extending into brain parenchyma (asterisk in A,C) and for few of them projecting to occludin-positive capillaries (empty arrow in A). Notably, brain vessels in neighboring structures are ZO-1- and occludin-positive and claudin 1-negative (empty arrows in A, B, C). 3V, third ventricle; PC, posterior commissure; PAG, periaqueductal gray. Coordinates relative to bregma for coronal sections: A-C (-2.55).

Scale bar = 100 μ m in A-C; 20 μ m in D-F.

170x125mm (300 x 300 DPI)

AC

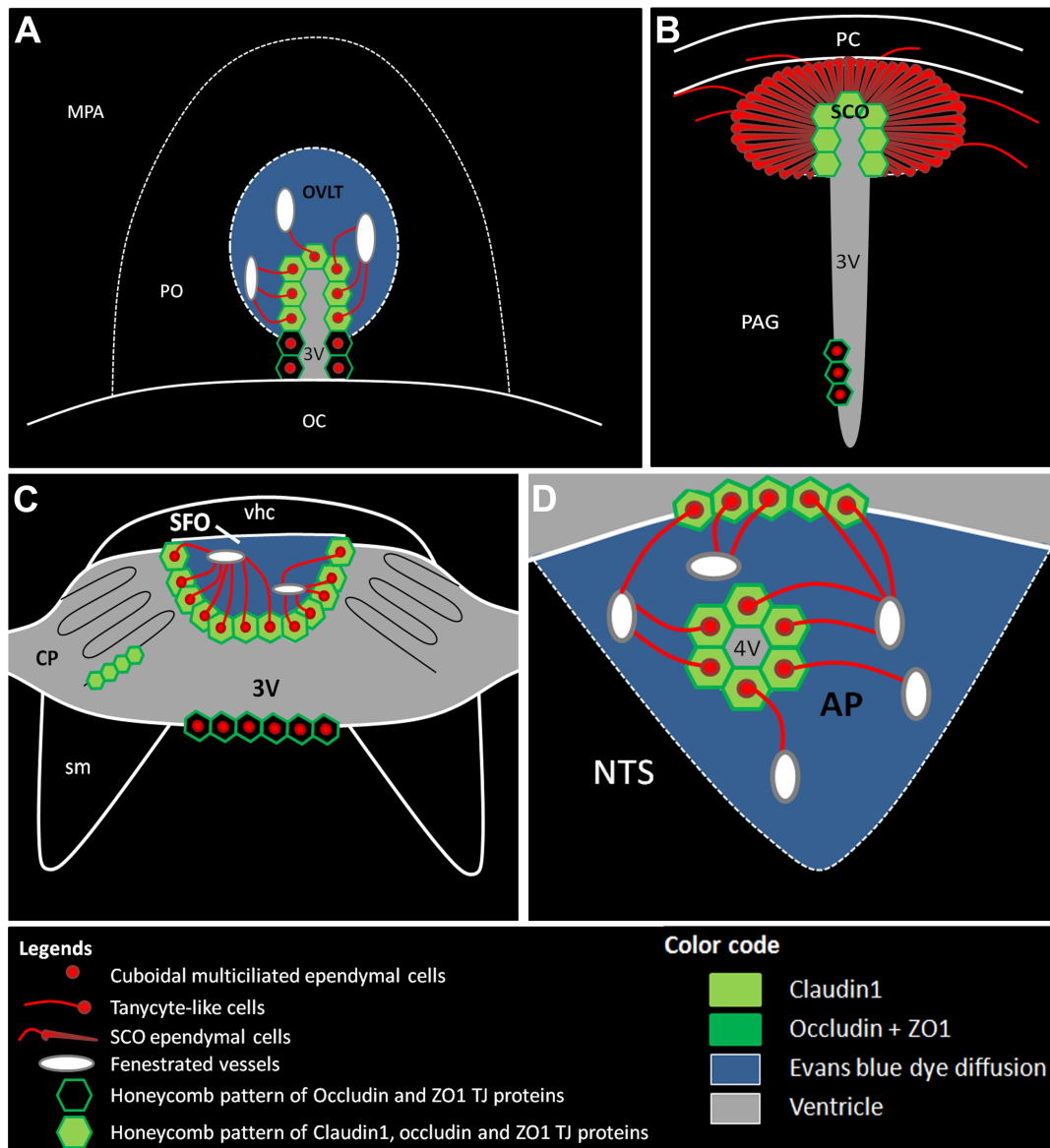


Figure 10. Representative figure summarizing the type of ependymal cells and the distribution of tight junction proteins in each CVO (A, OVLT; B, SCO; C, SFO; D, AP) of the mouse brain. OVLT, organum vasculosum laminae terminalis; SCO, subcommissural organ; SFO, sub-fornical organ; AP, area postrema; 3V, third ventricle; PO, preoptic nucleus; OC, optic chiasma; MPA, medial preoptic area; PC, posterior commissure; PrC, precommissural nucleus; PAG, periaqueductal gray; vhc, ventral hippocampal commissure; CP, choroid plexus; sm, stria medullaris; 4V, fourth ventricle; NTS, nucleus of the solitary tract; TJ: tight junction.

Antigen	Immunogen	Manufacturer, species, type, catalog number	Dilution used
Occludin	GST fusion protein consisting of aa 372-522 from C-terminus of human occludin fused to GST	Invitrogen, rabbit polyclonal, 404700	1:500
Zonula occludens-1	69 kD fusion protein corresponding to aa 463-1109 of human ZO-1	Invitrogen, rabbit polyclonal, 617300	1:500
Claudin 1	N-CRK TTS YPT PRP YPK PAP SSG KDY V- C synthetic peptide in the C-terminal sequence of human claudin 1	Invitrogen, rabbit polyclonal, 519000	1:100
Detyrosinated tubulin	N-GEEEGEE-C synthetic peptide corresponding to the seven C-terminal aa	Millipore, rabbit polyclonal, AB3201	1:500
Vimentin	Recombinant Golden Syrian hamster vimentin	Millipore, chicken polyclonal, AB5733	1:2000
MECA 32	Murine lymph node stroma	Gift from Prof. Britta Engelhardt (Switzerland), rat monoclonal	1:200
HuC/D	Elav family members HuC, HuD and Hel-N1	Molecular probes, Invitrogen, mouse monoclonal, A21271	1:200
GFAP	GFAP isolated from cow spinal cord	DakoCytomation, rabbit polyclonal, Z 0334	1:2000
GFAP	Purified bovine GFAP	Millipore, chicken polyclonal, AB5541	1:600

Table 1. Primary antibodies used in this study

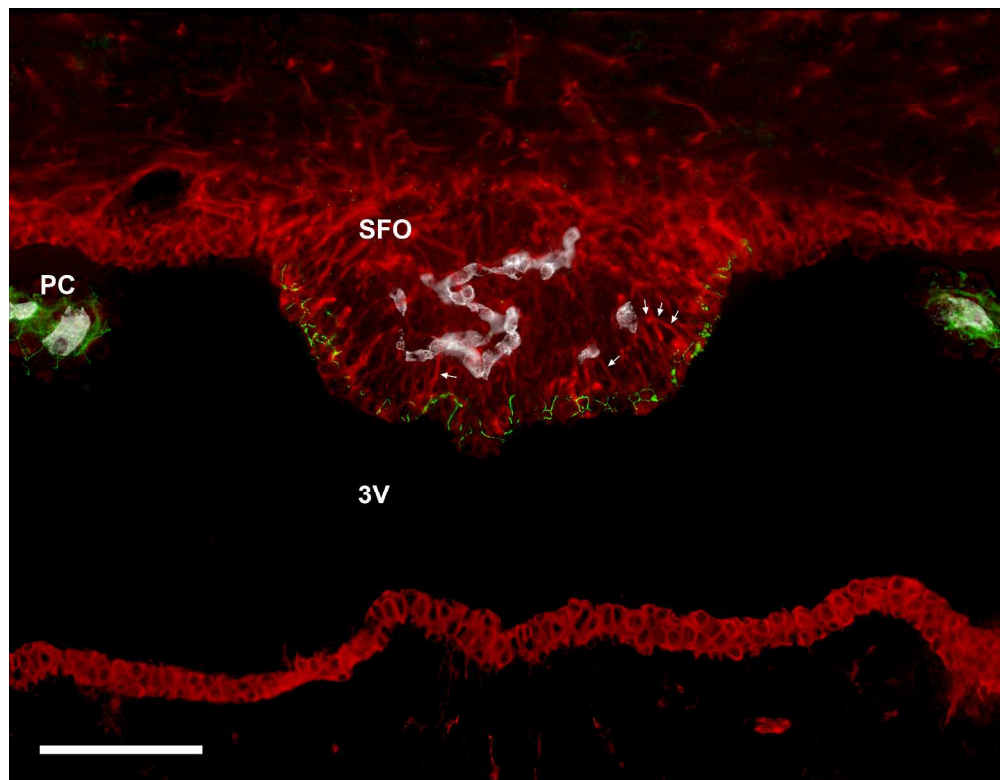
	Blood-brain barrier capillaries	Ependymal cells	Choroid plexus	Tanyocyte-like cells in CVOs				
				ME	OVL	SFO	AP	SCO
Occludin	+++	+	+++	++	++	++	++	++++
ZO-1	+++	+	+++	+++	++	++	+++	++++
Claudin 1	-	-	++++	++	++	+	++	++++

Table 2. Tight junction protein expression in blood-brain barrier capillaries, classic ependymal cells, choroid plexus and each of the CVOs of the mouse brain. The density of protein expression is indicated as very high (++++), high (+++), moderate (++), low (+) or undetectable (-) based on signal strength. ZO-1 and occludin are found in blood-brain barrier capillaries, ependymal cells and in the ependyma of CVOs. Interestingly, claudin 1 immunolabeling is found exclusively in CVO ependymal cells and the choroid plexus (considered a CVO by some authors) but not in brain capillaries or ependymal cells located outside the CVOs. The SCO and the choroid plexus express the most dense immunolabeling for tight junction proteins, whereas the SFO possesses the least dense immunolabeling. ME: median eminence; OVL, organum vasculosum of the lamina terminalis; SFO, subfornical organ; AP, area postrema; SCO, subcommissural organ.

F. LANGLET Graphical Abstract

Combining immunohistochemical with permeability studies, the authors provide evidence that tanycyte-like cells make up a blood-cerebrospinal fluid barrier at the ventricular wall of the circumventricular organs. Tight junction-bearing tanycyte-like cells facing the fenestrated vessels of the circumventricular organs ensure brain homeostasis by confining blood-borne molecules to these “brain windows”.

Accepted Article



Graphical Abstract Image

Expression pattern of claudin 1 in vimentin-positive ependymal cells and their association with MECA 32-immunoreactive fenestrated capillaries in coronal sections of the mouse subfornical organ (SFO). In the SFO, vimentin-positive ependymal cells (red) extend processes into the brain parenchyma (arrows) and contact MECA 32-positive fenestrated vessels (white) localized in the parenchyma of the SFO. Claudin 1 (green) expression is restricted to the ependymal cells of the SFO, as no immunoreactivity is detected in blood-brain barrier capillaries or in cuboidal ependymal cells. Claudin 1 is expressed in a honeycomb pattern around ependymal cell bodies. These results illustrate the specialization of the ependymal cell forming the SFO ventricular wall. 3V, third ventricle; CP, choroid plexus; SFO, subfornical organ. Scale bar = 100 μ m.

324x250mm (300 x 300 DPI)

Acce

Lors de ma thèse, j'ai réalisé d'autres travaux qui n'ont pas encore fait l'objet de publications. Ces travaux sont en relation avec l'étude traitant de la plasticité de l'éminence médiane et du noyau arqué lors du jeûne (*Cell Metabolism*, 2013). Ils seront décrits brièvement dans les pages qui suivent de ce manuscrit. Ils concernent, dans l'ordre :

- 1- la conservation de la plasticité induite par le jeûne selon l'origine des animaux et leur type d'alimentation (p.93),
- 2- la cinétique de mise en place de la plasticité de l'éminence médiane lors du jeûne (p.97),
- 3- la plasticité de l'éminence médiane selon le rythme circadien (p.99),
- 4- l'implication des corticostéroïdes dans l'organisation de la barrière tanycytaire (p.102),
- 5- l'étude de l'éminence médiane chez des souris rendues obèses par une alimentation riche en graisse (p.105).

Conservation de la plasticité de l'interface sang/NA induite par le jeûne chez des souris ayant différents élevages d'origine ou différentes alimentations : Etude de la distribution des vaisseaux fenêtrés au niveau de l'éminence médiane et du noyau arqué

Notre première étude de la plasticité de l'interface sang/NA publiée dans *Cell Metabolism* en avril 2013 a été réalisée chez des souris C57BL/6 issues des élevages Charles River et nourries avec une alimentation RM3 (Special diet service, cf annexe 4, p. 169). Cependant, lors de collaborations effectuées dans divers laboratoires, nous avons observé des différences d'organisation de cette interface sang/NA selon le type d'hébergement, la nourriture ou l'élevage d'origine des souris. Ce phénomène n'est guère étonnant étant donné les propriétés plastiques de cette région cérébrale révélées dans de nombreuses publications (cf. introduction).

Par conséquent, nous avons voulu déterminer si notre phénotype dit « à jeun », caractérisé par une augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés dans l'EM et le NA, et une redistribution des protéines de JS tanycytaires, est toujours observable dans des conditions expérimentales différentes des nôtres. Pour cela, nous avons étudié la plasticité de l'interface sang/NA lors du jeûne chez des souris ayant différents régimes alimentaires (RM1, ou *low fat diet* 10 % (nourriture contrôle « chow » de la *high fat diet* 60%), cf annexe 4, p.169) et chez des souris issues des élevages Janvier. Le protocole utilisé dans cette étude est le même que celui décrit dans Langlet *et coll.* (*Cell Metabolism*, 2013). Pour résumer, 24h avant le sacrifice, les souris ont été placées dans de nouvelles cages et divisées en deux groupes, un groupe nourri (« Fed ») et un groupe à jeun (« Fasted »). 24h après, une injection de bleu Evans a été réalisée via la veine caudale et les souris ont été sacrifiées. Des marquages immunohistochimiques pour MECA-32 (marqueur des fenestrations) et ZO-1 (protéine de JS) ont été réalisés sur l'ensemble de l'EM/NA et nous ont permis d'analyser l'organisation neuroanatomique de l'interface sang/NA. Pour l'instant, seule l'organisation des vaisseaux fenêtrés a été analysée.

Tout d'abord, nos résultats confirment nos premières observations : il existe des différences d'organisation de l'EM entre les différents groupes de souris en condition nourrie (Figure 1 et 2). En effet, les souris C57BL/6 issues des élevages Charles River présentent moins de anses fenêtrées que les souris C57BL/6J issues des élevages Janvier, suggérant un **effet « origine de la souris »** sur l'organisation neuroanatomique de l'EM. De plus, les souris C57BL/6 issues des élevages Charles River présentent des différences d'organisation de l'EM selon leur type d'alimentation. En effet, sous alimentation RM3, elles possèdent moins de anses fenêtrées que sous alimentation RM1 ou *low fat diet* 10%, suggérant un **effet « alimentation »** sur l'organisation neuroanatomique de l'EM.

Cependant, la plasticité vasculaire de l'EM/NA, identifiée dans notre première étude chez l'animal à jeun, a été observée dans toutes les conditions étudiées (Figure 3). En effet, l'augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés induite par une mise à jeun de 24h est retrouvée quelque soit le nombre de vaisseaux fenêtrés dans l'EM en condition nourrie.

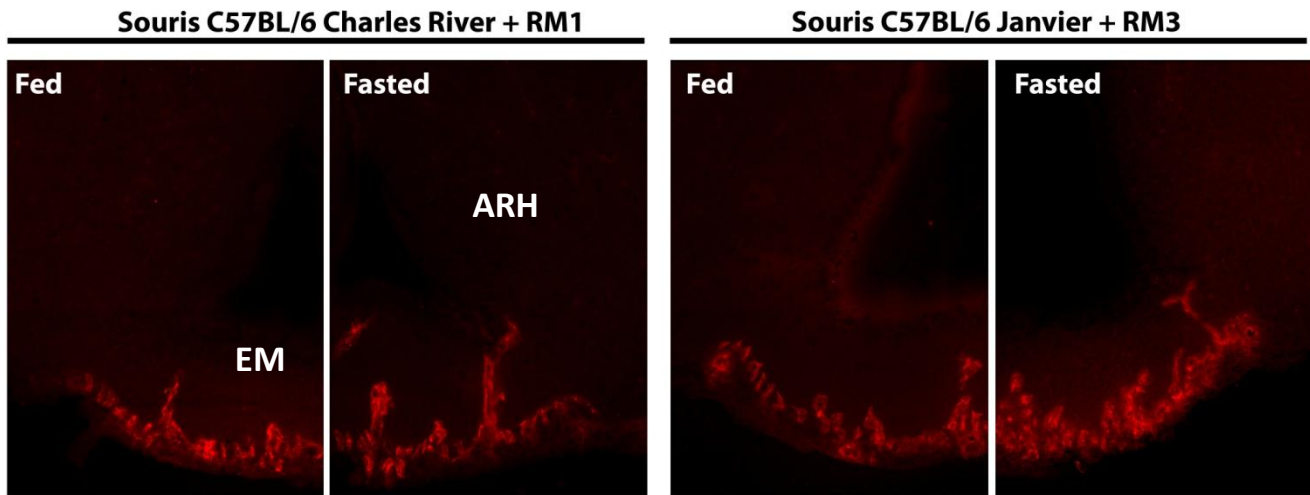


Figure 1: Photographies montrant les vaisseaux fenêtrés de l'EM en condition nourrie et à jeun. ARH = noyau arqué ; EM = éminence médiane ; Fed = condition nourrie ; Fasted = condition à jeun

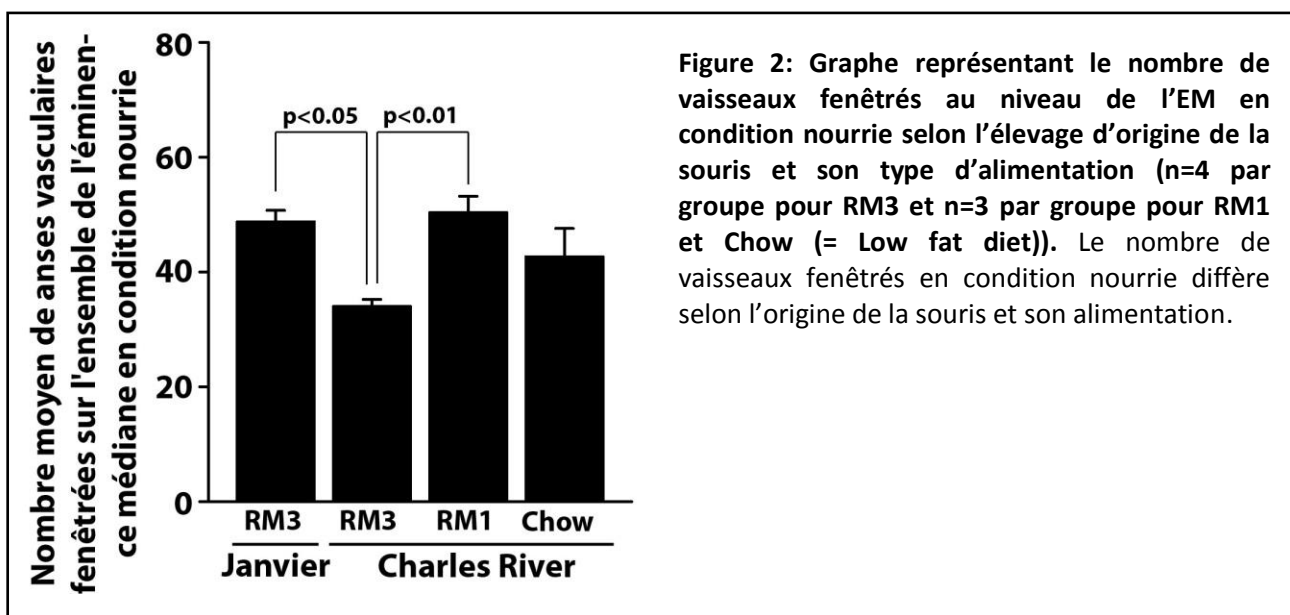
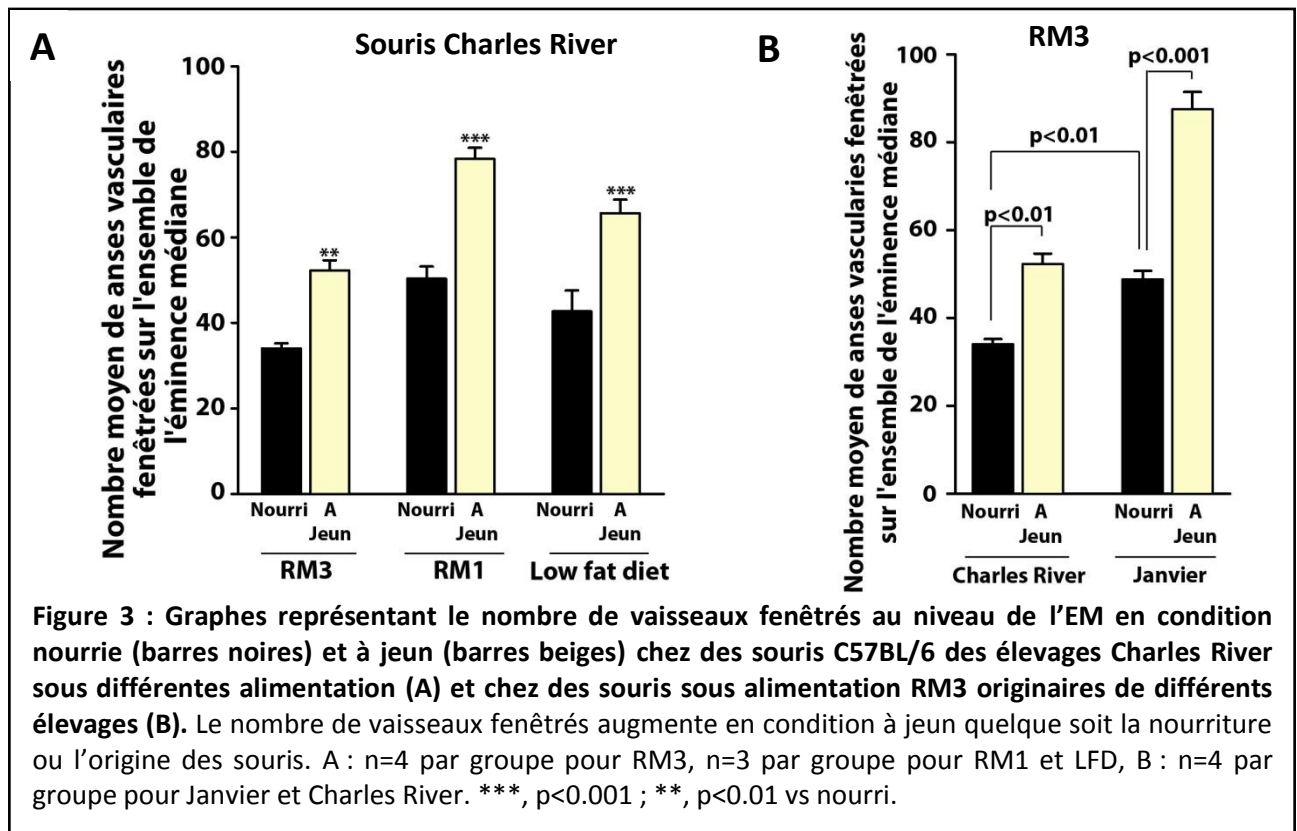
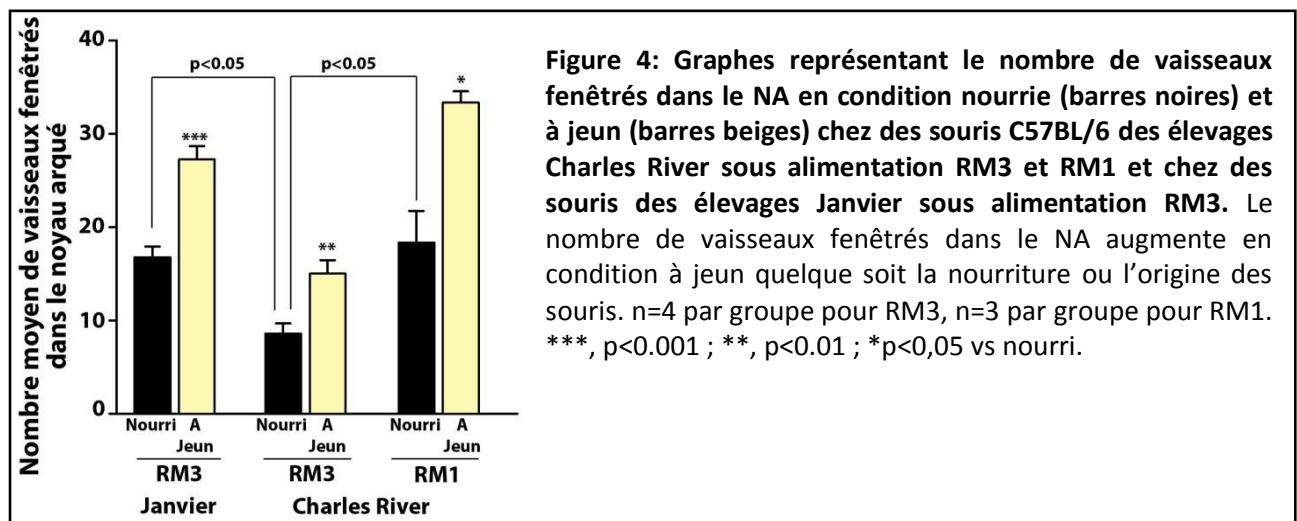


Figure 2: Graphe représentant le nombre de vaisseaux fenêtrés au niveau de l'EM en condition nourrie selon l'élevage d'origine de la souris et son type d'alimentation (n=4 par groupe pour RM3 et n=3 par groupe pour RM1 et Chow (= Low fat diet)). Le nombre de vaisseaux fenêtrés en condition nourrie diffère selon l'origine de la souris et son alimentation.



Au niveau du NA, les souris C57BL/6 des élevages Charles River sous alimentation RM3 présentent moins de vaisseaux fenêtrés que les souris C57BL/6J des élevages Janvier également sous alimentation RM3. De plus, les souris C57BL/6 des élevages Charles River sous alimentation RM3 possèdent moins de vaisseaux fenêtrés que celles sous alimentation RM1. Malgré ces différences, l'augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés dans le NA induite par une mise à jeun de 24h est retrouvée quelque soit l'origine ou l'alimentation de la souris (Figure 4).



Pour résumer, en condition nourrie, des différences d'organisation de l'EM/NA existent selon l'origine des souris et leur alimentation, notamment un nombre plus ou moins élevé de vaisseaux fenêtrés dans l'EM et le NA. Ces résultats expliqueraient les différences, relatées dans la littérature, concernant la diffusion dans l'hypothalamus médiobasal de traceurs injectés dans le sang : en effet, certaines publications décrivent une diffusion uniquement dans le parenchyme de l'EM (Mullier et al, 2010) tandis que d'autres la décrivent également dans le NA (Morita et al., 2013). La présence ou non de vaisseaux fenêtrés dans le NA permettrait alors un accès plus ou moins important des molécules périphériques vers ce noyau hypothalamique. Cependant, lors du jeûne, le nombre de vaisseaux fenêtrés augmente dans l'EM et dans le NA quelque soit le régime alimentaire ou l'élevage d'origine de la souris : cette augmentation de la perméabilité vasculaire permettrait alors d'augmenter la zone de diffusion des molécules périphériques dans le NA. Ainsi, en condition nourrie, quelques neurones auraient accès aux informations périphériques ; tandis qu'en condition à jeun, un plus grand nombre y aurait accès permettant ainsi d'engendrer une réponse physiologique adaptée au mieux à l'état énergétique de la souris.

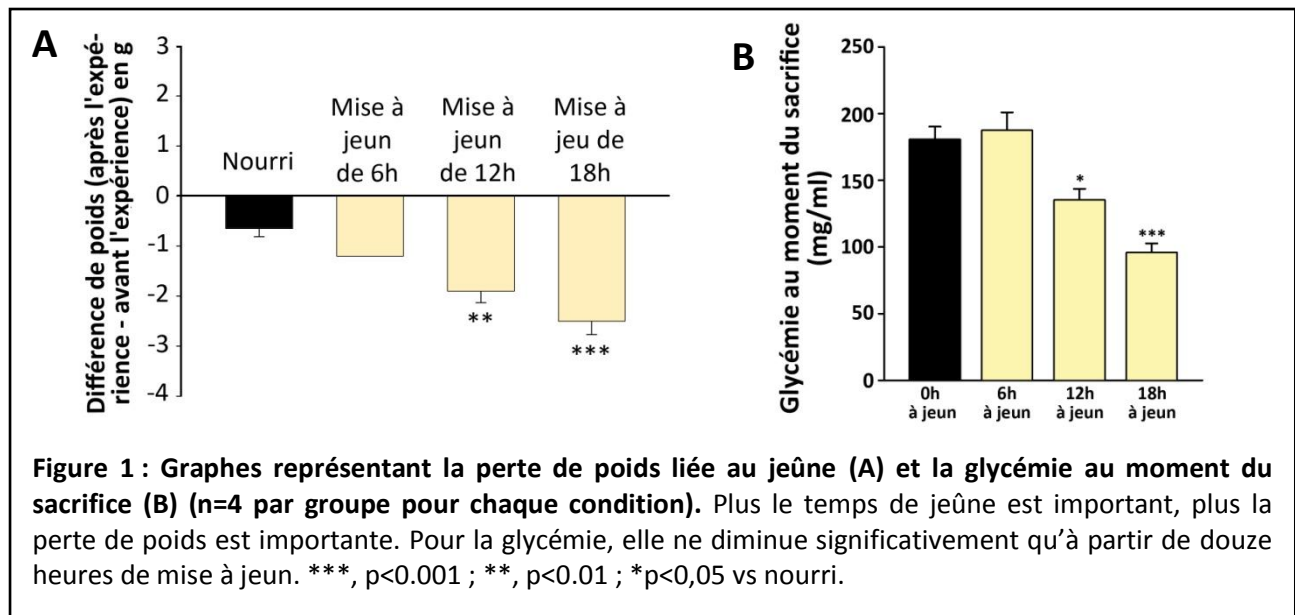
Afin de compléter cette étude, nous devons dans un premier temps finir nos analyses sur la diffusion du bleu Evans au niveau du NA dans les différentes conditions étudiées. Par ailleurs, nous devons également finir d'analyser l'organisation des protéines de JS afin de déterminer si l'association entre l'augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés et la réorganisation des JS au niveau des tancytes adjacents est toujours observées.

Par la suite, les causes des différences organisationnelles entre chaque condition devront être étudiées. Ces premières expériences nous ont permis de déterminer un **effet « origine de la souris »** et un **effet « alimentation »**. Ainsi, l'étude des différences génétiques existant entre les souris Janvier et les souris Charles River permettrait de déterminer l'implication de certains gènes dans l'organisation et la plasticité de l'EM. Concernant le régime alimentaire, il faudrait dans un premier temps comparer la composition des différentes alimentations utilisées dans cette étude (annexe 4), puis créer des régimes alimentaires spéciaux ne faisant varier qu'un constituant à la fois afin de déterminer l'impact de chacun sur l'organisation et la plasticité de l'EM. Enfin, d'autres études pourraient également être menées en modifiant le milieu de vie de la souris (en la plaçant par exemple dans un milieu enrichi) pour déterminer l'**effet « environnement »** sur l'organisation de l'EM.

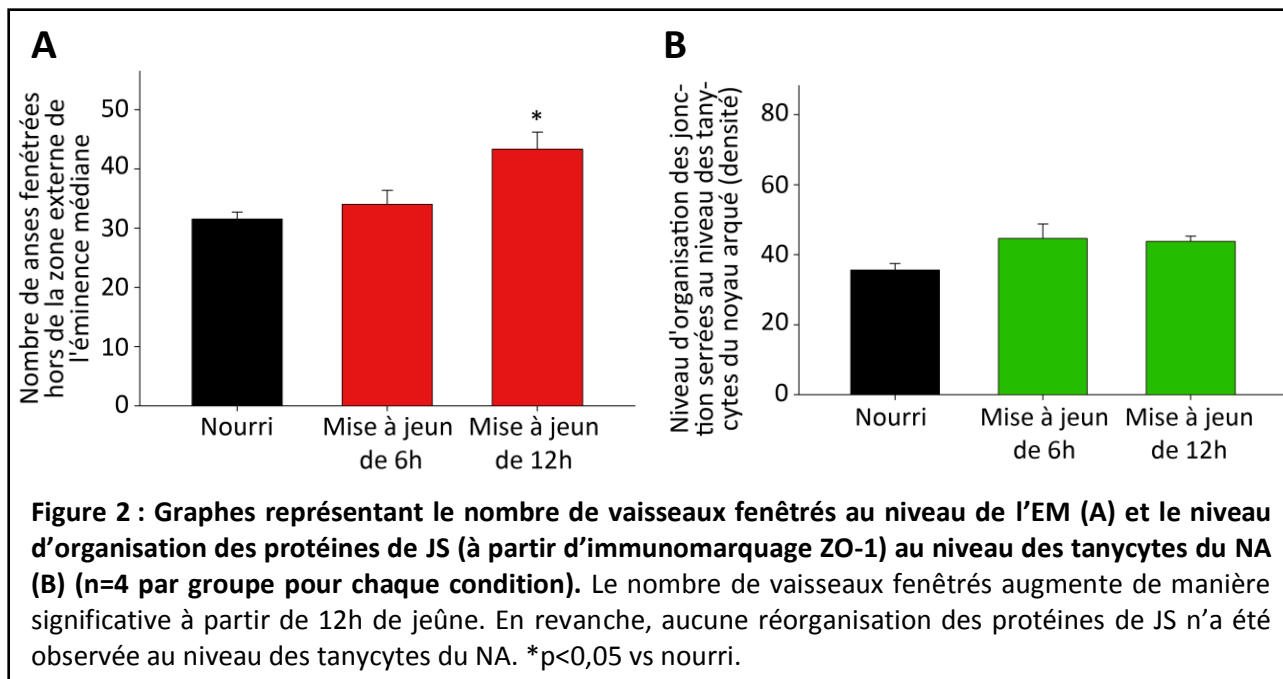
Cinétique de la mise en place de la plasticité de l'EM au cours du jeûne (en collaboration avec Rémi Stochmal, Master 1)

La plasticité de l'interface sang/NA publiée dans *Cell Metabolism* (2013) a été induite par un jeûne de 24h. Cependant, notre étude ne décrit pas le temps de mise en place de cette plasticité. Lors de l'encadrement d'un étudiant en master, Rémi Stochmal, nous avons réalisé différents temps de mise à jeun (de 6h, 12h et 18h) afin de déterminer la chronologie des différentes réorganisations observées à 24h de jeûne. Chez ces souris, nous avons suivi à la fois le poids et la glycémie avant le sacrifice puis étudié l'organisation de l'interface sang/cerveau dans l'hypothalamus médiobasal. Le protocole utilisé pour cette étude est le même que celui décrit dans Langlet *et coll.* (*Cell Metabolism*, 2013).

Afin de suivre la mise à jeun, nous avons mesuré le poids et la glycémie avant et après les mises à jeun. Plus le temps de mise à jeun est long, plus les animaux perdent du poids : cette perte de poids est significative à partir de 12h de mise à jeun. Concernant la glycémie, elle diminue significativement à partir de 12h de jeûne (Figure 1).



Ensuite, nous avons étudié l'organisation des vaisseaux fenêtrés et de la barrière tancytaire au niveau de l'EM et du NA grâce à des marquages MECA-32 et ZO-1. Seuls les cerveaux à 6h et 12h de mise à jeun ont été analysés pour le moment. L'augmentation du nombre de anses fenêtrées dans l'EM est observable à partir de 12h de mis à jeun, tandis que la réorganisation des JS n'a toujours pas eu lieu (Figure 2).



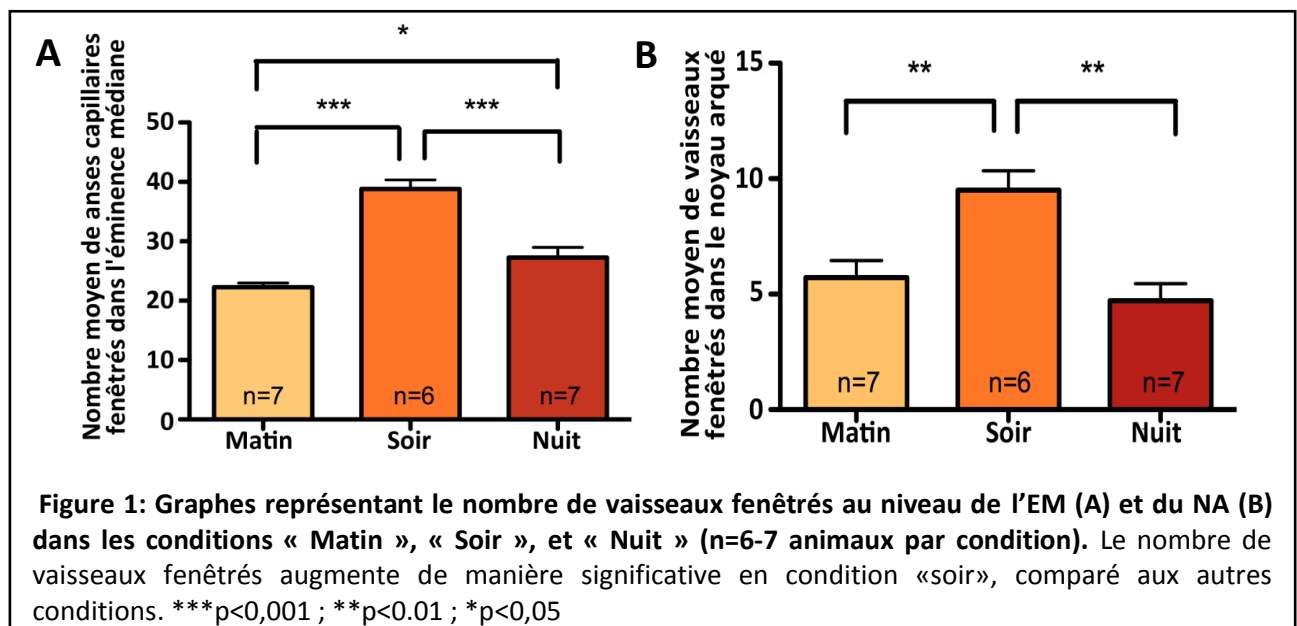
Ces résultats suggèrent que l'augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés serait le premier phénomène à se produire, puis viendrait la réorganisation des protéines de JS. Pour vérifier cette hypothèse, nous devons continuer nos analyses chez les souris sacrifiées à 18h de jeûne et voir si la réorganisation des protéines de JS s'est mise en place. Ces résultats suggèrent également que la plasticité des JS tanocytaires serait une plasticité en réponse à la plasticité vasculaire. En effet, afin de protéger le cerveau de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, les protéines de JS se réorganiseraient : la barrière tanocytaire s'étendrait alors à tout l'épendyme juxtaposant des vaisseaux fenêtrés, y compris l'épendyme du NA, afin de maintenir l'homéostasie cérébrale.

Concernant la glycémie, bien qu'étant significativement plus basse à 12h de jeûne, sa valeur reste cependant assez élevée (environ 140 mg/ml). Sa diminution importante (sous la barre des 100 mg/ml), que l'on peut qualifier d'hypoglycémie, ne se déroule qu'à partir de 18h de jeun. Cependant, la plasticité au niveau des vaisseaux sanguins est significative dès 12h de jeûne, suggérant une détection d'une glucopénie plus précocement. Une hypothèse que l'on peut émettre est qu'une détection d'une glucopénie pourrait s'effectuer dans les premières heures de mise à jeun et que la glycémie pourrait être régulée jusqu'à 12h de mise à jeun grâce à différents phénomènes physiologiques (dits de contre-régulation de l'hypoglycémie) tels que la sécrétion de catécholamines, de corticostérone ou de glucagon. La glucopénie initiale serait néanmoins suffisante pour induire des changements structuraux au niveau de l'EM.

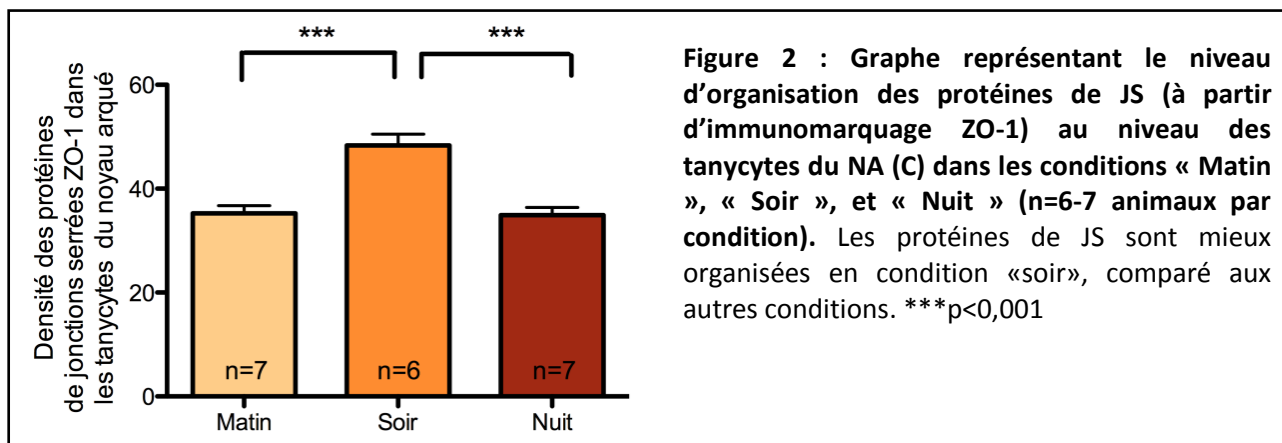
Plasticité de l'éminence médiane selon le rythme circadien (en collaboration avec Aurélie Défaux, master 2)

La plasticité de l'interface sang/NA publiée dans *Cell Metabolism* (2013) a été induite par un jeûne de 24h. Bien que ce temps de jeûne puisse se produire dans la nature, il est cependant long et peu physiologique. Qu'en est-il alors des jeûnes dits « physiologiques » ? La plasticité de l'EM peut-elle se produire chez la souris au cours de la journée avec les alternances jour (période de « jeûne ») et nuit (période de prise alimentaire) ? Les résultats décrits dans la partie précédente à propos de la cinétique de mise en place de la plasticité de l'EM/NA montrent que 12h de mise de jeun sont suffisantes pour induire une plasticité vasculaire au niveau de l'EM, suggérant ainsi que cette plasticité pourrait se mettre en place au cours de la journée. Pour évaluer l'état des vaisseaux fenêtrés et de la barrière tancytaire selon le rythme circadien, nous avons réalisé des sacrifices à différents moments de la journée : 1h00 (condition «Nuit»), 7h00 (condition «Matin»), et 19h00 (condition «Soir»). Chez ces souris, la diffusion du bleu Evans et l'organisation de l'EM/NA -ses vaisseaux fenêtrés et ses JS- ont été étudiées. Le protocole utilisé pour cette étude est le même que celui décrit dans Langlet *et coll.* (*Cell Metabolism*, 2013).

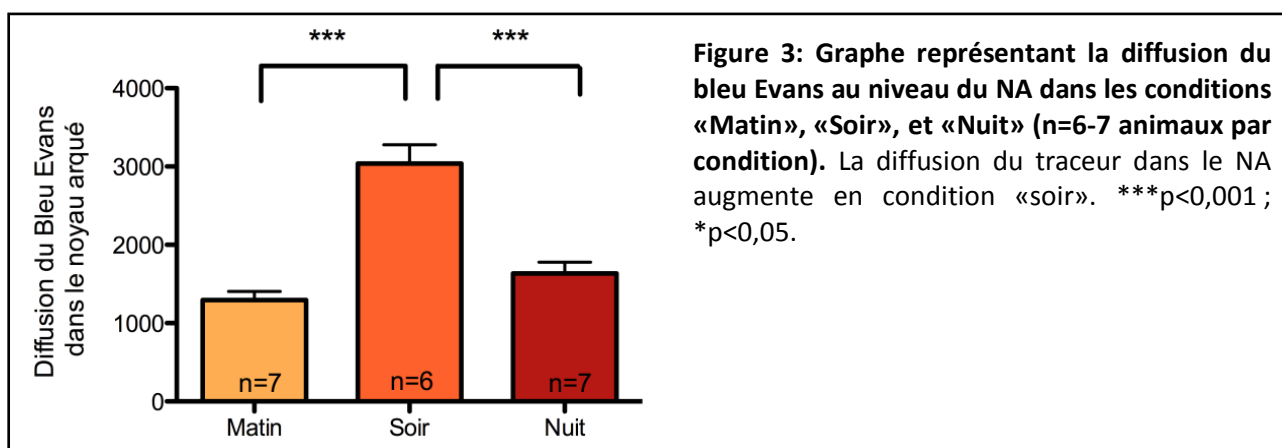
Les résultats indiquent que, chez les souris C57BL/6 des élevages Charles River sous alimentation RM3, une plasticité vasculaire et une réorganisation de la barrière tancytaire sont observées au niveau de l'interface sang/NA en condition «Soir». En effet, après quantification, on observe une augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés en condition «Soir» par rapport aux conditions «Matin» et «Nuit» au niveau de l'EM et du NA (Figure 1A et 1B). De manière intéressante, le nombre de anses fenêtrées au niveau de l'EM reste élevé durant la nuit chez ces souris (Figure 1A).



Cette plasticité vasculaire est associée à une augmentation significative du niveau d'organisation de la protéine de ZO-1 au niveau des tancytes du NA en condition «Soir» par rapport aux conditions «Matin» et «Nuit» (Figure 2).



Afin d'évaluer l'impact de cette réorganisation de l'EM/NA en condition «soir» sur l'accès des molécules périphériques, nous avons analysé la diffusion du bleu Evans dans le NA au cours du cycle circadien suite à son injection via une veine caudale au moment du sacrifice (Figure 3). Après quantification, la diffusion du bleu Evans est plus importante dans le NA en condition « Soir » par rapport aux autres conditions.

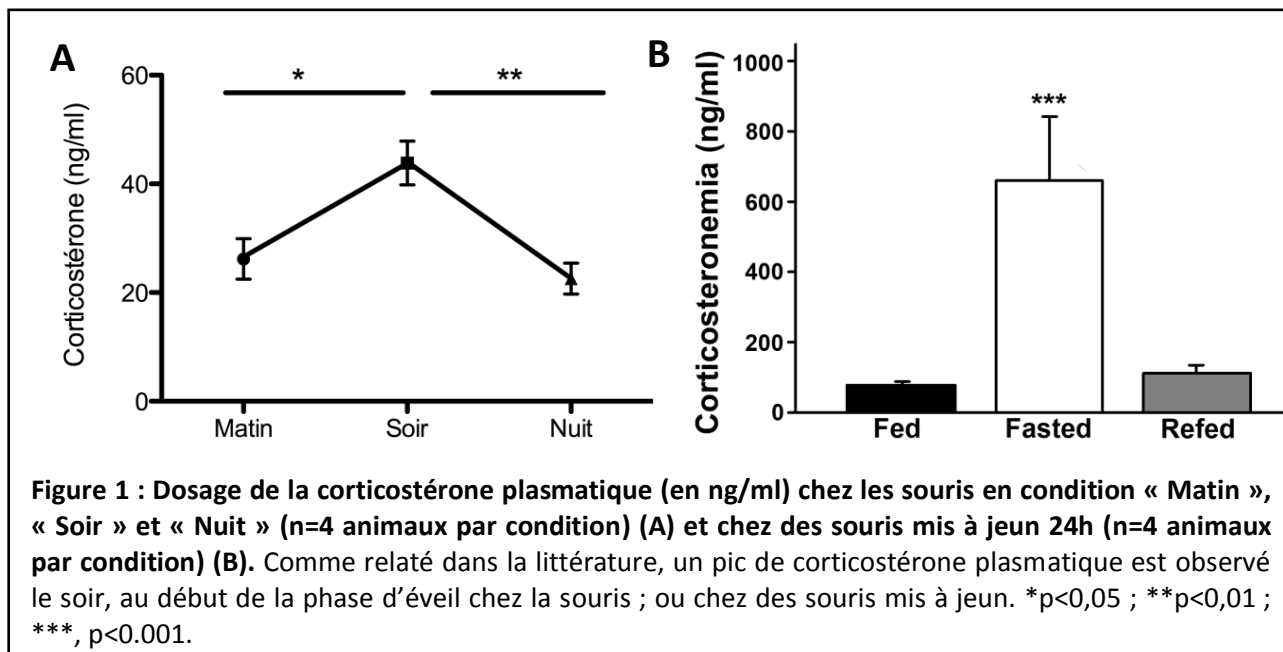


Ainsi, des différences d'organisation structurale de l'EM/NA existent aussi selon le moment de la journée. A la fin de la phase de repos et de jeûne, correspondant à la journée chez la souris, la réorganisation de l'EM/NA permettrait un meilleur accès des molécules périphériques vers le NA. Ce phénomène pourrait alors participer à l'éveil de la souris et à l'induction des comportements observés lors de la phase active, notamment le comportement alimentaire.

Pour poursuivre cette étude, afin de comprendre l'intérêt physiologique de cette réorganisation de l'EM/NA se déroulant le soir, nous devons, dans un premier temps, l'inhiber et étudier le comportement de la souris, notamment grâce à l'utilisation de cages métaboliques. De plus, nous devons déterminer les causes de cette réorganisation : celle-ci pourrait être liée aux rythmes circadiens de sécrétions hormonales. Par ailleurs, on pourrait également étudier le rythme circadien de sécrétion du VEGF-A par les tanocytes : en effet, des études récentes suggèrent que ce facteur de croissance pourrait aussi avoir une sécrétion rythmée par les cycles jour/nuit.

Le rôle des glucocorticoïdes dans la plasticité de l'EM induite par le jeûne

L'ensemble des résultats décrits précédemment quant à l'induction d'une plasticité de l'EM/NA lors de jeûne (Cell Metabolism 2013) ou le soir chez la souris (p.99) laissent supposer l'implication, outre du glucose, des corticostéroïdes dans ce phénomène. En effet, une augmentation des niveaux de corticostéroïdes est observée le soir -avant la phase d'éveil de l'animal-, ou lors de jeûnes - correspondant à des situations de stress chez l'animal- (Figure 1).



Parmi les corticostéroïdes, les glucocorticoïdes sont les hormones jouant un rôle primordial dans la réponse au jeûne. En effet, les glucocorticoïdes augmentent le métabolisme glucidique et protidique afin de libérer les stocks énergétiques pour résister au stress (en l'occurrence ici au jeûne). Les glucocorticoïdes jouent également un rôle dans la régulation de la prise alimentaire. En effet, une adrénalectomie diminue la prise alimentaire et le poids, induisant une diminution des niveaux de leptine et insuline. Ce phénomène reposerait sur le fait que l'adrénalectomie diminue l'expression basale de NPY, de CART, de POMC et d'AgRP ; et empêche la diminution de POMC/CART induite par le jeûne (Savontaus et al, 2002).

Afin d'étudier l'implication des glucocorticoïdes dans la plasticité de l'EM, une injection d'inhibiteur de leur récepteur GR, la mifépristone, a été réalisée chez des souris nourries ou à jeun. Le nombre de vaisseaux fenêtrés a tout d'abord été analysé au niveau de l'EM : cependant, la plasticité vasculaire induite par le jeûne n'a pas été retrouvée dans la condition « sans mifépristone », probablement en raison du véhicule utilisé (éthanol) qui est connu pour inhiber la voie de signalisation du VEGF. Nous n'avons donc pas pu conclure quant à l'effet des corticostéroïdes sur cette plasticité.

L'étude de l'organisation de la barrière tanycytaire a ensuite été réalisée (Figure 2). L'inhibition des glucocorticoïdes induit une ouverture de la barrière tanycytaire chez des souris nourries ou à jeun (Figure 3) : les JS des tanycytes de l'EM, qui formaient initialement la barrière tanycytaire, sont totalement désorganisées. De plus, les JS des tanycytes du NA ne se réorganisent pas lors du jeûne.

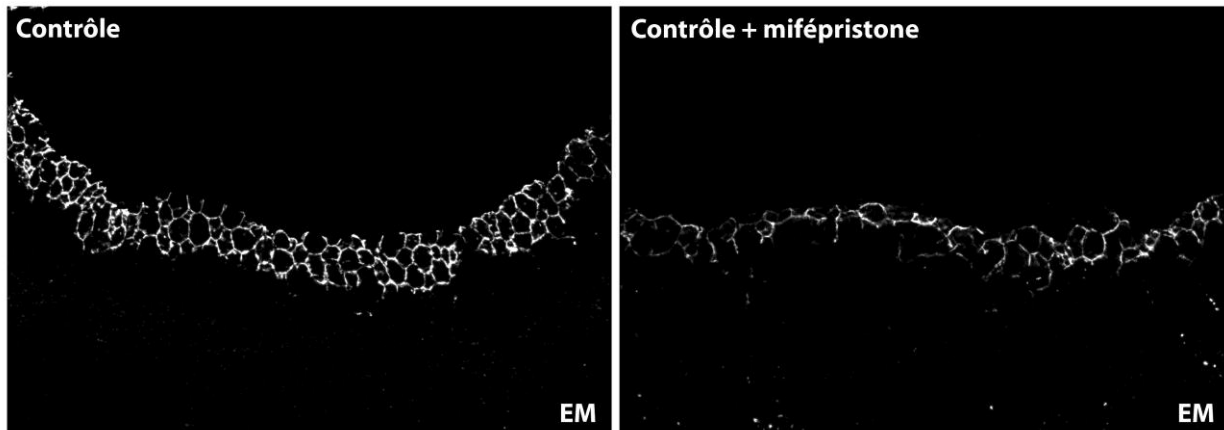


Figure 2: Photographies montrant l'organisation de la protéine de JS ZO-1 au niveau des tanycytes de l'EM avec ou sans mifépristone en condition nourrie.

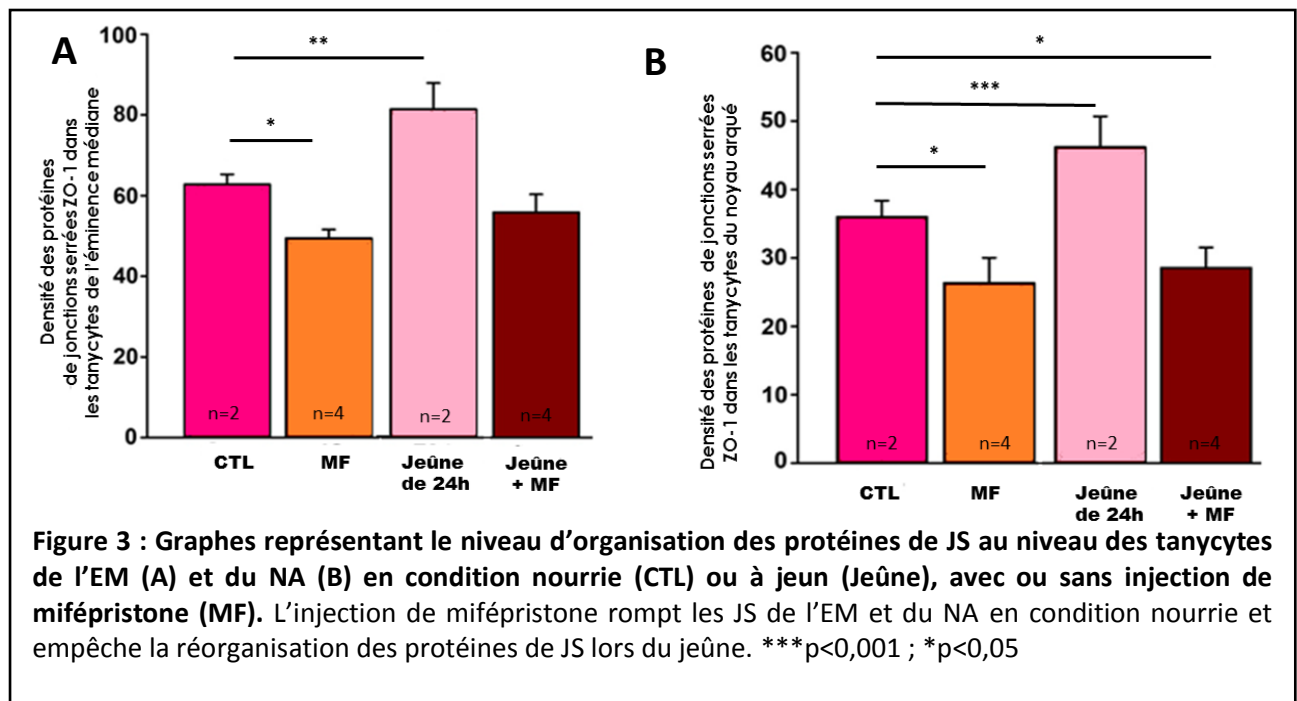


Figure 3 : Graphes représentant le niveau d'organisation des protéines de JS au niveau des tanycytes de l'EM (A) et du NA (B) en condition nourrie (CTL) ou à jeun (Jeûne), avec ou sans injection de mifépristone (MF). L'injection de mifépristone rompt les JS de l'EM et du NA en condition nourrie et empêche la réorganisation des protéines de JS lors du jeûne. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$

Afin d'évaluer l'impact de la désorganisation de la barrière tanycytaire sur l'accès des molécules périphériques au NA, nous avons analysé la diffusion du bleu Evans dans ce noyau hypothalamique. Le bleu pénètre très profondément dans le parenchyme cérébral et inonde complètement le NA (Figure 4 et 5).

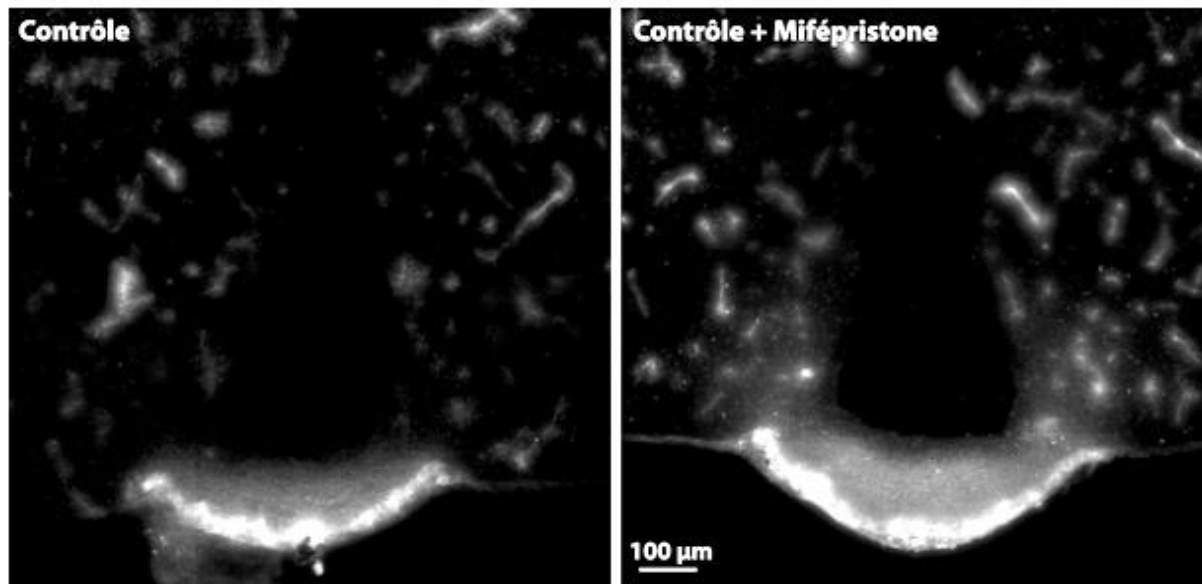


Figure 4 : Photographies montrant la diffusion du bleu Evans dans le NA avec ou sans mifépristone en condition nourrie.

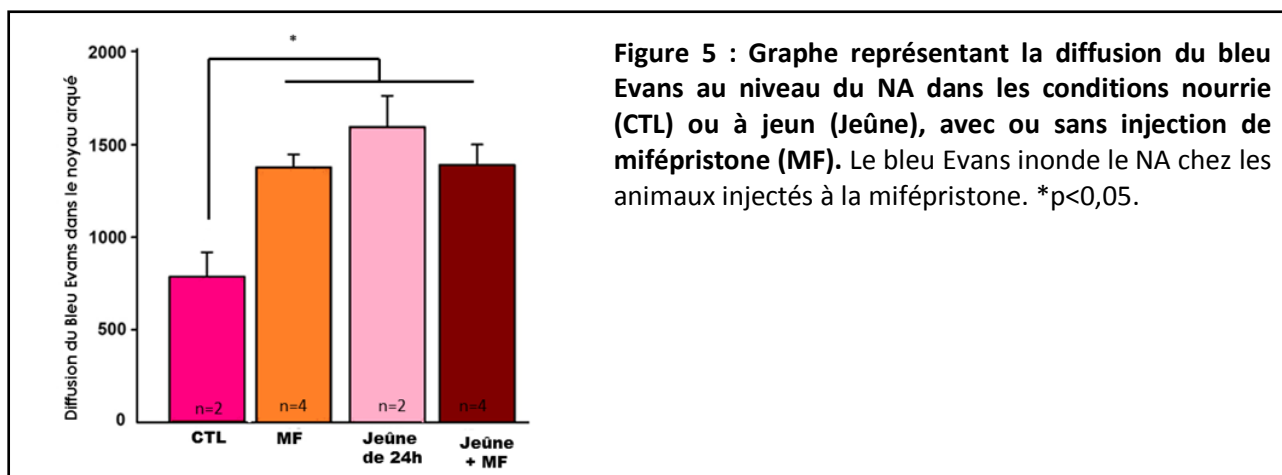


Figure 5 : Graphe représentant la diffusion du bleu Evans au niveau du NA dans les conditions nourrie (CTL) ou à jeun (Jeûne), avec ou sans injection de mifépristone (MF). Le bleu Evans inonde le NA chez les animaux injectés à la mifépristone. * $p < 0,05$.

Ainsi, ces résultats montrent que 1- les corticostéroïdes sont importantes pour l'établissement et le maintien des propriétés de la barrière tanycytaire au niveau de l'EM et qu' 2- elles pourraient intervenir dans la réorganisation des protéines de JS au niveau des tanycytes du NA lors du jeûne. Cependant, ces résultats sont à nuancer. En effet, la mifépristone est également un inhibiteur des récepteurs à la progestérone. Pour confirmer l'implication des glucocorticoïdes dans l'établissement de la barrière tanycytaire, il nous faudrait par la suite utiliser d'autres inhibiteurs plus spécifiques. En parallèle, des expériences d'adrénalectomie pourraient être réalisées.

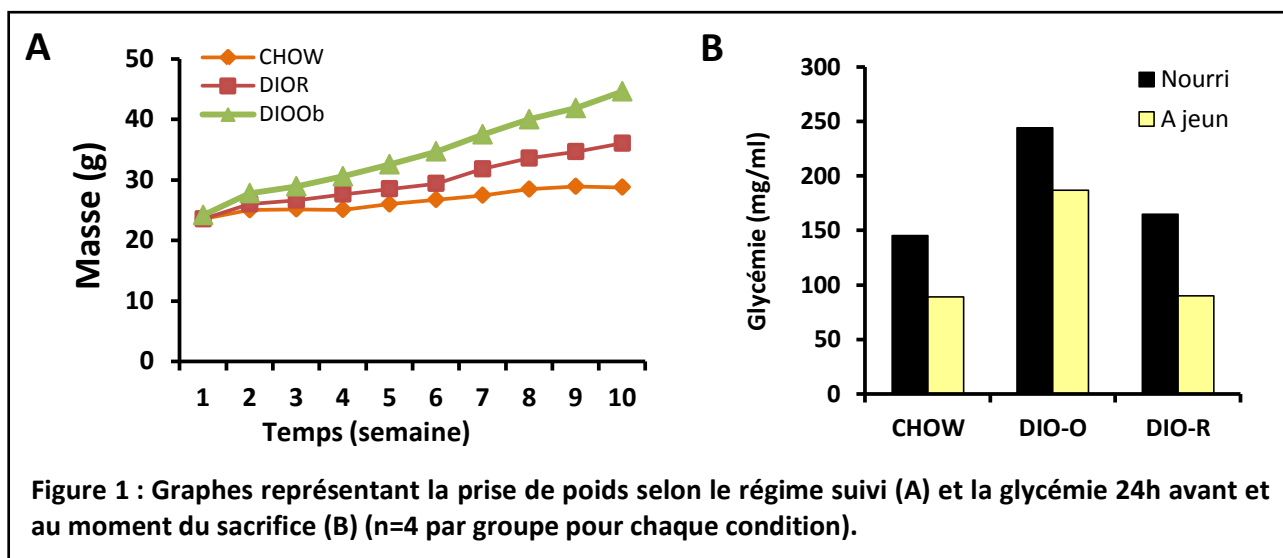
Cette étude nous fournit également des informations sur l'implication de la barrière tanycytaire dans la diffusion des molécules périphériques vers le parenchyme cérébral. En condition nourrie, le bleu reste cloîtré dans l'EM. En condition nourri + mifépristone (quand la barrière tanycytaire est totalement désorganisée), le bleu Evans inonde totalement le NA suggérant que la barrière tanycytaire régule la diffusion de traceurs vers ce noyau hypothalamique.

Etude de l'organisation de l'éminence médiane chez les souris rendues obèses par une alimentation riche en graisse

Dans nos sociétés occidentales, de plus en plus d'obèses sont recensés chaque année. Il est désormais admis que l'hyperphagie et le manque de dépenses énergétiques sont les principales causes de l'obésité observée dans nos pays occidentaux. De ce fait, les modèles murins de « diet-induced obesity » (DIO), où l'obésité est induite par une alimentation riche en graisse, se rapprochent fortement de l'obésité humaine et sont donc des modèles pertinents pour l'étudier. Ces souris, suite à l'ingestion pendant plusieurs semaines de nourriture riche en graisse, développent une obésité associée à une augmentation de la graisse sous cutanée et viscérale, deviennent leptinorésistantes et diabétiques. Cette résistance à la leptine est spécifique au NA : en effet, elle se développe initialement à ce niveau puis plus tardivement dans les autres noyaux hypothalamiques (Münzberg et al., 2004), suggérant en premier lieu un problème d'accès de la leptine vers le NA, puis d'une résistance centrale généralisée. De plus, les souris DIO ne répondent plus au jeûne. En effet, elles possèdent une faible réponse hyperphagique suite à la réalimentation en raison de l'absence d'activation du NA normalement induites par le jeûne (Becskei et al, 2009) et de l'augmentation d'expression de NPY/AgRP (Briggs DI et al., 2011). Ces phénomènes seraient dus au fait que les niveaux de leptine, d'insuline et de glucose restent hauts durant le jeûne chez ces souris (Becskei et al, 2009).

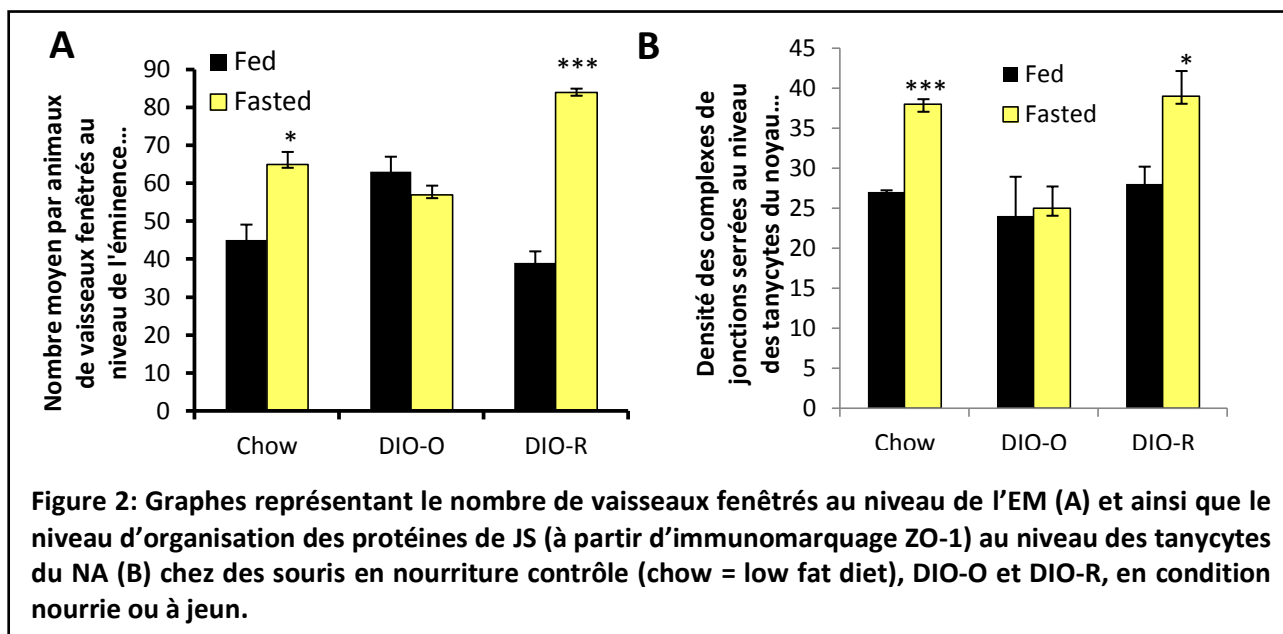
Ces expériences montrent donc une incapacité pour le NA à reconnaître ou/et répondre aux signaux périphériques. Nous avons alors émis l'hypothèse suivante : il existerait un problème de régulation de l'accès des molécules périphériques vers le SNC au niveau de l'EM. Les anomalies des taux des signaux périphériques créeraient une dérégulation de l'interface sang/cerveau, perturbant alors les échanges sang/cerveau. Pour étudier l'organisation et l'efficacité de la barrière tanycytaire chez des souris DIO, nous avons mis des souris sous régime riche en graisse pendant 9 à 11 semaines, puis étudié l'organisation de l'EM et l'accès des molécules périphériques au NA.

Après 9 semaines d'alimentation riche en graisse, les souris peuvent être divisées en deux groupes. **1-** 90 % des souris deviennent obèses et diabétiques : ce groupe sera appelé DIO-O. En revanche, **2-** 10 % des souris gardent un phénotype comparable à celui des souris contrôle : ce groupe sera appelé DIO-R. Les souris DIO-R sont plus grosses que les souris sous régime standard mais moins grosses que celles DIO-O. De plus, leur glycémie est comparable à celle des souris contrôle, et diminue lors du jeûne, tandis que les souris DIO-O restent hyperglycémiques (Figure 1).



Chez les souris DIO-O, l'organisation de l'EM/NA est fortement perturbée en condition nourrie. En effet, contrairement aux souris contrôle, les souris obèses possèdent de nombreux vaisseaux fenêtrés (Figure 2A). De plus, ces vaisseaux fenêtrés ne sont pas associés à la présence de JS organisées en nid d'abeille au niveau du mur ventriculaire (figure 2B, figure 3). Lors du jeûne, d'autres perturbations ont été observées : en effet, la plasticité de l'EM, reportée dans notre première étude, ne se produit plus (Figure 2, figure 3). Nous n'observons pas d'augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés, ni de réorganisation des protéines de JS au niveau de l'épendyme.

Chez les souris DIO-R, l'organisation de l'EM/NA est similaire à celle des souris contrôle en condition nourrie. De plus, les souris DIO-R ont la particularité de répondre au jeûne par un remodelage exacerbé de l'EM/NA. En effet, le nombre de vaisseaux fenêtrés lors du jeûne est plus haut chez les souris DIO-R comparé aux souris contrôle, et les JS forment des nids d'abeille extrêmement bien organisés (Figure 2 et 3).



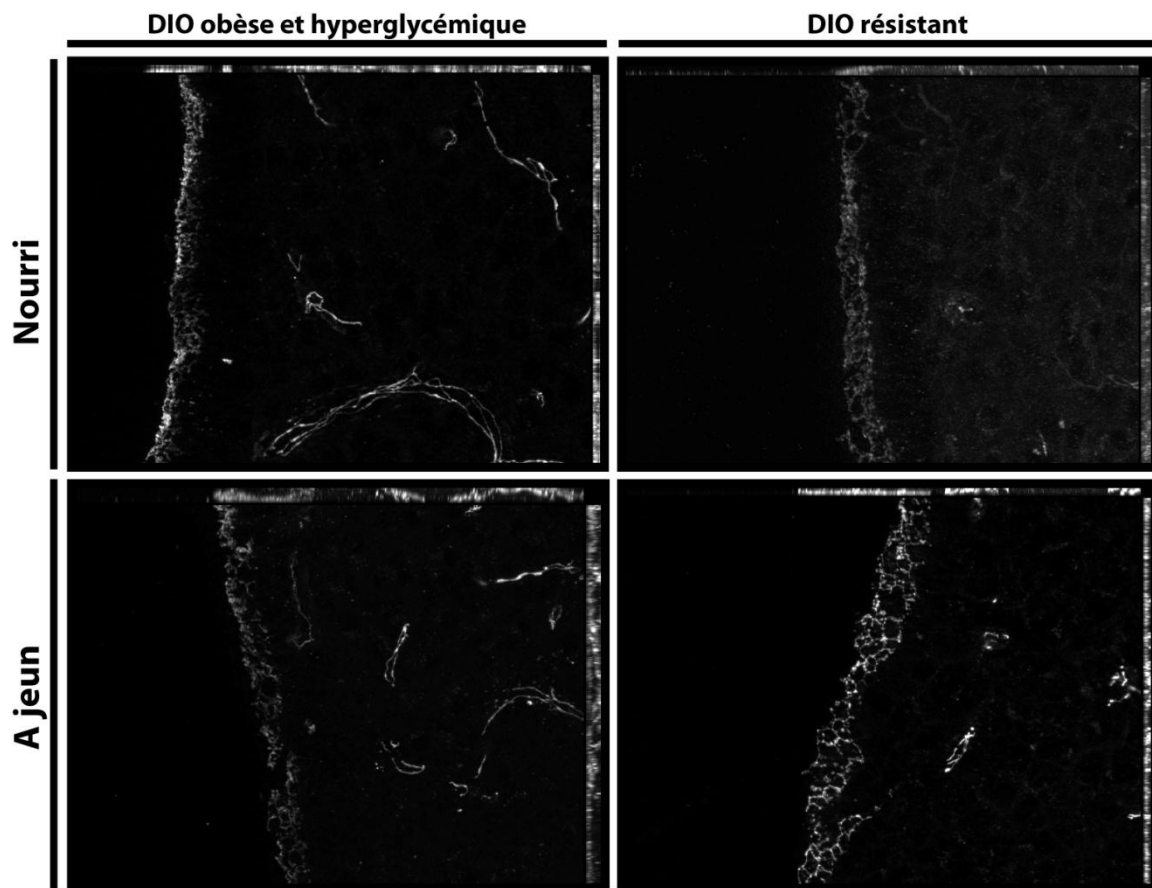


Figure 3: Photographies montrant l'organisation de la protéine de JS ZO-1 au niveau des tanocytes du noyau arqué chez des souris DIO-obèse et DIO-résistant.

Ainsi, les souris obèses et hyperglycémiques présentent des altérations de l'interface sang/cerveau au niveau de l'EM/NA. En effet, ces souris possèdent de nombreux vaisseaux fenêtrés sans présence de barrière tanocytaire au niveau de l'épendyme. Ce phénomène pourrait donc créer des problèmes d'homéostasie cérébrale et de fonctionnements neuronaux. L'augmentation du nombre de anses fenêtrées, et plus généralement de vaisseaux dans l'hypothalamus, pourrait être dû à l'hyperleptinémie, la leptine ayant des propriétés angiogéniques et perméabilisantes, ou à l'hyperglycémie chronique, celle-ci engendrant une augmentation de la synthèse de VEGF. Toutes ces hypothèses restent cependant à être vérifiées.

De plus, les souris rendues obèses n'ont plus de plasticité de l'EM/NA lors du jeûne. L'absence de plasticité de l'EM/NA pourrait être due au fait que la diminution des signaux périphériques indiquant le jeûne (comme la leptine, l'insuline ou la glycémie) ne se produit pas chez ces souris. Cette hypothèse a déjà été proposée dans une étude de Becksei *et coll.* où les auteurs avaient suggéré que les hauts niveaux de glucose seraient responsables de l'absence de réponse au jeûne chez ces souris (2009). Notre première étude ayant montré que la chute de la glycémie est un phénomène important dans la mise en place de la plasticité de l'EM, cette hypothèse est en accord avec nos résultats et sera donc étudiée dans la suite de ce projet.

L'hypothalamus et le tronc cérébral jouent un rôle crucial dans le contrôle de la prise alimentaire. Alors que le tronc cérébral la contrôle via la réception d'informations portées par des signaux métaboliques circulants ou d'informations nerveuses apportées par les afférences vagales issues des différents organes périphériques, l'hypothalamus reçoit de la périphérie uniquement des informations circulantes portées par les hormones et les nutriments. L'accès de ces signaux métaboliques vers les noyaux hypothalamiques via les interfaces sang/cerveau est donc une étape clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Parmi les noyaux hypothalamiques, l'accès vers le NA est particulièrement important : en effet, ce noyau est capable d'intégrer les informations de nombreux signaux métaboliques périphériques pour ensuite les relayer vers les autres noyaux hypothalamiques régulant la prise alimentaire. Le NA possède pour cela une position avantageuse : il se situe à côté du 3^{ème} ventricule et de l'EM, et peut donc recevoir des informations à la fois du LCR et de la circulation sanguine. L'interface sang/cerveau est donc plus complexe dans cette région cérébrale et différents composants sont à prendre en compte pour comprendre comment les échanges sang/cerveau y sont régulés. Tout d'abord, deux types de vaisseaux y sont retrouvés : des vaisseaux fenêtrés dans l'EM facilitant les échanges sang/cerveau et les vaisseaux de la BHE dans le NA les restreignant. De plus, l'épendyme, formé dans cette région par les tancytes, participerait également à la régulation des échanges sang/cerveau étant donné qu'il est le siège de la « barrière tancytaire ». En effet, les tancytes de l'EM contactent via leur prolongement les vaisseaux fenêtrés et expriment des protéines de JS organisées en ceinture continue autour de leur pôle apical : cela restreint la diffusion de molécules périphériques au parenchyme de l'EM et permet au reste du cerveau, et notamment le NA, de rester dans la zone protégée par la BHE (Mullier et al., 2010). Cependant, nos études ont montré que, lors d'un jeûne de 24h, les caractéristiques de l'EM, c'est-à-dire la présence de vaisseaux fenêtrés associés à des tancytes portant des propriétés de barrière, s'étendent au NA. En résulte alors une plus grande zone de diffusion des molécules périphériques permettant ainsi aux signaux métaboliques d'accéder aux neurones du NA.

1. Extension des caractéristiques structurales de l'éminence médiane au noyau arqué

1.1 Plasticité vasculaire : l'augmentation de la perméabilité vasculaire

Lors de la mise à jeun, une plasticité vasculaire se met en place. Elle est matérialisée par une augmentation du nombre de vaisseaux exprimant le marqueur de fenestrations MECA-32 au niveau de l'EM et du NA. Cette plasticité vasculaire est le premier phénomène plastique induit par le jeûne : en effet, lors de l'étude cinétique de la mise en place de la plasticité de l'EM/NA, elle est observée dès 12h de jeûne tandis que les JS ne sont pas encore réorganisées.

Ce court laps de temps nécessaire à la mise en place de la plasticité vasculaire suggère qu'elle est due à l'apparition de fenestrations sur des vaisseaux préexistants, plutôt qu'à l'angiogenèse, 12 heures étant trop court pour induire ce type de phénomène. En effet, lors de notre étude, nous avons observé que l'expression génique et protéique de MECA-32 augmentent dans l'EM et le NA lors du jeûne, tandis que Ki67, un marqueur de prolifération, ne varie pas (données personnelles).

a) Des vaisseaux fenêtrés dans le noyau arqué

La présence de vaisseaux fenêtrés dans le NA a déjà été décrite dans la littérature (Ciofi, 2011b). Nous avons également observé des vaisseaux fenêtrés dans le NA chez les souris nourries et montré dans nos études supplémentaires que leur nombre peut varier d'un modèle à un autre. Cependant, ce nombre augmente fortement lors du jeûne quelque soit le modèle étudié, amplifiant ainsi la voie d'accès rapide des molécules périphériques vers les neurones du NA. Cette augmentation de la perméabilité vasculaire suggère donc une transformation de vaisseaux porteurs des propriétés de la BHE en vaisseaux fenêtrés. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que la vasculature du NA est très particulière. En effet, la vascularisation de l'EM et celle du NA sont étroitement liées : une grande partie des vaisseaux du NA ventromédian viennent des vaisseaux de l'EM (Ambach et al., 1976). Ainsi, un vaisseau venant de l'EM et entrant dans le NA peut être fenêtré au niveau de l'EM et posséder des propriétés de barrière, matérialisées par la présence de JS, au niveau du NA (Figure 11). De plus, une étude de Norsted *et coll.* (2008) mentionne que les vaisseaux du NA ventromédian ne possèdent pas de BHE comparable à celle du reste de l'hypothalamus. En effet, les auteurs ont relevé l'absence d'immunomarquage pour l'antigène des barrières endothéliales EBA, un marqueur de la BHE (Norsted et al., 2008).

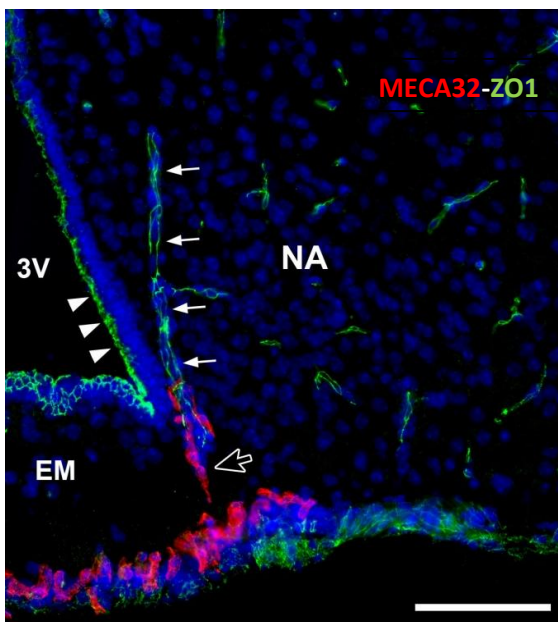


Figure 11 : Photographie montrant un vaisseau qui s'étend de l'éminence médiane (EM) vers le noyau arqué (NA). Dans l'EM, le vaisseau possède un phénotype dit «fenêtré» (rouge, flèche vide) tandis que dans le noyau arqué, il possède un phénotype dit «de barrière» (flèches). A ce niveau, la barrière sang/cerveau étant portée par les vaisseaux de la BHE, les tanocytes adjacents ne présentent pas de propriétés de barrière (marquage diffus des protéines JS, vert, têtes de flèche). EM, éminence médiane ; NA, noyau arqué ; 3V, 3^{ème} ventricule.

Ainsi, ces résultats suggèrent que les vaisseaux de l'EM et du NA ventromédian posséderaient des propriétés structurales et fonctionnelles similaires, mais que le microenvironnement des vaisseaux du NA ventromédian déterminerait s'ils possèdent des JS ou des fenestrations. Ces vaisseaux étant entourés par les tanocytes, ces derniers pourraient être le déterminant du phénotype vasculaire dans cette région cérébrale.

b) Les tanocytes à l'origine de la modulation de la perméabilité vasculaire

L'hypothèse d'une régulation de la perméabilité des vaisseaux du NA (et ainsi de l'accès des hormones et métabolites périphériques vers ce noyau hypothalamique) par les tanocytes a déjà été suggérée par Lechan *et coll.* (2004). Dans notre étude, nous avons montré que la plasticité vasculaire de l'EM/NA est due à une augmentation de l'expression du VEGF-A dans les tanocytes induite par l'hypoglycémie. Plusieurs études ont en effet montré que les tanocytes de l'EM étaient sensibles au glucose (Dale, 2011, Orellana *et al.*, 2012) ou au 2-DG (Dale, 2011, Gotoh *et al.*, 2008), un analogue du glucose non métabolisable. Dans notre étude, le 2-DG induit également une augmentation de l'expression du VEGF-A dans l'hypothalamus ventromédial *in vivo*, ou dans des explants d'EM/NA *in situ*, et engendre une plasticité structurale dans cette région cérébrale. Cependant, les tanocytes ne sont peut-être pas les premiers détecteurs de l'hypoglycémie : en effet, de nombreux neurones glucosensibles sont présents dans le NA et pourraient détecter la baisse du glucose. En parallèle, l'EM contient également de nombreux astrocytes, qui sont connus comme étant des cellules sensibles au glucose (Guillod-Maximin *et al.*, 2004; Marty *et al.*, 2005). Ces cellules pourraient également détecter l'hypoglycémie puis relayer l'information aux tanocytes via des signaux chimiques.

L'augmentation de l'expression du VEGF lors d'hypoglycémie, observée dans notre étude, a déjà été reportée dans la littérature. En effet, il existe une corrélation inverse entre la glycémie et les niveaux de VEGF sanguin chez l'homme (Dantz *et al.*, 2002; Merl *et al.*, 2005). Plusieurs publications ont décrit plus en détail ce phénomène : il serait dû à la stabilisation de l'ARN messager du VEGF (Stein *et al.*, 1995) et l'augmentation de sa transcription (Akiri *et al.*, 1998; Satake *et al.*, 1998). Les signalisations cellulaires impliquées dans ce processus sont l'augmentation du calcium intracellulaire, l'activation de la PKC (Park 2001), de c-jun et de junB (Textor *et al.*, 2006). L'origine de ce phénomène n'est cependant pas exactement connue : la déplétion en ATP cellulaire (Satake *et al.*, 1998) pourrait en être la cause. L'augmentation de la transcription du VEGF lors de l'hypoglycémie se réaliserait via le facteur de transcription HIF-1 : en effet, HIF-1 augmente lors de l'hypoxie et de l'hypoglycémie et induit l'expression de VEGF (Carmeliet *et al.*, 1998). Dans notre étude, nous avons également observé une augmentation d'HIF-1 α dans les tanocytes lors du jeûne, suggérant son implication dans l'augmentation de

l'expression du VEGF. De plus, une autre étude a prouvé l'importance de HIF-1 α dans les neurones à POMC en réponse au jeûne (Zhang et al., 2011), suggérant que ce facteur de transcription jouerait un rôle dans le contrôle de la prise alimentaire.

Outre l'hypoglycémie, nous avons également observé une variation des niveaux d'autres signaux métaboliques lors du jeûne. Ces variations pourraient également participer à la réorganisation vasculaire de l'EM/NA observée suite au jeûne de 24h. En effet, certaines hormones sont connues pour modifier la perméabilité vasculaire. Par exemple, la ghréline qui augmente durant le jeûne possède également des propriétés angiogéniques via la signalisation MAPK/ERK2 (Li et al., 2007). Une action hormonale sur les tanocytes n'est pas à exclure non plus étant donné qu'ils expriment des récepteurs aux hormones métaboliques comme celui de la ghréline et de la leptine (données issues du laboratoire) : cette détection pourrait ainsi induire une sécrétion locale de VEGF. Finalement, nous avons également observé une augmentation d'autres facteurs de croissance au niveau de l'hypothalamus médiobasal lors du jeûne : ces facteurs pourraient également participer à la réorganisation vasculaire de l'EM. Par exemple, le BDNF augmente dans notre étude. Ce facteur de croissance, exprimé par les astrocytes de l'EM, augmente également en condition de stress (Givalois et al., 2004) et est connu pour induire une plasticité vasculaire au niveau cérébral (Mattson and Wan, 2005). Cependant, chez les souris injectées au 2-DG, seul le VEGF augmente montrant le rôle clé de ce facteur dans la plasticité vasculaire induite par la glucopénie.

1.2 Plasticité des jonctions serrées : renforcement de la barrière tanocytaire

a) La claudine 1 : protéine clé dans la formation de jonctions serrées efficaces ?

La «barrière tanocytaire» est initialement retrouvée au niveau du plancher du 3^{ème} ventricule sur les tanocytes de l'EM contactant les vaisseaux fenêtrés. Elle est formée par des complexes de JS organisés sous forme de nid d'abeille (Mullier et al., 2010; Petrov et al., 1994). Sous cette configuration, les complexes de JS encerclent totalement la cellule et bloquent complètement la voie paracellulaire. En effet, l'injection de bleu Evans (Mullier et al., 2010) ou de peroxydase (Brightman et al., 1975) en iv ou icv montre l'étanchéité du mur épendymal. La composition en protéines de JS est aussi particulière. De manière similaire à la BHE, l'occludine, ZO1 et la claudine 5 y sont retrouvées. De plus, la barrière tanocytaire a la particularité de posséder la claudine 1 : cette claudine, qui permet de créer des JS très étanches (Furuse et al., 1998b), est également retrouvée au niveau des cellules épithéliales des PC, cellules étant elles aussi adjacentes à des vaisseaux fenêtrés. En revanche, les tanocytes du NA contactant des vaisseaux de la BHE ne forment pas de « barrière tanocytaire » : au contraire, leur

épendyme est perméable et permet la diffusion de traceurs injectés en icv jusque dans le parenchyme du NA (Mullier et al., 2010). Cette perméabilité a été mise en relation avec la désorganisation de leurs protéines de JS telles que l'occludine, ZO1 et la claudine 5, et l'absence de claudine 1. Cependant, la présence de protéines de JS au niveau des tanocytes du NA suggère qu'elles peuvent se réorganiser dans certaines conditions et ainsi rendre l'épendyme étanche à ce niveau.

Lors du jeûne, une réorganisation des protéines de JS a en effet été observée au niveau de l'épendyme de l'EM et du NA. Au niveau de l'EM, les nids d'abeille sont plus nombreux et plus petits, renforçant le barrage de la voie paracellulaire. Au niveau du NA, l'organisation des protéines de JS change totalement : les tanocytes acquièrent une organisation en nid d'abeille rendant l'épendyme étanche. Par ailleurs, cette réorganisation est associée à la présence de la claudine 1, initialement absente à ce niveau en condition nourrie. Cette augmentation d'expression de la claudine 1 est également associée à l'augmentation de l'expression de ZO1. Ces résultats montrent donc que la réorganisation des JS le long du ventricule est due à deux phénomènes : **1-** une redistribution de protéines déjà existantes et **2-** l'expression de nouvelles protéines. Ces résultats suggèrent également que la claudine 1 joue un rôle important dans la réorganisation des JS. En effet, elle est connue pour être capable à elle seule d'induire la formation de JS très étanches (Furuse et al., 1998b). De plus, l'expression de claudine 1 dans les cellules MDCK induit une augmentation de l'expression de ZO-1, comme observé dans notre étude, associée à un renforcement de l'étanchéité de la couche monocellulaire (Inai et al., 1999). Ainsi, l'augmentation d'expression de claudine 1 sur la paroi ventriculaire du NA lors du jeûne pourrait être à l'origine de la réorganisation des protéines de JS et de la formation d'une barrière étanche.

b) Mécanismes à l'origine de la réorganisation des protéines de jonctions serrées

Les mécanismes à l'origine de la réorganisation des protéines de JS au niveau du NA lors du jeûne n'ont pas été étudiés en détail dans nos travaux. Cependant, deux hypothèses peuvent l'expliquer : **1-** les signaux métaboliques, modulés par le jeûne, agiraient directement sur les tanocytes pour réorganiser les protéines de JS ou/et **2-** la plasticité vasculaire induirait la réorganisation des JS.

Notre première hypothèse se base sur l'idée que les variations des signaux métaboliques lors du jeûne pourraient être ressenties par les tanocytes. Nous avons montré précédemment que le glucose était à l'origine de la plasticité vasculaire. On peut alors supposer que cette même détection de l'hypoglycémie par les tanocytes pourrait induire la réorganisation des protéines de JS. Cependant, il ne faut pas exclure la possibilité que d'autres

facteurs puissent également participer à la réorganisation des protéines de JS. Par exemple, les corticostéroïdes, qui augmentent fortement lors du jeûne, joueraient également un rôle dans la formation et la maintenance de la barrière tanyctaire. En effet, nos injections d'inhibiteurs des corticostéroïdes entraînent une rupture de la barrière tanyctaire chez l'animal nourri ou à jeun. De plus, la barrière tanyctaire se renforce également en fin de journée chez la souris mâle adulte (correspondant à la fin de la phase de jeûne), lorsque les taux de corticostéroïdes sont les plus hauts. L'action des corticostéroïdes sur les complexes de JS a déjà été suggérée dans la littérature. En effet, Kim *et coll.* ont montré que les glucocorticoïdes, en l'occurrence le dexaméthasone, stabilise la BHE (Kim *et al.*, 2008). Cet effet serait lié à l'augmentation de l'expression génique et protéique de l'occludine par les cellules endothéliales (Förster *et al.*, 2005; Harke *et al.*, 2008). Ainsi, l'augmentation de l'expression génique de ZO1 et de la claudine 1 observée dans notre étude pourrait être due à l'augmentation du taux de glucocorticoïdes induite par le jeûne. L'implication d'autres facteurs, comme la ghréline dont des études ont montré sa capacité à renforcer la barrière intestinale (Bansal *et al.*, 2010) et la BHE (Lopez *et al.*, 2012), reste à être étudiée.

Notre deuxième hypothèse se base sur l'association entre la présence de vaisseaux fenêtrés dans le NA et une organisation des protéines de JS en nid d'abeille au niveau des tanyctes adjacents. En effet, les tanyctes contactant les vaisseaux fenêtrés de l'EM expriment la claudine 1 et possèdent des protéines de JS organisées en nid d'abeille. Lors du jeûne, la réorganisation des JS au niveau des tanyctes du NA est associée à la présence de nouveaux vaisseaux fenêtrés dans le NA. De plus, la plasticité vasculaire est la première à se mettre en place, dès 12h, tandis que celle des JS viendrait plus tard. Nous avons donc émis l'hypothèse que les tanyctes qui contactaient auparavant des vaisseaux de la BHE et possédaient une organisation diffuse des protéines de JS, contactent suite à la plasticité vasculaire des vaisseaux fenêtrés, expriment la claudine 1 et acquièrent une organisation en nid d'abeille de leurs protéines de JS. Ainsi, ces résultats renforcent l'association entre les vaisseaux fenêtrés, et les tanyctes exprimant la claudine 1 et des JS efficaces. Cette hypothèse d'une association JS tanyctaires/vaisseaux fenêtrés est renforcée par le fait qu'elle est observable dans toutes les conditions étudiées et en particulier dans celle où on induit une plasticité vasculaire grâce au VEGF. Dans la littérature, le VEGF est généralement décrit comme un facteur de perméabilité vasculaire induisant la rupture de JS via notamment la dégradation des protéines les constituant (Murakami *et al.*, 2009). Or dans notre étude, les JS tanyctaires se réorganisent en nid d'abeille au niveau du NA malgré l'injection de VEGF. Le maintien des complexes de JS tanyctaires et de la BHE dans notre étude peut s'expliquer par le fait que le VEGF est injecté de manière aigue : en effet *in vivo*, seule des injections chroniques induisent

une rupture des barrières sang/cerveau (Proescholdt et al., 1999). Cependant, aucune publication n'a jamais montré une amélioration de l'organisation des JS en vue de devenir plus efficaces, comme nous le voyons au niveau des tanocytes, grâce au VEGF. Cela laisse supposer l'intervention d'autres facteurs, peut-être d'origine vasculaire, afin de réorganiser la barrière tanocytaire. Le type de communication entre vaisseaux fenêtrés et tanocytes reste cependant à être déterminé, grâce notamment à des co-cultures de tanocytes et de cellules endothéliales fenêtrées. Au niveau de l'EM, les pieds tanocytaires et les vaisseaux fenêtrés n'étant pas en contact direct, mais séparés par l'espace de Virchow Robin, il est très probable qu'un facteur soluble soit impliqué dans cette communication tanocytes/vaisseaux fenêtrés. Le TGF β , impliqué dans la formation de la barrière sang/cerveau au niveau de la BHE (Tran et al., 1999) et des PC (Maharaj et al., 2008), et exprimé dans l'EM (Prevot et al., 2000), semblent alors être un bon candidat.

c) But de la réorganisation des protéines de jonctions serrées

La réorganisation des protéines de JS au niveau des tanocytes du NA juxtaposant des vaisseaux fenêtrés permettrait de maintenir l'homéostasie cérébrale. En effet, l'augmentation des vaisseaux fenêtrés dans le NA permet un meilleur accès des molécules sanguines vers le parenchyme cérébral. De ce fait, l'homéostasie cérébrale, qui était entretenue initialement par les vaisseaux de la BHE, pourrait être perturbée. Afin de protéger le LCR et le reste du cerveau de cette augmentation de perméabilité vasculaire, un report des propriétés de barrière se produit donc au niveau de l'épendyme : la barrière tanocytaire juxtapose désormais toute la zone contenant des vaisseaux fenêtrés, y compris le NA. Par conséquent, le NA acquiert les caractéristiques neuroanatomiques de l'EM, c'est-à-dire des JS tanocytaires associées à des vaisseaux fenêtrés, permettant ainsi la diffusion et le cloisonnement des molécules périphériques dans son parenchyme. La « fenêtrure sur le cerveau », localisée au niveau de l'EM en condition nourrie, s'ouvrirait alors uniquement vers le NA lors de déséquilibres énergétiques.

2. Impact de la plasticité de l'éminence médiane sur les échanges sang/cerveau

2.1 L'accès des molécules périphériques au noyau arqué

a) Un accès via les vaisseaux fenêtrés de l'EM et du NA

Depuis de nombreuses années, des traceurs sont utilisés afin d'étudier les propriétés de barrière des interfaces sang/cerveau. Ces traceurs sont généralement des molécules inertes, ne se fixant à aucun récepteur cellulaire, et permettant ainsi d'étudier la diffusion paracellulaire et les phénomènes de pinocytose. Le bleu Evans est un colorant couramment utilisé pour étudier les barrières au niveau du SNC. Ce colorant, d'un poids moléculaire de 1

kDa sous sa forme libre, se fixe aux molécules sanguines, telle l'albumine. Ce colorant ne passe pas la BHE, tandis qu'il diffuse dans le parenchyme de l'EM grâce aux vaisseaux fenêtrés (Mullier et al., 2010). Dans notre étude, en condition nourrie, peu de anes fenêtrées sont observées en dehors de la zone externe de l'EM : cela est associé à une diffusion du traceur uniquement dans le parenchyme de l'EM. Lors du jeûne, nous avons observé une augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés dans le NA associée à une augmentation de la diffusion du bleu Evans dans le parenchyme du NA. Nous pouvons alors émettre l'hypothèse que le bleu Evans serait amené directement dans le NA par les vaisseaux fenêtrés s'y trouvant désormais.

Certaines études stipulent que les molécules présentes dans le sang porte peuvent diffuser jusqu'au NA également en condition nourrie (Broadwell et al., 1983 ; Shaver et al., 1992), et cela notamment grâce à la présence de vaisseaux fenêtrés dans le NA (Ciofi et al., 2011). Ceci semble, à première vue, en désaccord avec nos données qui indiquent que le bleu ne diffuse dans le NA qu'en condition de jeûne. Cependant, nos résultats supplémentaires montrent que selon l'origine des souris, leur alimentation, ou le moment de la journée, le nombre de vaisseaux fenêtrés dans le NA est plus ou moins élevé en condition nourrie. Ces différences pourraient alors expliquer les différences de diffusion des traceurs vers le NA : une souris possédant plus de vaisseaux fenêtrés dans son NA aura une diffusion des molécules périphériques plus importante vers le NA. Cependant, bien que certaines souris nourries possèdent à la base une organisation de l'EM qui permet une diffusion des molécules dans le NA ventromédian, le nombre de vaisseaux fenêtrés augmentent dans le NA lors du jeûne quelque soit le modèle étudié, élargissant la zone de diffusion des molécules périphériques dans le NA (et donc le nombre de neurones en contact avec la périphérie).

b) Un accès modifié par le remodelage de la barrière tanycytaire

Afin de comprendre comment sont régulés les échanges sang/cerveau au niveau de l'EM/NA, il ne faut pas considérer uniquement les vaisseaux fenêtrés. En effet, la barrière tanycytaire joue également un rôle important et sa réorganisation lors du jeûne pourrait modifier l'accès des molécules périphériques vers le NA. Le bleu Evans injecté dans le sang diffuse dans le parenchyme de l'EM grâce à la présence de vaisseaux fenêtrés. Cependant, ce bleu reste cloîtré dans l'EM et ne diffuse pas dans le NA (Mullier et al., 2010). Cela a été confirmé dans d'autres études (Brightman et al., 1975), ainsi que dans les nôtres chez les animaux nourris. Dans la littérature, plusieurs auteurs émettent l'hypothèse que l'arrêt de la diffusion des traceurs à l'entrée du NA serait dû à l'existence d'une barrière portée par les prolongements des tanocytes $\beta 1$ (Krisch and Leonhardt, 1978; Rodríguez et al., 2005).

Cependant, dans notre étude, le bleu diffuse jusqu'au NA en condition de jeûne. Une première hypothèse serait alors que cette **barrière physique** entre l'EM et le NA s'ouvrirait lors du jeûne. Cependant, étant donné que ce type de barrière n'a jamais été observé en immunohistochimie (Mullier et al., 2010; Petrov et al., 1994), d'autres hypothèses sont envisageables. Une autre hypothèse serait l'existence d'une **barrière dite « mécanique »** entre l'EM et le NA qui bloquerait la diffusion des traceurs. Cette barrière mécanique se fonderait sur l'existence de flux différentiels entre le NA et l'EM. En effet, le liquide interstitiel circulerait dans le parenchyme cérébral, sous l'induction du flux du LCR ou des flux sanguins ; mais cette circulation se ferait dans des directions différentes selon qu'on se trouve dans le NA ou dans l'EM, empêchant ainsi tout phénomène de diffusion entre les deux structures. Ces flux seraient régulés en partie par les complexes de JS bordant le ventricule. En effet, nous avons remarqué au cours de nos études que la diffusion du BE s'arrête net à partir du moment où le mur ventriculaire présente des JS non organisées. De la même manière, lors du jeûne, l'organisation en nid d'abeille des JS retrouvée plus haut sur le mur ventriculaire permet une diffusion plus en profondeur du BE : cependant, celle-ci s'arrête à nouveau net à partir du moment où les JS ont une organisation diffuse (Article 1, Figure 3A). Ainsi, lors du remodelage de la barrière tancytaire induite par le jeûne, les flux différentiels EM/NA pourraient être modifiés laissant le colorant diffuser de l'EM jusqu'au NA.

De plus, le remodelage des JS au niveau des tancytes du NA modifie également les échanges LCR/NA. Initialement, en condition nourrie, les molécules présentes dans le LCR diffusent dans le parenchyme cérébral en traversant l'épendyme (Brightman et al., 1975, Gherzi-Egea et al., 1996). Au niveau du NA, un accès favorisé existerait (Mullier et al., 2010). En effet, l'absence de JS et de cils sur les tancytes du NA, créant ainsi un microenvironnement où le flux du LCR est ralenti, favoriserait la diffusion des molécules du LCR vers le NA : cela rendrait la composition du liquide interstitiel du NA proche de celle du LCR. Cependant, lors du jeûne, la barrière tancytaire se réorganise le long du ventricule bordant le NA : les JS acquièrent une organisation en nid d'abeille comparable à celle de l'EM ce qui induirait une étanchéité de l'épendyme. Les molécules présentes dans le LCR ne pourraient alors plus accéder par voie paracellulaire au NA.

Ainsi, en tenant compte à la fois l'amélioration des échanges EM/NA et une diminution des échanges LCR/NA, nous pouvons émettre l'hypothèse que, lors du jeûne, le liquide interstitiel du NA aurait une composition comparable à celle du sang plutôt qu'à celle du LCR. Ce phénomène permettrait alors au NA d'être totalement à l'écoute de ce qui se déroule en périphérie afin de réguler au mieux l'homéostasie énergétique (Figure 12).

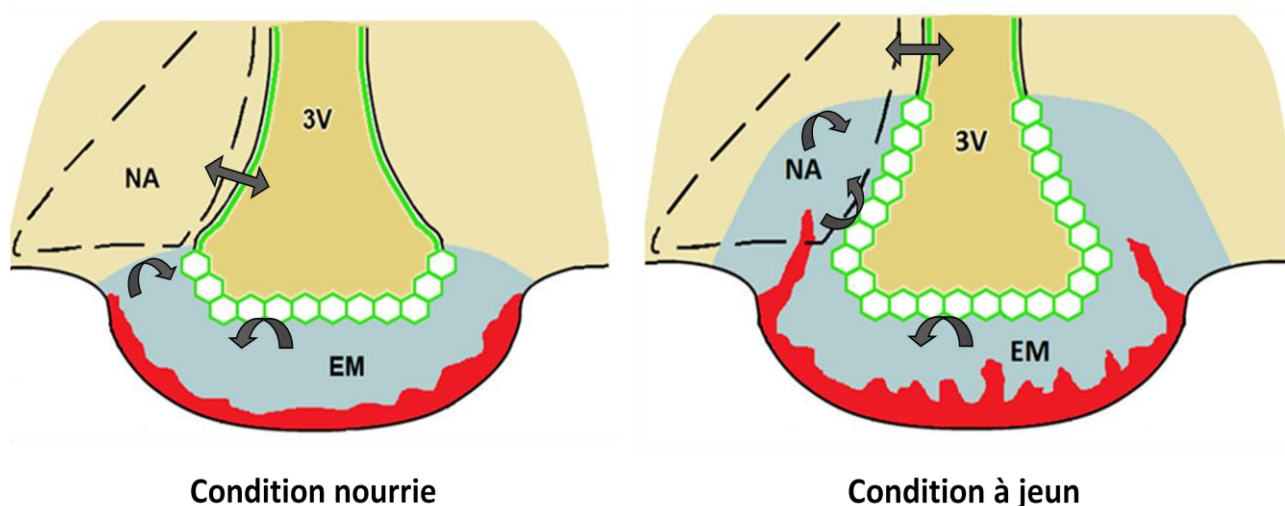


Figure 12 : Schéma résumant les différents accès hypothétiques des molécules périphériques vers le noyau arqué en condition nourrie et à jeun. En condition nourrie, le bleu Evans (bleu) injecté dans le sang peut pénétrer dans le parenchyme de l'éminence médiane (EM) grâce à la présence de vaisseaux fenêtrés (rouge). Cependant, le bleu est bloqué au niveau de la barrière tancytaire, le long de l'épendyme (nid d'abeille, vert), et au niveau de l'angle EM/noyau arqué (NA) par un mécanisme non déterminé à ce jour. Dans le parenchyme du NA, le bleu n'entre pas via les capillaires cérébraux, siège de la barrière hémato-encéphalique. Au niveau de l'épendyme bordant le NA, la diffusion paracellulaire est autorisée en raison de l'absence de propriétés de barrière : par conséquent, la composition du liquide interstitiel du NA serait plus ou moins comparable à celle du liquide céphalorachidien (beige). En condition à jeun, la réorganisation structurale de la région permet une diffusion plus importante du bleu vers le NA. De plus, la «fermeture» de la voie paracellulaire au niveau de l'épendyme du NA permet au bleu de rester dans le parenchyme cérébral et empêche les composants du liquide céphalorachidien d'atteindre le NA. De ce fait, le NA peut être totalement à l'écoute de ce qui se passe en périphérie. EM, éminence médiane ; NA, noyau arqué ; 3V, 3^{ème} ventricule.

c) L'accès des signaux métaboliques au noyau arqué

Suite à l'étude de diffusion dans le parenchyme cérébral de molécules inertes, nous nous sommes intéressés à l'accès de molécules bioactives aux neurones du NA. De nombreuses études suggèrent que les signaux régulant la prise alimentaire accèdent au NA via les vaisseaux fenêtrés de l'EM. Dans notre condition nourrie, les molécules périphériques restent cloîtrées dans le parenchyme de l'EM et n'atteignent pas les neurones du NA. Cependant, étant donné la proximité de l'EM, on ne peut pas exclure la possibilité que certains neurones du NA soient capables de détecter les substances périphériques présentes dans cet OCV. En effet, suite à l'injection de ghréline (ou de leptine) chez des animaux nourris, nous avons observé une fixation (ou une action) de ces hormones sur des neurones du NA. Des éléments neuronaux présents dans le parenchyme de l'EM pourraient expliquer ce phénomène. En effet, des corps neuronaux, notamment ceux à NPY, sont présents dans la zone subépendymaire de l'EM et donc en contact direct avec la périphérie. De même, des prolongements dendritiques sont présents dans l'EM : les neurones pourraient alors détecter

les changements hormonaux périphériques tout en restant dans une zone protégée par la BHE. Ainsi, Faouzi *et coll.* (2007) ont observé des projections de neurones exprimant le récepteur à la leptine au niveau de la zone externe de l'EM. De la même manière, Van Houten M *et coll.* (1980) ont observé des projections exprimant le récepteur à l'insuline au niveau de l'EM. Enfin, les neurones hypophysiotropes du NA projettent leur axone en contact des vaisseaux fenêtrés et pourraient alors capter les signaux périphérique par ce dernier, bien que ce concept n'est jamais été démontré.

Cependant, bien que certains neurones du NA auraient accès à l'information périphérique à tout moment, le remodelage structural de l'EM/NA induit par le jeûne permettrait à un plus grand nombre de neurones d'avoir accès aux informations périphériques, afin d'optimiser la régulation de la prise alimentaire. En effet, nous avons tout d'abord observé une augmentation de la concentration en **glucose** au niveau du NA lors du jeûne, suggérant que ce nutriment diffuse plus facilement vers le NA grâce à la plasticité de l'EM/NA. Cependant, on ne peut pas exclure d'autres hypothèses, notamment l'utilisation de transporteurs au glucose. En effet, GLUT1 augmente lors du jeûne dans l'hypothalamus médiobasal et dans les tanocytes. Cette augmentation pourrait être liée à l'augmentation du VEGF : en effet, le VEGF augmente la synthèse de GLUT-1 (Yeh et al., 2008), sa translocation à la membrane plasmique (Sone et al., 2000) et par conséquent le transport du glucose (Pekala et al., 1990) au niveau central afin d'assurer le fonctionnement neuronal (Dantz et al., 2002). De plus, nous avons également observé un plus grand nombre de neurones fixant la **ghréline** fluorescente. Cela peut s'expliquer par deux phénomènes : **1-** l'augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés lors du jeûne et donc de l'accès de la ghréline vers les neurones du NA (en accord avec notre hypothèse) ; mais également par **2-** l'augmentation du nombre de récepteurs à la ghréline dans le NA lors du jeûne (Kim et al., 2003). Nos résultats confortent cependant la première hypothèse. En effet, les neurones du NA fixant la ghréline fluorescente sont préférentiellement localisés à proximité de vaisseaux fenêtrés comparés aux vaisseaux de la BHE. Par ailleurs, nous avons aussi étudié l'accès de la **leptine** vers le NA par l'étude de l'activation pSTAT3 dans les neurones du NA : lors d'une plasticité de l'EM induite par le jeûne, l'activation pSTAT3 suite à une injection de leptine est plus importante qu'en condition nourrie. Cette augmentation est principalement localisée dans la zone ventromédiale du NA, région où les vaisseaux fenêtrés ont été observés. De plus, des souris injectées avec du VEGF, possédant donc une plasticité de l'EM/NA et le même taux de leptine qu'une souris nourrie, présentent également une activation pSTAT3 plus importante que des souris nourries. Ces résultats suggèrent donc fortement que la plasticité de l'EM permet un meilleur accès des hormones périphériques aux neurones du NA. Cependant, l'augmentation de l'accès de la

leptine vers le NA semble en contradiction avec la condition de jeûne. Pourquoi rendre le NA plus sensible à la leptine, une hormone anorexigène, alors que le jeûne doit stimuler la prise alimentaire ? Pour comprendre cela, il faut considérer les concentrations de chaque hormone et chaque nutriment lors du jeûne. En effet, la ghréline augmente tandis que la leptine diminue. D'ailleurs, après l'injection du véhicule de la leptine chez la souris à jeun, pSTAT3 est très faiblement activé montrant que la leptine endogène, dont les niveaux sont très bas, ne peut pas activer le NA. Au contraire, la ghréline étant majoritaire, son action sur le NA sera donc beaucoup plus importante. Nos études montrent cependant que la plasticité de l'EM/NA permet un meilleur accès à la fois de la ghréline exogène, de leptine exogène, du glucose et de traceurs inertes. Cela suggère que ce meilleur accès vers le NA n'est pas spécifique d'une hormone ou d'un nutriment, et n'impliquerait donc pas de récepteurs ou de transporteurs : il serait simplement dû à une meilleure diffusion des molécules périphériques vers le NA. Ainsi, la plasticité de l'EM/NA permettrait de sortir le NA de la zone protégée par la BHE afin que celui-ci puisse prendre en compte toutes les informations venant de la périphérie, et induire une régulation adaptée de la prise alimentaire.

Cependant, toutes les molécules ne peuvent pas traverser l'endothélium fenêtré. En effet, une collaboration avec l'équipe de Patrice Mollard a permis de déterminer la capacité de diffusion des molécules périphériques en fonction de leur masse moléculaire. Ainsi, les molécules possédant un poids moléculaire entre 0 et 20 kDa traversent les fenestrations aisément, les molécules possédant un poids moléculaire entre 20 et 70 kDa peuvent les traverser mais avec un débit de passage fortement diminué ; tandis que les molécules possédant un poids moléculaire supérieur à 70 kDa ne peuvent pas les franchir. Les hormones et les nutriments décrits dans le chapitre 1, possédant un poids moléculaire inférieur à 20kDa (Tableau 1), peuvent donc tous franchir les fenestrations de l'endothélium de l'EM pour se retrouver dans l'espace de Virchow-Robin. En revanche, qu'en est-il de leur diffusion dans le parenchyme cérébral ? En effet, plus une molécule est grosse moins elle peut diffuser dans les tissus. La diffusion du bleu Evans dans le parenchyme cérébral correspond en fait à la diffusion de la forme libre d'1 kDa et non pas à sa forme complexée à l'albumine. Ainsi, les molécules de petit poids moléculaire comme le glucose pourraient diffuser facilement dans le parenchyme cérébral. En revanche, l'albumine FITC injectée en iv ne diffuse pas dans le parenchyme de l'EM (données personnelles), tandis que techniquement, ayant un poids moléculaire de 60 kDa, elle serait capable de traverser les fenestrations. Une hypothèse serait qu'elle reste cloisonnée au niveau de l'espace périvasculaire et ne diffuserait pas dans le parenchyme cérébral. Dans ce cas, les neurones du NA localisés au contact des vaisseaux fenêtrés pourraient capter les signaux périphériques les plus lourds.

2.2. Impact sur la prise alimentaire

La réponse physiologique au jeûne s'exprime par une hyperphagie lors de la réalimentation. Celle-ci est observée dans les 30 premières minutes de réalimentation dans notre étude. Afin de comprendre l'implication de la plasticité de l'EM/NA sur ce phénomène, nous avons bloqué cette plasticité et analysé le comportement alimentaire des souris lors de la réalimentation : l'inhibition de la plasticité de l'EM/NA induit l'inhibition du pic hyperphagique. A l'inverse, si une plasticité de l'EM/NA est induite par une injection de VEGF, une augmentation de la prise alimentaire est observée en phase nocturne, suggérant un meilleur accès des signaux orexigènes circulant durant cette phase vers les neurones du NA. Ces résultats suggèrent que l'accès amélioré des hormones et des nutriments vers le NA lors du jeûne entre en ligne de compte dans la régulation de la prise alimentaire.

Cette plasticité ayant pour origine l'hypoglycémie engendrée par le jeûne, nos résultats apportent un nouveau concept dans la théorie glucostatique (Mayer 1953). En effet, celle-ci stipule que les glucides jouent un rôle primordial dans la régulation de la prise alimentaire. Initialement, cette théorie fait référence à la fonction des neurones sensibles au glucose : ces derniers sont capables de détecter des baisses en glucose pour induire un comportement alimentaire. Ici, nous avons prouvé que les baisses de glucose pouvaient également être ressenties par les tanocytes (ou des cellules associées aux tanocytes) pour modifier l'organisation structurale de l'interface sang/cerveau. Le glucose gère alors, via l'ouverture et la fermeture de la « fenêtre sur le cerveau » au niveau de l'hypothalamus médiobasal, l'entrée des signaux périphériques dans le NA et ainsi la régulation de la prise alimentaire. Notre étude apporte donc une nouvelle preuve de la haute plasticité de l'EM, ayant pour but de réguler une fonction physiologique majeure de l'organisme, la prise alimentaire. L'EM étant également impliquée dans de nombreuses autres fonctions, on peut aussi imaginer que des mécanismes similaires pourraient s'y produire afin de les réguler.

2.3 Autres conséquences de la plasticité de l'EM/NA sur des échanges sang/cerveau

a) Augmentation de la neurosécrétion dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire ?

Outre l'accès du sang vers le cerveau, il ne faut pas oublier que l'éminence médiane est un organe sécréteur dont le but est de délivrer des neurohormones dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. Dans ce cadre, l'augmentation du nombre de vaisseaux fenêtrés pourrait également permettre un meilleur relargage de ces neurohormones, telles que la corticolibérine, afin de permettre une meilleure réponse au jeûne.

b) Augmentation du transport transcellulaire tanycytaire ?

La présence de JS au niveau du pôle apical des tanycytes permet également la mise en place d'une polarité cellulaire. Les protéines cellulaires se disposent alors de manière différentielle au pôle apical ou basolatéral de la cellule permettant notamment la mise en place de transports transcellulaires uni- ou bidirectionnels. De nombreuses études ont montré que les tanycytes possédaient les composants nécessaires à ce type de transport (Peruzzo et al., 2004) et que de nombreuses molécules peuvent être internalisées par les tanycytes (Nakai, 1971 ; Fernandez-Galaz et al., 1996). Au laboratoire, une étude a notamment montré que les tanycytes étaient capables d'internaliser et transporter la leptine (Balland et al., soumis dans Cell Metabolism). Ce transport tanycytaire permettrait d'amener, de manière régulée, les molécules périphériques captées dans l'EM vers le LCR : elles diffuseraient ensuite dans l'ensemble du cerveau.

Lors du jeûne, la réorganisation des protéines de JS en nid d'abeille au niveau de l'épendyme augmente donc le nombre de tanycytes polarisés et théoriquement capables de réaliser du transport transcellulaire spécifique. Ainsi, bien que la plasticité de l'EM permette un meilleur accès direct vers le NA, le transport tanycytaire pourrait également être amélioré afin d'augmenter l'accès des molécules périphériques vers le LCR et donc, par conséquence, vers l'ensemble du cerveau. Cette hypothèse reste cependant à être vérifiée.

3. Problème d'accès des signaux métaboliques vers le noyau arqué chez les souris obèses

3.1 Les hormonorésistances

Lors d'obésité ou de diabète, l'organisme n'arrive plus à réguler son poids et sa glycémie malgré la présence de signaux métaboliques périphériques censés rétablir l'homéostasie. Ainsi, une personne obèse et diabétique possède de hauts taux de leptine et d'insuline sans pouvoir pour autant rétablir sa balance énergétique. Cette incapacité de l'organisme à répondre aux signaux physiologiques est décrite sous le terme d'«homonorésistance». Ces résistances s'expriment à la fois au niveau périphérique et central. Au niveau central, ces résistances sont matérialisées par l'incapacité des signaux périphériques à induire une réponse sur les neurones des noyaux hypothalamiques. Deux mécanismes ont été identifiés comme étant responsables de ces résistances : **1-** une altération du transport de molécules périphériques vers le SCN notamment vers l'hypothalamus (Van Heek et al., 1996) ou **2-** une altération de la signalisation intracellulaire associée aux récepteurs des signaux périphériques (El-Haschimi et al., 2000). Ces altérations auraient cependant une cinétique différente selon la progression de l'obésité (Lin et al., 2000b). En effet, chez un modèle murin d'alimentation induisant une obésité, 8 semaines de régime riche en graisse

abolit la sensibilité à la leptine injectée en périphérie mais maintient celle à la leptine injectée au niveau central ; tandis que 19 semaines de régime riche en graisse abolit toute sensibilité à la leptine qu'elle soit injectée en ip ou en icv. Ces résultats suggèrent que l'altération du transport à la leptine serait la première altération à apparaître tandis que la résistance liée aux problèmes des voies de signalisation apparaîtrait plus tard. La résistance à la leptine se développe initialement au niveau du NA puis plus tardivement dans les autres noyaux hypothalamiques (Münzberg et al., 2004), suggérant en premier lieu un problème d'accès de la leptine vers ce noyau. De plus, Briggs *et coll.* ont montré que le phénomène de résistance hormonale au niveau du NA chez les souris rendues obèses par l'alimentation était aussi valable pour la ghréline. Ces résultats suggèrent alors un problème généralisé d'accès des signaux métaboliques au NA, ne faisant peut-être pas intervenir les transports spécifiques à chaque hormone. Notre modèle d'accès des molécules périphériques par simple diffusion via l'EM entre dans ce cadre et une dérégulation de ce système pourrait alors expliquer les problèmes d'hormonorésistance observés chez les souris obèses.

3.2 Organisation structurale perturbée au niveau de l'EM/NA

Nos résultats supplémentaires ont montré que l'organisation de l'EM est perturbée en condition nourrie chez des souris rendues obèses et diabétiques par une alimentation riche en graisse. En effet, les souris obèses possèdent de nombreux vaisseaux fenêtrés. Une augmentation du nombre de vaisseaux est également observée dans le reste de l'hypothalamus. Ce phénomène pourrait être dû à l'augmentation des taux de leptine étant donné que cette hormone possède des propriétés angiogéniques (Anagnostoulis et al., 2008 ; Cao et al., 2001), ou encore à l'augmentation des taux VEGF associée au diabète (Sone et al., 2000, Prakash et al., 2012). Concernant l'organisation des protéines de JS au niveau des tanyctes, bien que les animaux obèses possèdent plus de vaisseaux fenêtrés au niveau de l'EM, ces derniers ne sont plus associés à une organisation des protéines de JS en nid d'abeille. De plus, la plasticité de l'EM induite par le jeûne ne se produisait plus chez ces souris obèses. Cette dissociation vaisseaux fenêtrés/barrière tanyctaire et l'absence de plasticité de l'EM/NA lors du jeûne pourraient alors modifier la diffusion des molécules périphériques vers le NA et peut-être expliquer les problèmes d'accès des hormones périphériques vers le SNC.

Parmi les souris sous alimentation riche en graisse, environ 10 % des souris ne développent pas d'obésité et de diabète : ces souris sont dites résistantes au régime gras (DIO-R). Elles sont moins grosses que des souris sous régime riche en graisse, et possèdent une glycémie comparable à celle des souris contrôles. Ces souris DIO-R ont la particularité de conserver la capacité à répondre au jeûne par un remodelage exacerbé de l'EM. En condition

nourrie, l'EM possède une organisation similaire aux souris contrôles ; tandis qu'à jeun, le nombre de vaisseaux fenêtrés augmente très fortement et les JS des tanocytes du NA forment des nids d'abeille extrêmement bien organisés. Contrairement aux souris obèses et diabétiques, ces souris DIO-R ont une glycémie très faible lors du jeûne. Cela suggère que l'hypoglycémie est nécessaire à l'établissement de la plasticité de l'EM et que son absence chez les souris obèses et diabétiques serait due au fait que leur glycémie reste importante même à jeun.

4. Le cas des autres OCVs

Dans nos études, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'EM car elle est située à proximité du NA, un noyau clé dans la régulation de la prise alimentaire. Cependant, dans le SNC, d'autres OCVs ont également été décrits, en l'occurrence l'OVLT, l'OSF, l'OSC, l'AP, la glande pinéale, la neurohypophyse. Ces OCVs sont impliqués dans la régulation homéostatique de nombreuses fonctions physiologiques telles que la régulation hydrique, de la fonction cardiovasculaire ou de la reproduction (voir Tableau 2). Nous nous sommes donc intéressés à l'organisation structurale de ces autres OCVs chez la souris mâle adulte et nous avons montré que l'OVLT, l'OSF, et l'AP possèdent une organisation similaire à celle de l'EM. En effet, la paroi du ventricule au niveau de ces OCV présente des cellules épendymaires spécialisées. Ces cellules sont de longues cellules bipolaires, ressemblant aux tanocytes de l'EM, et étant le siège d'une barrière épendymale. En effet, elles expriment des protéines de JS comme l'occludine et ZO1, avec une configuration en nid d'abeille. Des injections iv et icv de bleu Evans ont montré que cette configuration en nid d'abeille des JS rend le mur épendymaire étanche. De plus, l'épendyme exprime la claudine 1, protéine de JS exclusivement retrouvée au niveau des tanocytes et des cellules épithéliales des plexus choroïdes. Ainsi, la claudine 1 constituerait un marqueur des barrières juxtaposant des vaisseaux fenêtrés au niveau du SNC. La présence de JS permettrait également une polarisation cellulaire et la possibilité d'effectuer du transport transcellulaire : de nombreux indices d'un tel transport, comme des vésicules ou des microvillosités, ont d'ailleurs été observés sur ces cellules épendymaires (Mestres and Rascher, 1994).

Les similitudes structurales entre l'EM et les autres OCVs laissent supposer que ces derniers pourraient également être le siège de phénomènes plastiques. Par conséquent, nos résultats ouvrent la voie à d'autres travaux en neuroendocrinologie destinés à élucider la présence d'un remaniement structural dans ces régions cérébrales nécessaire à la régulation d'autres fonctions physiologiques.

Ce travail de thèse apporte un nouveau concept dans la régulation de la prise alimentaire liée à l'équilibre glucidique. En effet, les tanycytes de l'hypothalamus médiobasal seraient capables de détecter les variations glycémiques et de moduler, en réponse à celles-ci, l'organisation structurale de la région. Ainsi, lors d'un jeûne, les caractéristiques d'organe circumventriculaire de l'EM, à savoir la présence de vaisseaux fenêtrés associés à des tanycytes portant des propriétés de barrière, s'étend au NA hypothalamique. Cette réorganisation a pour conséquence de sortir le NA de la zone protégée par la BHE et de permettre aux molécules périphériques d'y accéder : de cette façon, le NA est à l'écoute de la périphérie afin de rééquilibrer la balance énergétique.

Nos résultats supplémentaires ont également montré que ce système pouvait être perturbé en cas d'obésité. En effet, des souris sous alimentation riche en graisse présentent une organisation de l'EM perturbée et non modulable. Ces perturbations pourraient être mises en relation avec les problèmes d'accès des molécules périphériques vers le NA observés chez ces souris. Afin de compléter cette étude, il nous faut désormais déterminer les causes de ce problème organisationnel et les moyens de le résoudre. Cela nous permettra par la suite de déterminer si cette désorganisation de l'interface sang/cerveau au niveau de l'EM/NA est à l'origine des hormonorésistances observées chez les souris obèses.

Pour cela, dans un premier temps, il nous faut poursuivre nos études sur les souris DIO, notamment étudier l'implication du glucose dans le problème d'organisation de l'EM/NA. En effet, chez les souris non obèses, le glucose est un modulateur de l'interface sang/cerveau au niveau de l'EM. Cependant, les souris DIO sont hyperglycémiques et ne présentent pas d'hypoglycémie lors de mises à jeun. Ces problèmes de régulation de la glycémie pourraient alors être à l'origine de la désorganisation de l'EM/NA et l'absence de plasticité induite par le jeûne chez les souris DIO. Il nous faudrait alors diminuer la glycémie des souris obèses pour voir si on restaure une organisation normale de l'EM, puis d'induire une hypoglycémie pour voir si on parvient à rétablir une plasticité de cette région cérébrale. Par la même occasion, nous pourrions étudier le passage de la leptine ou de la ghréline vers le NA afin de déterminer un lien avec les hormonorésistances développées par les souris obèses.

Dans un second temps, il est maintenant indispensable de mieux comprendre l'association entre les cellules endothéliales et les tanycytes. En effet, une étroite relation existe entre ces deux types cellulaires. Dans notre étude, nous avons mis en évidence un échange d'information des tanycytes vers les vaisseaux via la sécrétion de VEGF. Cependant,

nous émettons l'hypothèse qu'il existerait aussi des échanges dans l'autre sens. En effet, dans toutes nos études, nous avons observé une organisation différentielle des protéines de JS en fonction du phénotype du vaisseau contacté : si un tanycyte contacte un vaisseau fenêtré, il organise ses protéines de JS en nid d'abeille, tandis que s'il contacte un vaisseau BHE, ses protéines de JS ne sont pas organisées. De plus, les JS tanycytaires ont la capacité de s'organiser et se désorganiser rapidement : un tanycyte qui contactait initialement un vaisseau BHE réorganise ses protéines de JS en nid d'abeille dès lors qu'il contacte un vaisseau fenêtré. On peut alors émettre l'hypothèse que la distribution différentielle des protéines de JS entre les deux types de tanycyte (c'est-à-dire nid d'abeille versus marquage diffus) ainsi que l'expression différentielle des protéines de JS (claudine 1 ou non) pourraient être une conséquence directe d'une communication entre les tanycytes et les cellules endothéliales. Ainsi, des expériences à mener par l'utilisation de culture de tanycytes seraient de déterminer le type de communication tanycytes/cellules endothéliales, et l'existence de facteurs solubles impliqués dans ce phénomène. Par ailleurs, il sera aussi nécessaire de monter un modèle *in vitro* de barrière tanycytaire. Il nous permettrait d'étudier à la fois les mécanismes impliqués dans la transcytose de molécules via les tanycytes, mais aussi de déterminer les causes de la désorganisation de l'interface sang/hypothalamus chez les souris rendues obèses par une alimentation riche en graisse. On pourrait alors tenter de trouver des solutions pour restaurer le système.

Finalement, nos résultats permettent également d'envisager des champs de recherche beaucoup plus larges. Tout d'abord, étant donné que l'hypothalamus médiobasal est une région impliquée dans la régulation de nombreuses autres fonctions telles que la reproduction ou la réponse au stress, nous pourrions dans un premier temps déterminer si la plasticité de l'interface sang/hypothalamus au niveau de l'EM se déroule aussi lors d'autres événements. Par ailleurs, les similarités organisationnelles observées entre l'EM et les autres OCVs laissent supposer que ces derniers pourraient également être le siège de phénomènes plastiques. Par conséquent, nos résultats ouvrent la voie à d'autres travaux en neuroendocrinologie destinés à élucider la présence d'un remaniement structural dans ces régions cérébrales nécessaire à la régulation d'autres fonctions physiologiques.

- Abbott, C.R., Kennedy, A.R., Wren, A.M., Rossi, M., Murphy, K.G., Seal, L.J., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Small, C.J., and Bloom, S.R. (2003). Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. *Endocrinology* *144*, 3943–3949.
- Abbott, C.R., Monteiro, M., Small, C.J., Sajedi, A., Smith, K.L., Parkinson, J.R.C., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005). The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY(3-36) and glucagon-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Res.* *1044*, 127–131.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* *37*, 13–25.
- Acuna-Goycolea, C., and van den Pol, A.N. (2005). Peptide YY(3-36) inhibits both anorexigenic proopiomelanocortin and orexigenic neuropeptide Y neurons: implications for hypothalamic regulation of energy homeostasis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 10510–10519.
- Acuna-Goycolea, C., Tamamaki, N., Yanagawa, Y., Obata, K., and van den Pol, A.N. (2005). Mechanisms of neuropeptide Y, peptide YY, and pancreatic polypeptide inhibition of identified green fluorescent protein-expressing GABA neurons in the hypothalamic neuroendocrine arcuate nucleus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 7406–7419.
- Adam, C.L., Archer, Z.A., Findlay, P.A., Thomas, L., and Marie, M. (2002). Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine- and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. *Neuroendocrinology* *75*, 250–256.
- Ainscow, E.K., Mirshamsi, S., Tang, T., Ashford, M.L.J., and Rutter, G.A. (2002). Dynamic imaging of free cytosolic ATP concentration during fuel sensing by rat hypothalamic neurones: evidence for ATP-independent control of ATP-sensitive K(+) channels. *J. Physiol.* *544*, 429–445.
- Aja, S., Sahandy, S., Ladenheim, E.E., Schwartz, G.J., and Moran, T.H. (2001). Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behavior at a hindbrain site. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *281*, R1862–1867.
- Akiri, G., Nahari, D., Finkelstein, Y., Le, S.Y., Elroy-Stein, O., and Levi, B.Z. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene* *17*, 227–236.
- Akmaev, I.G., and Fidelina, O.V. (1978). The role of tanycytes in the mechanisms of sexual differentiation of the brain. *Neurosci. Behav. Physiol.* *9*, 230–235.
- Akmaev, I.G., and Fidelina, O.V. (1976). Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VI. The tanycytes: their relation to the sexual differentiation of the hypothalamus. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res.* *173*, 407–416.
- Alim, I., Fry, W.M., Walsh, M.H., and Ferguson, A.V. (2010). Actions of adiponectin on the excitability of subfornical organ neurons are altered by food deprivation. *Brain Res.* *1330*, 72–82.
- Altman, J., and Bayer, S.A. (1978). Development of the diencephalon in the rat. III. Ontogeny of the specialized ventricular linings of the hypothalamic third ventricle. *J. Comp. Neurol.* *182*, 995–1015.
- Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J.A., Thorens, B., and Blázquez, E. (1996). Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J. Neurochem.* *66*, 920–927.

- Ambach, G., Palkovits, M., and Szentágothai, J. (1976). Blood supply of the rat hypothalamus. IV. Retrochiasmatic area, median eminence, arcuate nucleus. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* 24, 93–119.
- Anagnostoulis, S., Karayiannakis, A.J., Lambropoulou, M., Efthimiadou, A., Polychronidis, A., and Simopoulos, C. (2008). Human leptin induces angiogenesis in vivo. *Cytokine* 42, 353–357.
- Anand, B.K., and Brobeck, J.R. (1951). Hypothalamic Control of Food Intake in Rats and Cats. *Yale J. Biol. Med.* 24, 123.
- Anini, Y., Jarrousse, C., Chariot, J., Nagain, C., Yanaihara, N., Sasaki, K., Bernad, N., Le Nguyen, D., Bataille, D., and Rozé, C. (2000). Oxyntomodulin inhibits pancreatic secretion through the nervous system in rats. *Pancreas* 20, 348–360.
- Antonelli-Orlidge, A., Saunders, K.B., Smith, S.R., and D'Amore, P.A. (1989). An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 4544–4548.
- Antonetti, D.A., Barber, A.J., Hollinger, L.A., Wolpert, E.B., and Gardner, T.W. (1999). Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J. Biol. Chem.* 274, 23463–23467.
- Aponte, Y., Atasoy, D., and Sternson, S.M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat. Neurosci.* 14, 351–355.
- Aravich, P.F., and Sclafani, A. (1983). Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav. Neurosci.* 97, 970–983.
- Arora, S., and Anubhuti (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity--a review. *Neuropeptides* 40, 375–401.
- Asakawa, A., Inui, A., Fujimiya, M., Sakamaki, R., Shinfuku, N., Ueta, Y., Meguid, M.M., and Kasuga, M. (2005). Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut* 54, 18–24.
- Aslan, A., Yildirim, M., Ayyildiz, M., Güven, A., and Agar, E. (2009). The role of nitric oxide in the inhibitory effect of ghrelin against penicillin-induced epileptiform activity in rat. *Neuropeptides* 43, 295–302.
- Aurrand-Lions, M., Johnson-Leger, C., Wong, C., Du Pasquier, L., and Imhof, B.A. (2001). Heterogeneity of endothelial junctions is reflected by differential expression and specific subcellular localization of the three JAM family members. *Blood* 98, 3699–3707.
- Balda, M.S., Whitney, J.A., Flores, C., González, S., Cerejido, M., and Matter, K. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell Biol.* 134, 1031–1049.
- Balda, M.S., Garrett, M.D., and Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J. Cell Biol.* 160, 423–432.
- Banks, W.A. (2003). Is obesity a disease of the blood-brain barrier? Physiological, pathological, and evolutionary considerations. *Curr. Pharm. Des.* 9, 801–809.
- Banks, W.A. (2008). Delivery of peptides to the brain: emphasis on therapeutic development. *Biopolymers* 90, 589–594.

- Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., and Maness, L.M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17, 305–311.
- Banks, W.A., Jaspan, J.B., Huang, W., and Kastin, A.J. (1997a). Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides* 18, 1423–1429.
- Banks, W.A., Jaspan, J.B., and Kastin, A.J. (1997b). Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 18, 1257–1262.
- Banks, W.A., Jaspan, J.B., and Kastin, A.J. (1997c). Effect of diabetes mellitus on the permeability of the blood-brain barrier to insulin. *Peptides* 18, 1577–1584.
- Banks, W.A., Tschöp, M., Robinson, S.M., and Heiman, M.L. (2002). Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 822–827.
- Banks, W.A., Coon, A.B., Robinson, S.M., Moinuddin, A., Shultz, J.M., Nakaoke, R., and Morley, J.E. (2004). Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 53, 1253–1260.
- Banks, W.A., Burney, B.O., and Robinson, S.M. (2008). Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. *Peptides* 29, 2061–2065.
- Bansal, V., Ryu, S.Y., Blow, C., Costantini, T., Loomis, W., Eliceiri, B., Baird, A., Wolf, P., and Coimbra, R. (2010). The hormone ghrelin prevents traumatic brain injury induced intestinal dysfunction. *J. Neurotrauma* 27, 2255–2260.
- Barrett, P., Ivanova, E., Graham, E.S., Ross, A.W., Wilson, D., Plé, H., Mercer, J.G., Ebling, F.J., Schuhler, S., Dupré, S.M., et al. (2006). Photoperiodic regulation of cellular retinol binding protein, CRBP1 [corrected] and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J. Endocrinol.* 191, 687–698.
- Baskin, D.G., Brewitt, B., Davidson, D.A., Corp, E., Paquette, T., Figlewicz, D.P., Lewellen, T.K., Graham, M.K., Woods, S.G., and Dorsa, D.M. (1986). Quantitative autoradiographic evidence for insulin receptors in the choroid plexus of the rat brain. *Diabetes* 35, 246–249.
- Baskin, D.G., Hahn, T.M., and Schwartz, M.W. (1999). Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Horm. Metab. Res. Horm.- Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* 31, 345–350.
- Bass, T., Singer, G., Slusser, J., and Liuzzi, F.J. (1992). Radial glial interaction with cerebral germinal matrix capillaries in the fetal baboon. *Exp. Neurol.* 118, 126–132.
- Basuroy, S., Sheth, P., Kuppuswamy, D., Balasubramanian, S., Ray, R.M., and Rao, R.K. (2003). Expression of kinase-inactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the Caco-2 cell monolayer. *J. Biol. Chem.* 278, 11916–11924.
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., et al. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650–654.
- Bearer, E.L., and Orci, L. (1985). Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study. *J. Cell Biol.* 100, 418–428.

- Beauchesne, E., Desjardins, P., Hazell, A.S., and Butterworth, R.F. (2009). Altered expression of tight junction proteins and matrix metalloproteinases in thiamine-deficient mouse brain. *Neurochem. Int.* *55*, 275–281.
- Bechtold, D.A., Sidibe, A., Saer, B.R.C., Li, J., Hand, L.E., Ivanova, E.A., Darras, V.M., Dam, J., Jockers, R., Luckman, S.M., et al. (2012). A role for the melatonin-related receptor GPR50 in leptin signaling, adaptive thermogenesis, and torpor. *Curr. Biol. Cb* *22*, 70–77.
- Becskei, C., Bilik, K.U., Klussmann, S., Jarosch, F., Lutz, T.A., and Riediger, T. (2008a). The anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11-3 blocks ghrelin- but not fasting-induced neuronal activation in the hypothalamic arcuate nucleus. *J. Neuroendocrinol.* *20*, 85–92.
- Becskei, C., Lutz, T.A., and Riediger, T. (2008b). Glucose reverses fasting-induced activation in the arcuate nucleus of mice. *Neuroreport* *19*, 105–109.
- Becskei, C., Lutz, T.A., and Riediger, T. (2009a). Blunted fasting-induced hypothalamic activation and refeeding hyperphagia in late-onset obesity. *Neuroendocrinology* *90*, 371–382.
- Becskei, C., Lutz, T.A., and Riediger, T. (2009b). Diet-derived nutrients mediate the inhibition of hypothalamic NPY neurons in the arcuate nucleus of mice during refeeding. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *297*, R100–110.
- Becskei, C., Lutz, T.A., and Riediger, T. (2010). Reduced fasting-induced activation of hypothalamic arcuate neurons is associated with hyperleptinemia and increased leptin sensitivity in obese mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *299*, R632–641.
- Benkovic, S.A., and Connor, J.R. (1993). Ferritin, transferrin, and iron in selected regions of the adult and aged rat brain. *J. Comp. Neurol.* *338*, 97–113.
- Bennett, H.S., LUFT, J.H., and HAMPTON, J.C. (1959). Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am. J. Physiol.* *196*, 381–390.
- Benomar, Y., Gertler, A., De Lacy, P., Crépin, D., Ould Hamouda, H., Riffault, L., and Taouis, M. (2013). Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes* *62*, 102–114.
- Bernacki, J., Dobrowolska, A., Nierwińska, K., and Małeck, A. (2008). Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol. Reports Pr* *60*, 600–622.
- Betz, A.L., and Goldstein, G.W. (1980). The basis for active transport at the blood-brain barrier. *Adv. Exp. Med. Biol.* *131*, 5–16.
- Bewick, G.A., Gardiner, J.V., Dhillo, W.S., Kent, A.S., White, N.E., Webster, Z., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005). Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 1680–1682.
- Bi, S., Robinson, B.M., and Moran, T.H. (2003). Acute food deprivation and chronic food restriction differentially affect hypothalamic NPY mRNA expression. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *285*, R1030–1036.
- Bjelke, B., and Fuxe, K. (1993). Intraventricular beta-endorphin accumulates in DARPP-32 immunoreactive tanycytes. *Neuroreport* *5*, 265–268.
- Bjørbaek, C., Elmquist, J.K., Michl, P., Ahima, R.S., van Bueren, A., McCall, A.L., and Flier, J.S. (1998). Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* *139*, 3485–3491.

- Bjursell, M., Ahnmark, A., Bohlooly-Y, M., William-Olsson, L., Rhedin, M., Peng, X.-R., Ploj, K., Gerdin, A.-K., Arnerup, G., Elmgren, A., et al. (2007). Opposing Effects of Adiponectin Receptors 1 and 2 on Energy Metabolism. *Diabetes* 56, 583–593.
- Blevins, J.E., Eakin, T.J., Murphy, J.A., Schwartz, M.W., and Baskin, D.G. (2003). Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. *Brain Res.* 993, 30–41.
- Blouet, C., Liu, S.-M., Jo, Y.-H., Chua, S., and Schwartz, G.J. (2012). TXNIP in Agrp neurons regulates adiposity, energy expenditure, and central leptin sensitivity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 9870–9877.
- Boado, R.J., Li, J.Y., Nagaya, M., Zhang, C., and Pardridge, W.M. (1999). Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12079–12084.
- Bolborea, M., and Dale, N. (2013). Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci.* 36, 91–100.
- Bolborea, M., Laran-Chich, M.-P., Rasri, K., Hildebrandt, H., Govitrapong, P., Simonneaux, V., Pévet, P., Steinlechner, S., and Klosen, P. (2011). Melatonin controls photoperiodic changes in tanycyte vimentin and neural cell adhesion molecule expression in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Endocrinology* 152, 3871–3883.
- Bolz, S., Farrell, C.L., Dietz, K., and Wolburg, H. (1996). Subcellular distribution of glucose transporter (GLUT-1) during development of the blood-brain barrier in rats. *Cell Tissue Res.* 284, 355–365.
- Bouret, S.G., Draper, S.J., and Simerly, R.B. (2004a). Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 2797–2805.
- Bouret, S.G., Draper, S.J., and Simerly, R.B. (2004b). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304, 108–110.
- Bowman, G.L., Kaye, J.A., and Quinn, J.F. (2012). Dyslipidemia and blood-brain barrier integrity in Alzheimer's disease. *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* 2012, 184042.
- Brawer, J.R. (1972). The fine structure of the ependymal tanycytes at the level of the arcuate nucleus. *J. Comp. Neurol.* 145, 25–41.
- Brawer, J.R., Lin, P.S., and Sonnenschein, C. (1974). Morphological plasticity in the wall of the third ventricle during the estrous cycle in the rat: A scanning electron microscopic study. *Anat. Rec.* 179, 481–489.
- Van Breemen, V.L., and Clemente, C.D. (1955). Silver deposition in the central nervous system and the hematoencephalic barrier studied with the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1, 161–166.
- Briggs, D.I., Enriori, P.J., Lemus, M.B., Cowley, M.A., and Andrews, Z.B. (2010). Diet-induced obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. *Endocrinology* 151, 4745–4755.
- Brightman, M.W., and Reese, T.S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* 40, 648–677.
- Broadwell, R.D., and Brightman, M.W. (1976). Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *J. Comp. Neurol.* 166, 257–283.

Broadwell, R.D., Balin, B.J., Salzman, M., and Kaplan, R.S. (1983). Brain-blood barrier? Yes and no. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *80*, 7352–7356.

Broberger, C., Landry, M., Wong, H., Walsh, J.N., and Hökfelt, T. (1997). Subtypes Y1 and Y2 of the neuropeptide Y receptor are respectively expressed in pro-opiomelanocortin- and neuropeptide-Y-containing neurons of the rat hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroendocrinology* *66*, 393–408.

Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J.G., and Hökfelt, T. (1998). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J. Comp. Neurol.* *402*, 460–474.

Buchanan, C., Mahesh, V., Zamorano, P., and Brann, D. (1998). Central nervous system effects of leptin. *Trends Endocrinol. Metab.* *9*, 146–150.

Burdakov, D., Jensen, L.T., Alexopoulos, H., Williams, R.H., Fearon, I.M., O’Kelly, I., Gerasimenko, O., Fugger, L., and Verkhratsky, A. (2006). Tandem-pore K⁺ channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. *Neuron* *50*, 711–722.

Cao, R., Brakenhielm, E., Wahlestedt, C., Thyberg, J., and Cao, Y. (2001). Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 6390–6395.

Cardona-Gómez, G.P., DonCarlos, L., and Garcia-Segura, L.M. (2000). Insulin-like growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain. *Neuroscience* *99*, 751–760.

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., et al. (1998). Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* *394*, 485–490.

Caron, E., Sachot, C., Prevot, V., and Bouret, S.G. (2010). Distribution of leptin-sensitive cells in the postnatal and adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* *518*, 459–476.

Carson-Walter, E.B., Hampton, J., Shue, E., Geynisman, D.M., Pillai, P.K., Sathanoori, R., Madden, S.L., Hamilton, R.L., and Walter, K.A. (2005). Plasmalemmal vesicle associated protein-1 is a novel marker implicated in brain tumor angiogenesis. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 7643–7650.

Chemelli, R.M., Willie, J.T., Sinton, C.M., Elmquist, J.K., Scammell, T., Lee, C., Richardson, J.A., Williams, S.C., Xiong, Y., Kisanuki, Y., et al. (1999). Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell* *98*, 437–451.

Chen, A.S., Marsh, D.J., Trumbauer, M.E., Frazier, E.G., Guan, X.M., Yu, H., Rosenblum, C.I., Vongs, A., Feng, Y., Cao, L., et al. (2000). Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat. Genet.* *26*, 97–102.

Chih, C.-P., and Roberts Jr, E.L. (2003). Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *23*, 1263–1281.

Ciofi, P. (2011). The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. *Neurosci. Lett.* *487*, 187–190.

Ciofi, P., Garret, M., Lapirot, O., Lafon, P., Loyens, A., Prévot, V., and Levine, J.E. (2009). Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* *150*, 5509–5519.

- Clasadonte, J., Poulain, P., Hanchate, N.K., Corfas, G., Ojeda, S.R., and Prevot, V. (2011). Prostaglandin E2 release from astrocytes triggers gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron firing via EP2 receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 16104–16109.
- Clawson, C.C., Hartmann, J.F., and Vernier, R.L. (1966). Electron microscopy of the effect of gram-negative endotoxin on the blood-brain barrier. *J. Comp. Neurol.* *127*, 183–198.
- Clementi, F., and Palade, G.E. (1969). Intestinal capillaries. I. Permeability to peroxidase and ferritin. *J. Cell Biol.* *41*, 33–58.
- Coleman, D.L. (2010). A historical perspective on leptin. *Nat. Med.* *16*, 1097–1099.
- Collins, P., and Woollam, D.H. (1979). The ventricular surface of the subcommissural organ: a scanning and transmission electron microscopic study. *J. Anat.* *129*, 623–631.
- Coomer, B.L., and Stewart, P.A. (1985). Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc. Res.* *30*, 99–115.
- Coope, A., Milanski, M., Araújo, E.P., Tambascia, M., Saad, M.J.A., Geloneze, B., and Velloso, L.A. (2008). AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptin-like actions of adiponectin in the hypothalamus. *Febs Lett.* *582*, 1471–1476.
- Coppola, A., Hughes, J., Esposito, E., Schiavo, L., Meli, R., and Diano, S. (2005). Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting. *Febs Lett.* *579*, 4654–4658.
- Coppola, A., Liu, Z.-W., Andrews, Z.B., Paradis, E., Roy, M.-C., Friedman, J.M., Ricquier, D., Richard, D., Horvath, T.L., Gao, X.-B., et al. (2007). A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab.* *5*, 21–33.
- Cornford, E.M., Braun, L.D., Oldendorf, W.H., and Hill, M.A. (1982). Comparison of lipid-mediated blood-brain-barrier penetrability in neonates and adults. *Am. J. Physiol.* *243*, C161–168.
- Cornford, E.M., Hyman, S., and Pardridge, W.M. (1993a). An electron microscopic immunogold analysis of developmental up-regulation of the blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *13*, 841–854.
- Cornford, E.M., Young, D., Paxton, J.W., Hyman, S., Farrell, C.L., and Elliott, R.B. (1993b). Blood-brain glucose transfer in the mouse. *Neurochem. Res.* *18*, 591–597.
- Cornish, J., Callon, K.E., Cooper, G.J., and Reid, I.R. (1995). Amylin stimulates osteoblast proliferation and increases mineralized bone volume in adult mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *207*, 133–139.
- Cortes-Campos, C., Elizondo, R., Carril, C., Martínez, F., Boric, K., Nualart, F., and Garcia-Robles, M.A. (2013). MCT2 expression and lactate influx in anorexigenic and orexigenic neurons of the arcuate nucleus. *Plos One* *8*, e62532.
- Coskun, T., Bina, H.A., Schneider, M.A., Dunbar, J.D., Hu, C.C., Chen, Y., Moller, D.E., and Kharitonov, A. (2008). Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* *149*, 6018–6027.
- Cota, D., Proulx, K., Smith, K.A.B., Kozma, S.C., Thomas, G., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2006). Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* *312*, 927–930.

- Cotero, V.E., and Routh, V.H. (2009). Insulin blunts the response of glucose-excited neurons in the ventrolateral-ventromedial hypothalamic nucleus to decreased glucose. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *296*, E1101–1109.
- Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* *411*, 480–484.
- Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J., Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., et al. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* *37*, 649–661.
- Criego, A.B., Tkac, I., Kumar, A., Thomas, W., Gruetter, R., and Seaquist, E.R. (2005). Brain glucose concentrations in patients with type 1 diabetes and hypoglycemia unawareness. *J. Neurosci. Res.* *79*, 42–47.
- Crone, C., and Olesen, S.P. (1982). Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.* *241*, 49–55.
- Cuevas-Ramos, D., Almeda-Valdes, P., Aguilar-Salinas, C.A., Cuevas-Ramos, G., Cuevas-Sosa, A.A., and Gomez-Perez, F.J. (2009). The role of fibroblast growth factor 21 (FGF21) on energy balance, glucose and lipid metabolism. *Curr. Diabetes Rev.* *5*, 216–220.
- Dacquin, R., Davey, R.A., Laplace, C., Levasseur, R., Morris, H.A., Goldring, S.R., Gebre-Medhin, S., Galson, D.L., Zajac, J.D., and Karsenty, G. (2004). Amylin inhibits bone resorption while the calcitonin receptor controls bone formation in vivo. *J. Cell Biol.* *164*, 509–514.
- Dakin, C.L., Small, C.J., Batterham, R.L., Neary, N.M., Cohen, M.A., Patterson, M., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2004). Peripheral oxyntomodulin reduces food intake and body weight gain in rats. *Endocrinology* *145*, 2687–2695.
- Dale, N. (2011). Purinergic signaling in hypothalamic tanycytes: potential roles in chemosensing. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 237–244.
- Dantz, D., Bewersdorf, J., Fruehwald-Schultes, B., Kern, W., Jelkmann, W., Born, J., Fehm, H.L., and Peters, A. (2002). Vascular endothelial growth factor: a novel endocrine defensive response to hypoglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 835–840.
- Date, Y., Murakami, N., Toshinai, K., Matsukura, S., Nijijima, A., Matsuo, H., Kangawa, K., and Nakazato, M. (2002). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* *123*, 1120–1128.
- Davidowa, H., Ziska, T., and Plagemann, A. (2004). Arcuate neurons of overweight rats differ in their responses to amylin from controls. *Neuroreport* *15*, 2801–2805.
- Davidson, T.L., Monnot, A., Neal, A.U., Martin, A.A., Horton, J.J., and Zheng, W. (2012). The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. *Physiol. Behav.* *107*, 26–33.
- Davis, S., and Yancopoulos, G.D. (1999). The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *237*, 173–185.
- Davson, H., and Segal, M.B. (1970). The effects of some inhibitors and accelerators of sodium transport on the turnover of ²²Na in the cerebrospinal fluid and the brain. *J. Physiol.* *209*, 131–153.

- Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M.P., Pierce, A., Torpier, G., and Cecchelli, R. (1997). A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* *138*, 877–889.
- Dehouck, M.P., Méresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., and Cecchelli, R. (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem.* *54*, 1798–1801.
- Dellmann, H.D., and Linner, J.G. (1979). Ultrastructure of the subfornical organ of the chicken (*Gallus domesticus*). *Cell Tissue Res.* *197*, 137–153.
- Dellmann, H.D., and Simpson, J.B. (1976). Regional differences in the morphology of the rat subfornical organ. *Brain Res.* *116*, 389–400.
- Dempsey, E.W., and Wislocki, G.B. (1955). An electron microscopic study of the blood-brain barrier in the rat, employing silver nitrate as a vital stain. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *1*, 245–256.
- Dente, C.J., Steffes, C.P., Speyer, C., and Tyburski, J.G. (2001). Pericytes augment the capillary barrier in in vitro cocultures. *J. Surg. Res.* *97*, 85–91.
- Dermietzel, R., Thürauf, N., and Kalweit, P. (1983). Surface charges associated with fenestrated brain capillaries. II. In vivo studies on the role of molecular charge in endothelial permeability. *J. Ultrastruct. Res.* *84*, 111–119.
- Dhillon, H., Zigman, J.M., Ye, C., Lee, C.E., McGovern, R.A., Tang, V., Kenny, C.D., Christiansen, L.M., White, R.D., Edelstein, E.A., et al. (2006). Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* *49*, 191–203.
- Diano, S., Naftolin, F., Goglia, F., and Horvath, T.L. (1998). Segregation of the intra- and extrahypothalamic neuropeptide Y and catecholaminergic inputs on paraventricular neurons, including those producing thyrotropin-releasing hormone. *Regul. Pept.* *75-76*, 117–126.
- Dickson, S.L., and Luckman, S.M. (1997). Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* *138*, 771–777.
- Dore-Duffy, P., Owen, C., Balabanov, R., Murphy, S., Beaumont, T., and Rafols, J.A. (2000). Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvasc. Res.* *60*, 55–69.
- Dueñas, M., Luquín, S., Chowen, J.A., Torres-Alemán, I., Naftolin, F., and Garcia-Segura, L.M. (1994). Gonadal hormone regulation of insulin-like growth factor-I-like immunoreactivity in hypothalamic astroglia of developing and adult rats. *Neuroendocrinology* *59*, 528–538.
- Duvernoy, H.M., and Risold, P.-Y. (2007). The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res. Rev.* *56*, 119–147.
- Ebling, F.J.P., and Samms, R. (2013). Txnip, tanycytes, and torpor. *Endocrinology* *154*, 1970–1972.
- Ebnet, K. (2008). Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem. Cell Biol.* *130*, 1–20.
- Edwards, C.M., Abbott, C.R., Sunter, D., Kim, M., Dakin, C.L., Murphy, K.G., Abusnana, S., Taheri, S., Rossi, M., and Bloom, S.R. (2000). Cocaine- and amphetamine-regulated transcript, glucagon-like peptide-1 and corticotrophin releasing factor inhibit feeding via agouti-related protein independent pathways in the rat. *Brain Res.* *866*, 128–134.

- Elfeber, K., Köhler, A., Lutzenburg, M., Osswald, C., Galla, H.-J., Witte, O.W., and Koepsell, H. (2004). Localization of the Na⁺-D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier. *Histochem. Cell Biol.* *121*, 201–207.
- El-Haschimi, K., Pierroz, D.D., Hileman, S.M., Bjørbaek, C., and Flier, J.S. (2000). Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* *105*, 1827–1832.
- Elmqvist, J.K., Elias, C.F., and Saper, C.B. (1999). From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* *22*, 221–232.
- Emoto, N., Gonzalez, A.M., Walicke, P.A., Wada, E., Simmons, D.M., Shimasaki, S., and Baird, A. (1989). Basic fibroblast growth factor (FGF) in the central nervous system: identification of specific loci of basic FGF expression in the rat brain. *Growth Factors Chur Switz.* *2*, 21–29.
- Engelhardt, B. (2003). Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res.* *314*, 119–129.
- Erickson, J.C., Clegg, K.E., and Palmiter, R.D. (1996). Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y. *Nature* *381*, 415–421.
- Esser, S., Wolburg, K., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T., and Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J. Cell Biol.* *140*, 947–959.
- Fain, J.N., Cheema, P.S., Bahouth, S.W., and Lloyd Hiler, M. (2003). Resistin release by human adipose tissue explants in primary culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *300*, 674–678.
- Fan, X., Heijnen, C.J., van der Kooij, M.A., Groenendaal, F., and van Bel, F. (2009). The role and regulation of hypoxia-inducible factor-1 α expression in brain development and neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Res. Rev.* *62*, 99–108.
- Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (2009). Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1165*, 113–120.
- Faouzi, M., Leshan, R., Björnholm, M., Hennessey, T., Jones, J., and Münzberg, H. (2007). Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. *Endocrinology* *148*, 5414–5423.
- Farooqi, I.S., and O’Rahilly, S. (2005). Monogenic obesity in humans. *Annu. Rev. Med.* *56*, 443–458.
- Farooqi, I.S., Yeo, G.S., and O’Rahilly, S. (2003). Binge eating as a phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N. Engl. J. Med.* *349*, 606–609; author reply 606–609.
- Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J. Cell Biol.* *17*, 375–412.
- Farrell, C.L., and Pardridge, W.M. (1991). Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 5779–5783.
- Fekete, C., Zséli, G., Singru, P.S., Kádár, A., Wittmann, G., Füzesi, T., El-Bermani, W., and Lechan, R.M. (2012). Activation of anorexigenic pro-opiomelanocortin neurones during refeeding is independent of vagal and brainstem inputs. *J. Neuroendocrinol.* *24*, 1423–1431.
- Felinski, E.A., and Antonetti, D.A. (2005). Glucocorticoid regulation of endothelial cell tight junction gene expression: novel treatments for diabetic retinopathy. *Curr. Eye Res.* *30*, 949–957.

- Fernandez-Galaz, M.C., Torres-Aleman, I., and Garcia-Segura, L.M. (1996). Endocrine-dependent accumulation of IGF-I by hypothalamic glia. *Neuroreport* *8*, 373–377.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O’Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* *380*, 439–442.
- Fetissov, S.O., Xu, Z.-Q., Byrne, L.C., Hassani, H., Ernfors, P., and Hökfelt, T. (2003). Neuropeptide y targets in the hypothalamus: nitric oxide synthesizing neurones express Y1 receptor. *J. Neuroendocrinol.* *15*, 754–760.
- Fioramonti, X., Lorsignol, A., Taupignon, A., and Pénicaud, L. (2004). A new ATP-sensitive K⁺ channel-independent mechanism is involved in glucose-excited neurons of mouse arcuate nucleus. *Diabetes* *53*, 2767–2775.
- Fioramonti, X., Marsollier, N., Song, Z., Fakira, K.A., Patel, R.M., Brown, S., Duparc, T., Pica-Mendez, A., Sanders, N.M., Knaut, C., et al. (2010). Ventromedial hypothalamic nitric oxide production is necessary for hypoglycemia detection and counterregulation. *Diabetes* *59*, 519–528.
- Fioramonti, X., Song, Z., Vazirani, R.P., Beuve, A., and Routh, V.H. (2011). Hypothalamic Nitric Oxide in Hypoglycemia Detection and Counterregulation: A Two-Edged Sword. *Antioxidants Redox Signal.* *14*, 505–517.
- Flament-Durand, J., and Brion, J.P. (1985). Tanycytes: morphology and functions: a review. *Int. Rev. Cytol.* *96*, 121–155.
- Fonseca, T.L., Correa-Medina, M., Campos, M.P.O., Wittmann, G., Werneck-de-Castro, J.P., Arrojo e Drigo, R., Mora-Garzon, M., Ueta, C.B., Caicedo, A., Fekete, C., et al. (2013). Coordination of hypothalamic and pituitary T3 production regulates TSH expression. *J. Clin. Invest.* *123*, 1492–1500.
- Förster, C., Silwedel, C., Golenhofen, N., Burek, M., Kietz, S., Mankertz, J., and Drenckhahn, D. (2005). Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. *J. Physiol.* *565*, 475–486.
- Frayling, C., Britton, R., and Dale, N. (2011). ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J. Physiol.* *589*, 2275–2286.
- Fry, M., Smith, P.M., Hoyda, T.D., Duncan, M., Ahima, R.S., Sharkey, K.A., and Ferguson, A.V. (2006). Area postrema neurons are modulated by the adipocyte hormone adiponectin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 9695–9702.
- Fu, L.-Y., and van den Pol, A.N. (2008). Agouti-related peptide and MC3/4 receptor agonists both inhibit excitatory hypothalamic ventromedial nucleus neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 5433–5449.
- Furuse, M., Fujimoto, K., Sato, N., Hirase, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1996). Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures. *J. Cell Sci.* *109 (Pt 2)*, 429–435.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998a). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* *141*, 1539–1550.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998b). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* *143*, 391–401.

- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998c). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* *143*, 391–401.
- Gaigé, S., Abysique, A., and Bouvier, M. (2002). Effects of leptin on cat intestinal vagal mechanoreceptors. *J. Physiol.* *543*, 679–689.
- García, M.A., Millán, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J.C., Oñate, S.A., et al. (2003). Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J. Neurochem.* *86*, 709–724.
- García-Segura, L.M., Chowen, J.A., Dueñas, M., Torres-Aleman, I., and Naftolin, F. (1994). Gonadal steroids as promoters of neuro-glial plasticity. *Psychoneuroendocrinology* *19*, 445–453.
- García-Segura, L.M., Pérez, J., Pons, S., Rejas, M.T., and Torres-Alemán, I. (1991). Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Res.* *560*, 167–174.
- Gardner, T.W. (1995). Histamine, ZO-1 and increased blood-retinal barrier permeability in diabetic retinopathy. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* *93*, 583–621.
- Gereben, B., Pachucki, J., Kollár, A., Liposits, Z., and Fekete, C. (2004). Ontogenic redistribution of type 2 deiodinase messenger ribonucleic acid in the brain of chicken. *Endocrinology* *145*, 3619–3625.
- Gherzi-Egea, J.F., Leninger-Muller, B., Suleman, G., Siest, G., and Minn, A. (1994). Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *J. Neurochem.* *62*, 1089–1096.
- Gherzi-Egea, J.F., Finnegan, W., Chen, J.L., and Fenstermacher, J.D. (1996). Rapid distribution of intraventricularly administered sucrose into cerebrospinal fluid cisterns via subarachnoid velae in rat. *Neuroscience* *75*, 1271–1288.
- Gibbs, J., Young, R.C., and Smith, G.P. (1973). Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* *84*, 488–495.
- Givalois, L., Naert, G., Rage, F., Ixart, G., Arancibia, S., and Tapia-Arancibia, L. (2004). A single brain-derived neurotrophic factor injection modifies hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in adult male rats. *Mol. Cell. Neurosci.* *27*, 280–295.
- Gobron, S., Monnerie, H., Meiniel, R., Creveaux, I., Lehmann, W., Lamalle, D., Dastugue, B., and Meiniel, A. (1996). SCO-spondin: a new member of the thrombospondin family secreted by the subcommissural organ is a candidate in the modulation of neuronal aggregation. *J. Cell Sci.* *109 (Pt 5)*, 1053–1061.
- Gold, R.M. (1973). Hypothalamic obesity: the myth of the ventromedial nucleus. *Science* *182*, 488–490.
- Gonul, E., Duz, B., Kahraman, S., Kayali, H., Kubar, A., and Timurkaynak, E. (2002). Early pericyte response to brain hypoxia in cats: an ultrastructural study. *Microvasc. Res.* *64*, 116–119.
- González, J.A., Reimann, F., and Burdakov, D. (2009a). Dissociation between sensing and metabolism of glucose in sugar sensing neurones. *J. Physiol.* *587*, 41–48.
- González, J.A., Reimann, F., and Burdakov, D. (2009b). Dissociation between sensing and metabolism of glucose in sugar sensing neurones. *J. Physiol.* *587*, 41–48.

- Gotoh, H., Okumura, A., Nagai, K., and Okumura, N. (2008). Localization of phospho-tyrosine489-beta-adducin immunoreactivity in the hypothalamic tanycytes and its involvement in energy homeostasis. *Brain Res.* *1228*, 97–106.
- Gottardi, C.J., Arpin, M., Fanning, A.S., and Louvard, D. (1996). The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 10779–10784.
- Green, J.D., and Harris, G.W. (1947). The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. *J. Endocrinol.* *5*, 136–146.
- Green, J.D., and Harris, G.W. (1949). Observation of the hypophysio-portal vessels of the living rat. *J. Physiol.* *108*, 359–361.
- Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A.W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., et al. (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat. Neurosci.* *8*, 1289–1291.
- Gross, P.M., and Weindl, A. (1987). Peering through the windows of the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *7*, 663–672.
- Gross, P.M., Blasberg, R.G., Fenstermacher, J.D., and Patlak, C.S. (1987). The microcirculation of rat circumventricular organs and pituitary gland. *Brain Res. Bull.* *18*, 73–85.
- Guadaño-Ferraz, A., Escámez, M.J., Rausell, E., and Bernal, J. (1999). Expression of type 2 iodothyronine deiodinase in hypothyroid rat brain indicates an important role of thyroid hormone in the development of specific primary sensory systems. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 3430–3439.
- Guan, X.M., Hess, J.F., Yu, H., Hey, P.J., and van der Ploeg, L.H. (1997). Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain. *Mol. Cell. Endocrinol.* *133*, 1–7.
- Guillam, M.T., Hümmeler, E., Schaerer, E., Yeh, J.I., Birnbaum, M.J., Beermann, F., Schmidt, A., Dériaz, N., Thorens, B., and Wu, J.Y. (1997). Early diabetes and abnormal postnatal pancreatic islet development in mice lacking Glut-2. *Nat. Genet.* *17*, 327–330.
- Guillod-Maximin, E., Lorsignol, A., Alquier, T., and Pénicaud, L. (2004). Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *J. Neuroendocrinol.* *16*, 464–471.
- Guillod-Maximin, E., Roy, A.F., Vacher, C.M., Aubourg, A., Bailleux, V., Lorsignol, A., Pénicaud, L., Parquet, M., and Taouis, M. (2009). Adiponectin receptors are expressed in hypothalamus and colocalized with proopiomelanocortin and neuropeptide Y in rodent arcuate neurons. *J. Endocrinol.* *200*, 93–105.
- Haan, N., Goodman, T., Najdi-Samiei, A., Stratford, C.M., Rice, R., El Agha, E., Bellusci, S., and Hajihosseini, M.K. (2013). Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *33*, 6170–6180.
- Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1998). Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* *1*, 271–272.
- Hallmann, R., Mayer, D.N., Berg, E.L., Broermann, R., and Butcher, E.C. (1995). Novel mouse endothelial cell surface marker is suppressed during differentiation of the blood brain barrier. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *202*, 325–332.

- Hand, L.E., Saer, B.R.C., Hui, S.T., Jinnah, H.A., Steinlechner, S., Loudon, A.S.I., and Bechtold, D.A. (2013). Induction of the metabolic regulator Txnip in fasting-induced and natural torpor. *Endocrinology* 154, 2081–2091.
- Harb, R., Whiteus, C., Freitas, C., and Grutzendler, J. (2013). In vivo imaging of cerebral microvascular plasticity from birth to death. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 146–156.
- Harik, S.I., Kalaria, R.N., Andersson, L., Lundahl, P., and Perry, G. (1990). Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: abundance in tissues with barrier functions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 10, 3862–3872.
- Harke, N., Leers, J., Kietz, S., Drenckhahn, D., and Förster, C. (2008). Glucocorticoids regulate the human occludin gene through a single imperfect palindromic glucocorticoid response element. *Mol. Cell. Endocrinol.* 295, 39–47.
- Hasselbalch, S.G., Knudsen, G.M., Jakobsen, J., Hageman, L.P., Holm, S., and Paulson, O.B. (1995). Blood-brain barrier permeability of glucose and ketone bodies during short-term starvation in humans. *Am. J. Physiol.* 268, E1161–1166.
- Hassouna, R., Zizzari, P., Viltart, O., Yang, S.-K., Gardette, R., Videau, C., Badoer, E., Epelbaum, J., and Tolle, V. (2012). A natural variant of obestatin, Q90L, inhibits ghrelin's action on food intake and GH secretion and targets NPY and GHRH neurons in mice. *Plos One* 7, e51135.
- Hatton, J.D., and Ellisman, M.H. (1982). The distribution of orthogonal arrays in the freeze-fractured rat median eminence. *J. Neurocytol.* 11, 335–349.
- Hawkins, B.T., Lundeen, T.F., Norwood, K.M., Brooks, H.L., and Egleton, R.D. (2007). Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia* 50, 202–211.
- Van Heek, M., Mullins, D.E., Wirth, M.A., Graziano, M.P., Fawzi, A.B., Compton, D.S., France, C.F., Hoos, L.M., Casale, R.L., Sybertz, E.J., et al. (1996). The relationship of tissue localization, distribution and turnover to feeding after intraperitoneal 125I-leptin administration to ob/ob and db/db mice. *Horm. Metab. Res. Horm.- Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* 28, 653–658.
- Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Dev. Camb. Engl.* 126, 3047–3055.
- Hertz, M.M., Paulson, O.B., Barry, D.I., Christiansen, J.S., and Svendsen, P.A. (1981). Insulin increases glucose transfer across the blood-brain barrier in man. *J. Clin. Invest.* 67, 597–604.
- Herwig, A., Wilson, D., Logie, T.J., Boelen, A., Morgan, P.J., Mercer, J.G., and Barrett, P. (2009). Photoperiod and acute energy deficits interact on components of the thyroid hormone system in hypothalamic tanycytes of the Siberian hamster. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 296, R1307–1315.
- Herzog, R.I., Jiang, L., Herman, P., Zhao, C., Sanganahalli, B.G., Mason, G.F., Hyder, F., Rothman, D.L., Sherwin, R.S., and Behar, K.L. (2013). Lactate preserves neuronal metabolism and function following antecedent recurrent hypoglycemia. *J. Clin. Invest.* 123, 1988–1998.
- Hetherington, A.W., and Ranson, S.W. (1940). Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat. Rec.* 78, 149–172.

- Hileman, S.M., Pierroz, D.D., Masuzaki, H., Bjørbaek, C., El-Haschimi, K., Banks, W.A., and Flier, J.S. (2002). Characterization of short isoforms of the leptin receptor in rat cerebral microvessels and of brain uptake of leptin in mouse models of obesity. *Endocrinology* *143*, 775–783.
- Holloway, S.A., and Stevenson, J.A. (1964). EFFECT OF GLUCAGON ON FOOD INTAKE AND WEIGHT GAIN IN THE YOUNG RAT. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *42*, 867–869.
- Horton, B.N., Solanki, R.B., Rajneesh, K.F., Kulesza, P., and Ardelt, A.A. (2010). Localization of angiopoietin-1 and Tie2 immunoreactivity in rodent ependyma and adjacent blood vessels suggests functional relationships. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *58*, 53–60.
- Hou, J., Paul, D.L., and Goodenough, D.A. (2005). Paracellin-1 and the modulation of ion selectivity of tight junctions. *J. Cell Sci.* *118*, 5109–5118.
- Van Houten, M., Posner, B.I., Kopriwa, B.M., and Brawer, J.R. (1980). Insulin binding sites localized to nerve terminals in rat median eminence and arcuate nucleus. *Science* *207*, 1081–1083.
- Hoyda, T.D., Fry, M., Ahima, R.S., and Ferguson, A.V. (2007). Adiponectin selectively inhibits oxytocin neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Physiol.* *585*, 805–816.
- Hoyda, T.D., Smith, P.M., and Ferguson, A.V. (2009). Adiponectin acts in the nucleus of the solitary tract to decrease blood pressure by modulating the excitability of neuropeptide Y neurons. *Brain Res.* *1256*, 76–84.
- Hsueh, H., Pan, W., and Kastin, A.J. (2007). The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides* *28*, 2382–2386.
- Huber, J.D., VanGilder, R.L., and Houser, K.A. (2006). Streptozotocin-induced diabetes progressively increases blood-brain barrier permeability in specific brain regions in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *291*, H2660–2668.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeier, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., et al. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* *88*, 131–141.
- Igarashi, Y., Utsumi, H., Chiba, H., Yamada-Sasamori, Y., Tobioka, H., Kamimura, Y., Furuuchi, K., Kokai, Y., Nakagawa, T., Mori, M., et al. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *261*, 108–112.
- Inai, T., Kobayashi, J., and Shibata, Y. (1999). Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur. J. Cell Biol.* *78*, 849–855.
- Ioannidou, S., Deinhardt, K., Miotla, J., Bradley, J., Cheung, E., Samuelsson, S., Ng, Y.-S., and Shima, D.T. (2006). An in vitro assay reveals a role for the diaphragm protein PV-1 in endothelial fenestra morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 16770–16775.
- Ishii, S., Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Sugihara, H., and Oikawa, S. (2008). Triiodothyronine (T3) stimulates food intake via enhanced hypothalamic AMP-activated kinase activity. *Regul. Pept.* *151*, 164–169.
- Van Itallie, C.M., and Anderson, J.M. (1997). Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J. Cell Sci.* *110 (Pt 9)*, 1113–1121.

- Ivanova, E.A., Bechtold, D.A., Dupré, S.M., Brennand, J., Barrett, P., Luckman, S.M., and Loudon, A.S.I. (2008). Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knockout mouse. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *294*, E176–182.
- Iwasaki, Y., and Yada, T. (2012). Vagal afferents sense meal-associated gastrointestinal and pancreatic hormones: mechanism and physiological role. *Neuropeptides* *46*, 291–297.
- Janzer, R.C., and Raff, M.C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* *325*, 253–257.
- Jarvis, C.R., and Andrew, R.D. (1988). Correlated electrophysiology and morphology of the ependyma in rat hypothalamus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *8*, 3691–3702.
- Jégou, S., Boutelet, I., and Vaudry, H. (2000). Melanocortin-3 receptor mRNA expression in pro-opiomelanocortin neurones of the rat arcuate nucleus. *J. Neuroendocrinol.* *12*, 501–505.
- Johanson, C.E., Stopa, E.G., and McMillan, P.N. (2011). The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. *Methods Mol. Biol. Clifton Nj* *686*, 101–131.
- Johansson, A., Fredriksson, R., Winnergren, S., Hulting, A.-L., Schiöth, H.B., and Lindblom, J. (2008). The relative impact of chronic food restriction and acute food deprivation on plasma hormone levels and hypothalamic neuropeptide expression. *Peptides* *29*, 1588–1595.
- Jordan, S.D., Könnner, A.C., and Brüning, J.C. (2010). Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci. Cmls* *67*, 3255–3273.
- Juaneda, C., Lafon-Dubourg, P., Ciofi, P., Sarrieau, A., Wenger, T., Tramu, G., and Corio, M. (2001). CCK mRNA expression in neuroendocrine CRH neurons is increased in rats subjected to an immune challenge. *Brain Res.* *901*, 277–280.
- Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J., and Bonvento, G. (1998). Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* *23*, 1–10.
- Kaga, T., Inui, A., Okita, M., Asakawa, A., Ueno, N., Kasuga, M., Fujimiya, M., Nishimura, N., Dobashi, R., Morimoto, Y., et al. (2001). Modest overexpression of neuropeptide Y in the brain leads to obesity after high-sucrose feeding. *Diabetes* *50*, 1206–1210.
- Kale, G., Naren, A.P., Sheth, P., and Rao, R.K. (2003). Tyrosine phosphorylation of occludin attenuates its interactions with ZO-1, ZO-2, and ZO-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *302*, 324–329.
- Kamba, T., Tam, B.Y.Y., Hashizume, H., Haskell, A., Sennino, B., Mancuso, M.R., Norberg, S.M., O'Brien, S.M., Davis, R.B., Gowen, L.C., et al. (2006). VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *290*, H560–576.
- Kameda, Y., Arai, Y., and Nishimaki, T. (2003). Ultrastructural localization of vimentin immunoreactivity and gene expression in tanycytes and their alterations in hamsters kept under different photoperiods. *Cell Tissue Res.* *314*, 251–262.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2001). Chronic central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and Agouti-related protein mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* *50*, 2438–2443.

- Kang, L., Routh, V.H., Kuzhikandathil, E.V., Gaspers, L.D., and Levin, B.E. (2004). Physiological and molecular characteristics of rat hypothalamic ventromedial nucleus glucosensing neurons. *Diabetes* 53, 549–559.
- Kanoski, S.E., Zhang, Y., Zheng, W., and Davidson, T.L. (2010). The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. *J. Alzheimers Dis. Jad* 21, 207–219.
- Karteris, E., Machado, R.J., Chen, J., Zervou, S., Hillhouse, E.W., and Randeva, H.S. (2005). Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E1089–1100.
- Kastin, A.J., and Akerstrom, V. (2001). Glucose and insulin increase the transport of leptin through the blood-brain barrier in normal mice but not in streptozotocin-diabetic mice. *Neuroendocrinology* 73, 237–242.
- Kastin, A.J., and Pan, W. (2000). Dynamic regulation of leptin entry into brain by the blood-brain barrier. *Regul. Pept.* 92, 37–43.
- Kastin, A.J., Pan, W., Maness, L.M., Koletsky, R.J., and Ernsberger, P. (1999). Decreased transport of leptin across the blood-brain barrier in rats lacking the short form of the leptin receptor. *Peptides* 20, 1449–1453.
- Kastin, A.J., Akerstrom, V., and Pan, W. (2002). Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *J. Mol. Neurosci. Mn* 18, 7–14.
- Keep, R.F., and Jones, H.C. (1990). A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 56, 47–53.
- Kieffer, T.J., and Habener, J.F. (2000). The adipoinsular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 278, E1–E14.
- Killian, D.M., and Chikhale, P.J. (2001). Predominant functional activity of the large, neutral amino acid transporter (LAT1) isoform at the cerebrovasculature. *Neurosci. Lett.* 306, 1–4.
- Kim, H., Lee, J.M., Park, J.S., Jo, S.A., Kim, Y.-O., Kim, C.-W., and Jo, I. (2008). Dexamethasone coordinately regulates angiopoietin-1 and VEGF: a mechanism of glucocorticoid-induced stabilization of blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 372, 243–248.
- Kim, H.-K., Shin, M.-S., Youn, B.-S., Namkoong, C., Gil, S.Y., Kang, G.M., Yu, J.H., and Kim, M.-S. (2011). Involvement of progranulin in hypothalamic glucose sensing and feeding regulation. *Endocrinology* 152, 4672–4682.
- Kim, M.-S., Yoon, C.-Y., Park, K.-H., Shin, C.-S., Park, K.-S., Kim, S.-Y., Cho, B.-Y., and Lee, H.-K. (2003). Changes in ghrelin and ghrelin receptor expression according to feeding status. *Neuroreport* 14, 1317–1320.
- Ko, J.-A., Yanai, R., and Nishida, T. (2009). Up-regulation of ZO-1 expression and barrier function in cultured human corneal epithelial cells by substance P. *Febs Lett.* 583, 2148–2153.
- Kohno, D., Suyama, S., and Yada, T. (2008). Leptin transiently antagonizes ghrelin and long-lastingly orexin in regulation of Ca²⁺ signaling in neuropeptide Y neurons of the arcuate nucleus. *World J. Gastroenterol. Wjg* 14, 6347–6354.

- Koizumi, M., Nakanishi, Y., Sato, H., Morinaga, Y., Ido, T., and Kimura, S. (2002). Uptake across the blood-brain barrier and tissue distribution of enterostatin after peripheral administration in rats. *Physiol. Behav.* 77, 5–10.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402, 656–660.
- Kokkotou, E., Jeon, J.Y., Wang, X., Marino, F.E., Carlson, M., Trombly, D.J., and Maratos-Flier, E. (2005). Mice with MCH ablation resist diet-induced obesity through strain-specific mechanisms. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R117–124.
- Kokoeva, M.V., Yin, H., and Flier, J.S. (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310, 679–683.
- Komatsu, R., Matsuyama, T., Namba, M., Watanabe, N., Itoh, H., Kono, N., and Tarui, S. (1989). Glucagonostatic and insulinotropic action of glucagonlike peptide I-(7-36)-amide. *Diabetes* 38, 902–905.
- Könner, A.C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S.D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G.S., et al. (2007). Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab.* 5, 438–449.
- Koranyi, L., Bourey, R.E., James, D., Mueckler, M., Fiedorek, F.T., Jr, and Permutt, M.A. (1991). Glucose transporter gene expression in rat brain: Pretranslational changes associated with chronic insulin-induced hypoglycemia, fasting, and diabetes. *Mol. Cell. Neurosci.* 2, 244–252.
- Kos, K., Harte, A.L., da Silva, N.F., Tonchev, A., Chaldakov, G., James, S., Snead, D.R., Hoggart, B., O'Hare, J.P., McTernan, P.G., et al. (2007). Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1129–1136.
- Kozłowski, G.P., and Coates, P.W. (1985). Ependymoneuronal specializations between LHRH fibers and cells of the cerebroventricular system. *Cell Tissue Res.* 242, 301–311.
- Krisch, B., and Leonhardt, H. (1978). The functional and structural border of the neurohemal region of the median eminence. *Cell Tissue Res.* 192, 327–339.
- Krisch, B., Leonhardt, H., and Buchheim, W. (1978). The functional and structural border between the CSF- and blood-milieu in the circumventricular organs (organum vasculosum laminae terminalis, subfornical organ, area postrema) of the rat. *Cell Tissue Res.* 195, 485–497.
- Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., et al. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72–76.
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Grüters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat. Genet.* 19, 155–157.
- Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Takamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., et al. (2007). Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab.* 6, 55–68.
- Lacquaniti, A., Donato, V., Chirico, V., Buemi, A., and Buemi, M. (2011). Obestatin: an interesting but controversial gut hormone. *Ann. Nutr. Metab.* 59, 193–199.

- Lagaraine, C., Skipor, J., Szczepkowska, A., Dufourny, L., and Thiery, J.-C. (2011). Tight junction proteins vary in the choroid plexus of ewes according to photoperiod. *Brain Res.* *1393*, 44–51.
- Lam, T.K.T., Carpentier, A., Lewis, G.F., van de Werve, G., Fantus, I.G., and Giacca, A. (2003). Mechanisms of the free fatty acid-induced increase in hepatic glucose production. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *284*, E863–873.
- Lam, T.K.T., Gutierrez-Juarez, R., Pocai, A., and Rossetti, L. (2005). Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* *309*, 943–947.
- Langub, M.C., Jr, and Watson, R.E., Jr (1992). Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelia, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology* *130*, 364–372.
- Laque, A., Zhang, Y., Gettys, S., Nguyen, T.-A., Bui, K., Morrison, C.D., and Münzberg, H. (2013). Leptin receptor neurons in the mouse hypothalamus are colocalized with the neuropeptide galanin and mediate anorexigenic leptin action. *J. Cell Biol.* *304*, E999–E1011.
- Larsen, P.J., Tang-Christensen, M., and Jessop, D.S. (1997). Central administration of glucagon-like peptide-1 activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* *138*, 4445–4455.
- Lechan, R.M., and Fekete, C. (2004). Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): mechanisms for the non-thyroidal illness syndrome. *J. Endocrinol. Invest.* *27*, 105–119.
- Lechan, R.M., and Fekete, C. (2005). Role of thyroid hormone deiodination in the hypothalamus. *Thyroid Off. J. Am. Thyroid Assoc.* *15*, 883–897.
- Lechan, R.M., and Fekete, C. (2007). Infundibular tanycytes as modulators of neuroendocrine function: hypothetical role in the regulation of the thyroid and gonadal axis. *Acta Bio-Medica Atenei Parm.* *78 Suppl 1*, 84–98.
- Lee, D.A., Bedont, J.L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., Takiar, V., Charubhumi, V., Balordi, F., Takebayashi, H., et al. (2012). Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat. Neurosci.* *15*, 700–702.
- Lee, Y.-S., Poh, L.K.-S., and Loke, K.-Y. (2002). A novel melanocortin 3 receptor gene (MC3R) mutation associated with severe obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *87*, 1423–1426.
- Légrádi, G., and Lechan, R.M. (1998). The Arcuate Nucleus Is the Major Source for Neuropeptide Y-Innervation of Thyrotropin-Releasing Hormone Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Endocrinology* *139*, 3262–3270.
- Légrádi, G., and Lechan, R.M. (1999). Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* *140*, 3643–3652.
- Levine, A.S., and Morley, J.E. (1984). Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides* *5*, 1025–1029.
- Levoe, A., Dam, J., Ayoub, M.A., Guillaume, J.-L., Couturier, C., Delagrangé, P., and Jockers, R. (2006). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *Embo J.* *25*, 3012–3023.

- Li, A., Cheng, G., Zhu, G.H., and Tarnawski, A.S. (2007). Ghrelin stimulates angiogenesis in human microvascular endothelial cells: Implications beyond GH release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 238–243.
- Lidinsky, W.A., and Drewes, L.R. (1983). Characterization of the blood-brain barrier: protein composition of the capillary endothelial cell membrane. *J. Neurochem.* 41, 1341–1348.
- Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C.J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., et al. (2008). Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 183, 409–417.
- Lin, S., and Huang, X.F. (1997). Fasting increases leptin receptor mRNA expression in lean but not obese (ob/ob) mouse brain. *Neuroreport* 8, 3625–3629.
- Lin, H.V., Plum, L., Ono, H., Gutiérrez-Juárez, R., Shanabrough, M., Borok, E., Horvath, T.L., Rossetti, L., and Accili, D. (2010). Divergent regulation of energy expenditure and hepatic glucose production by insulin receptor in agouti-related protein and POMC neurons. *Diabetes* 59, 337–346.
- Lin, J., Barb, C.R., Matteri, R.L., Kraeling, R.R., Chen, X., Meinersmann, R.J., and Rampacek, G.B. (2000a). Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig. *Domest. Anim. Endocrinol.* 19, 53–61.
- Lin, S., Thomas, T.C., Storlien, L.H., and Huang, X.F. (2000b). Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* 24, 639–646.
- Lin, S., Shi, Y.-C., Yulyaningsih, E., Aljanova, A., Zhang, L., Macia, L., Nguyen, A.D., Lin, E.-J.D., Doring, M.J., Herzog, H., et al. (2009). Critical role of arcuate Y4 receptors and the melanocortin system in pancreatic polypeptide-induced reduction in food intake in mice. *Plos One* 4, e8488.
- Lindahl, P., Johansson, B.R., Levéen, P., and Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* 277, 242–245.
- Ling, E.A., Kaur, C., and Lu, J. (1998). Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplexus cells. *Microsc. Res. Tech.* 41, 43–56.
- Liu, C., Wu, J., and Zou, M.-H. (2012a). Activation of AMP-activated protein kinase alleviates high-glucose-induced dysfunction of brain microvascular endothelial cell tight-junction dynamics. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1213–1221.
- Liu, T., Kong, D., Shah, B.P., Ye, C., Koda, S., Saunders, A., Ding, J.B., Yang, Z., Sabatini, B.L., and Lowell, B.B. (2012b). Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron* 73, 511–522.
- Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F.J., Reaves, T.A., Walsh, S., Pochet, M., and Parkos, C.A. (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 13), 2363–2374.
- Lokmic, Z., Musyoka, J., Hewitson, T.D., and Darby, I.A. (2012). Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 296, 139–185.
- Lopez, N.E., Krzyzaniak, M.J., Blow, C., Putnam, J., Ortiz-Pomales, Y., Hageny, A.-M., Eliceiri, B., Coimbra, R., and Bansal, V. (2012). Ghrelin prevents disruption of the blood-brain barrier after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 29, 385–393.

- Luquet, S., Perez, F.A., Hnasko, T.S., and Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* *310*, 683–685.
- Ma, X., Zubcevic, L., Brüning, J.C., Ashcroft, F.M., and Burdakov, D. (2007). Electrical inhibition of identified anorexigenic POMC neurons by orexin/hypocretin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 1529–1533.
- Ma, Y.J., Hill, D.F., Junier, M.P., Costa, M.E., Felder, S.E., and Ojeda, S.R. (1994). Expression of epidermal growth factor receptor changes in the hypothalamus during the onset of female puberty. *Mol. Cell. Neurosci.* *5*, 246–262.
- Maharaj, A.S.R., Walshe, T.E., Saint-Geniez, M., Venkatesha, S., Maldonado, A.E., Himes, N.C., Matharu, K.S., Karumanchi, S.A., and D'Amore, P.A. (2008). VEGF and TGF-beta are required for the maintenance of the choroid plexus and ependyma. *J. Exp. Med.* *205*, 491–501.
- Mandarino, L.J., Sundarraj, N., Finlayson, J., and Hassell, H.R. (1993). Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp. Eye Res.* *57*, 609–621.
- Margolis, R.U., and Altszuler, N. (1967). Insulin in the cerebrospinal fluid. *Nature* *215*, 1375–1376.
- Marks, J.L., Porte, D., Jr, Stahl, W.L., and Baskin, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* *127*, 3234–3236.
- Marsh, D.J., Weingarth, D.T., Novi, D.E., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Guan, X.-M., Jiang, M.M., Feng, Y., Camacho, R.E., et al. (2002). Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 3240–3245.
- Marty, N., Dallaporta, M., Foretz, M., Emery, M., Tarussio, D., Bady, I., Binnert, C., Beermann, F., and Thorens, B. (2005). Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J. Clin. Invest.* *115*, 3545–3553.
- Del Maschio, A., De Luigi, A., Martin-Padura, I., Brockhaus, M., Bartfai, T., Fruscella, P., Adorini, L., Martino, G., Furlan, R., De Simoni, M.G., et al. (1999). Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J. Exp. Med.* *190*, 1351–1356.
- Matson, C.A., Reid, D.F., Cannon, T.A., and Ritter, R.C. (2000). Cholecystokinin and leptin act synergistically to reduce body weight. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* *278*, R882–890.
- Matsuda, M., Liu, Y., Mahankali, S., Pu, Y., Mahankali, A., Wang, J., DeFronzo, R.A., Fox, P.T., and Gao, J.H. (1999). Altered hypothalamic function in response to glucose ingestion in obese humans. *Diabetes* *48*, 1801–1806.
- Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A., and Balda, M.S. (2005). Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 453–458.
- Mattson, M.P., and Wan, R. (2005). Beneficial effects of intermittent fasting and caloric restriction on the cardiovascular and cerebrovascular systems. *J. Nutr. Biochem.* *16*, 129–137.
- Maul, G.G. (1971). Structure and formation of pores in fenestrated capillaries. *J. Ultrastruct. Res.* *36*, 768–782.

- Mayorov, A.V., Amara, N., Chang, J.Y., Moss, J.A., Hixon, M.S., Ruiz, D.I., Meijler, M.M., Zorrilla, E.P., and Janda, K.D. (2008). Catalytic antibody degradation of ghrelin increases whole-body metabolic rate and reduces refeeding in fasting mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 17487–17492.
- McClellan, K.M., Parker, K.L., and Tobet, S. (2006). Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.* *27*, 193–209.
- McGowan, M.K., Andrews, K.M., and Grossman, S.P. (1992). Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiol. Behav.* *51*, 753–766.
- Van Meeteren, L.A., Goumans, M.-J., and ten Dijke, P. (2011). TGF- β receptor signaling pathways in angiogenesis; emerging targets for anti-angiogenesis therapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* *12*, 2108–2120.
- Meiniel, A. (2007). The secretory ependymal cells of the subcommissural organ: which role in hydrocephalus? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 463–468.
- Melamed, S., Ben-Sira, I., and Ben-Shaul, Y. (1980). Ultrastructure of fenestrations in endothelial choriocapillaries of the rabbit—a freeze-fracturing study. *Br. J. Ophthalmol.* *64*, 537–543.
- Mercer, L.D., and Beart, P.M. (2004). Immunolocalization of CCK1R in rat brain using a new anti-peptide antibody. *Neurosci. Lett.* *359*, 109–113.
- Merchenthaler, I. (1991). Neurons with access to the general circulation in the central nervous system of the rat: a retrograde tracing study with fluoro-gold. *Neuroscience* *44*, 655–662.
- Merl, V., Peters, A., Oltmanns, K.M., Kern, W., Hubold, C., Fehm, H.L., Born, J., and Schultes, B. (2005). Antecedent hypoglycaemia attenuates vascular endothelial growth factor response to subsequent hypoglycaemia in healthy men. *Diabet. Med. J. Br. Diabet. Assoc.* *22*, 1278–1281.
- Mestres, P., and Rascher, K. (1994). The ventricular system of the pigeon brain: a scanning electron microscope study. *J. Anat.* *184 (Pt 1)*, 35–58.
- Migrenne, S., Magnan, C., and Cruciani-Guglielmacci, C. (2007). Fatty acid sensing and nervous control of energy homeostasis. *Diabetes Metab.* *33*, 177–182.
- Millán, C., Martínez, F., Cortés-Campos, C., Lizama, I., Yañez, M.J., Llanos, P., Reinicke, K., Rodríguez, F., Peruzzo, B., Nualart, F., et al. (2010). Glial glucokinase expression in adult and post-natal development of the hypothalamic region. *Asn Neuro* *2*, e00035.
- Mimee, A., Smith, P.M., and Ferguson, A.V. (2013). Circumventricular organs: Targets for integration of circulating fluid and energy balance signals? *Physiol. Behav.*
- Mitchell, S.E., Nogueiras, R., Morris, A., Tovar, S., Grant, C., Cruickshank, M., Rayner, D.V., Dieguez, C., and Williams, L.M. (2009). Leptin receptor gene expression and number in the brain are regulated by leptin level and nutritional status. *J. Physiol.* *587*, 3573–3585.
- Moon, Y.W., Choi, S.H., Yoo, S.B., Lee, J.-H., and Jahng, J.W. (2010). 5-hydroxy-L-tryptophan Suppressed Food Intake in Rats Despite an Increase in the Arcuate NPY Expression. *Exp. Neurobiol.* *19*, 132.
- Moran, T.H., Baldessarini, A.R., Salorio, C.F., Lowery, T., and Schwartz, G.J. (1997). Vagal afferent and efferent contributions to the inhibition of food intake by cholecystokinin. *Am. J. Physiol.* *272*, R1245–1251.
- Morash, B., Li, A., Murphy, P.R., Wilkinson, M., and Ur, E. (1999). Leptin gene expression in the brain and pituitary gland. *Endocrinology* *140*, 5995–5998.

- Morita, S., and Miyata, S. (2013). Accessibility of low-molecular-mass molecules to the median eminence and arcuate hypothalamic nucleus of adult mouse. *Cell Biochem. Funct.*
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1999). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 511–516.
- Morrison, C.D., Xi, X., White, C.L., Ye, J., and Martin, R.J. (2007). Amino acids inhibit *Agrp* gene expression via an mTOR-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *293*, E165–171.
- Mounien, L., Bizet, P., Boutelet, I., Vaudry, H., and Jégou, 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.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., and Cone, R.D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *8*, 1298–1308.
- Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., and Dehouck, B. (2010). Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* *518*, 943–962.
- Münzberg, H., Flier, J.S., and Bjørbaek, C. (2004). Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* *145*, 4880–4889.
- Murakami, T., Felinski, E.A., and Antonetti, D.A. (2009). Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J. Biol. Chem.* *284*, 21036–21046.
- Murphy, M., and Ebling, F.J.P. (2011). The role of hypothalamic tri-iodothyronine availability in seasonal regulation of energy balance and body weight. *J. Thyroid Res.* *2011*, 387562.
- Murphy, B.A., Fakira, K.A., Song, Z., Beuve, A., and Routh, V.H. (2009a). AMP-activated protein kinase and nitric oxide regulate the glucose sensitivity of ventromedial hypothalamic glucose-inhibited neurons. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *297*, C750–758.
- Murphy, B.A., Fioramonti, X., Jochnowitz, N., Fakira, K., Gagen, K., Contie, S., Lorsignol, A., Penicaud, L., Martin, W.J., and Routh, V.H. (2009b). Fasting enhances the response of arcuate neuropeptide Y-glucose-inhibited neurons to decreased extracellular glucose. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *296*, C746–756.
- Nakai, Y. (1971). Fine structure and its functional properties of the ependymal cell in the frog median eminence. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria* *122*, 15–25.
- Nakai, Y., Ochiai, H., and Uchida, M. (1977). Fine structure of ependymal cells in the median eminence of the frog and mouse revealed by freeze-etching. *Cell Tissue Res.* *181*, 311–318.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* *409*, 194–198.
- Neuhaus, J., Risau, W., and Wolburg, H. (1991). Induction of blood-brain barrier characteristics in bovine brain endothelial cells by rat astroglial cells in transfilter coculture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *633*, 578–580.

- Neumeier, M., Weigert, J., Buettner, R., Wanninger, J., Schäffler, A., Müller, A.M., Killian, S., Sauerbruch, S., Schlachetzki, F., Steinbrecher, A., et al. (2007). Detection of adiponectin in cerebrospinal fluid in humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *293*, E965–969.
- Ngarmukos, C., Baur, E.L., and Kumagai, A.K. (2001). Co-localization of GLUT1 and GLUT4 in the blood-brain barrier of the rat ventromedial hypothalamus. *Brain Res.* *900*, 1–8.
- Nguyen, A.D., Mitchell, N.F., Lin, S., Macia, L., Yulyaningsih, E., Baldock, P.A., Enriquez, R.F., Zhang, L., Shi, Y.-C., Zolotukhin, S., et al. (2012). Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *Plos One* *7*, e40191.
- Nico, B., Paola Nicchia, G., Frigeri, A., Corsi, P., Mangieri, D., Ribatti, D., Svelto, M., and Roncali, L. (2004). Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience* *125*, 921–935.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* *161*, 653–660.
- Nogueiras, R., Tovar, S., Mitchell, S.E., Rayner, D.V., Archer, Z.A., Dieguez, C., and Williams, L.M. (2004). Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes* *53*, 2552–2558.
- Norsted, E., Gömüç, B., and Meister, B. (2008). Protein components of the blood-brain barrier (BBB) in the mediobasal hypothalamus. *J. Chem. Neuroanat.* *36*, 107–121.
- Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkanias, G., and Rossetti, L. (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* *51*, 271–275.
- Oishi, K., Zheng, B., and Kuo, J.F. (1990). Inhibition of Na,K-ATPase and sodium pump by protein kinase C regulators sphingosine, lysophosphatidylcholine, and oleic acid. *J. Biol. Chem.* *265*, 70–75.
- Ojeda, S.R., Prevot, V., Heger, S., Lomniczi, A., Dziedzic, B., and Mungenast, A. (2003). The neurobiology of female puberty. *Horm. Res.* *60 Suppl 3*, 15–20.
- Oliver, C., Mical, R.S., and Porter, J.C. (1977). Hypothalamic-pituitary vasculature: evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk. *Endocrinology* *101*, 598–604.
- Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* *278*, 135–138.
- Oomura, Y., Ooyama, H., Sugimori, M., Nakamura, T., and Yamada, Y. (1974). Glucose inhibition of the glucose-sensitive neurone in the rat lateral hypothalamus. *Nature* *247*, 284–286.
- Oomura, Y., Nakamura, T., Sugimori, M., and Yamada, Y. (1975). Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons. *Physiol. Behav.* *14*, 483–486.
- Orellana, J.A., Sáez, P.J., Cortés-Campos, C., Elizondo, R.J., Shoji, K.F., Contreras-Duarte, S., Figueroa, V., Velarde, V., Jiang, J.X., Nualart, F., et al. (2012). Glucose increases intracellular free Ca²⁺ in tanyocytes via ATP released through connexin 43 hemichannels. *Glia* *60*, 53–68.
- Ozaki, T., Mohammad, S., Morioka, E., Takiguchi, S., and Ikeda, M. (2013). Infant satiety depends on transient expression of cholecystinin-1 receptors on ependymal cells lining the third ventricle in mice. *J. Physiol.* *591*, 1295–1312.

- Palkovits, M. (2008). Stress-induced activation of neurons in the ventromedial arcuate nucleus: a blood-brain-CSF interface of the hypothalamus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1148, 57–63.
- Pan, W., Tu, H., and Kastin, A.J. (2006). Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin. *Peptides* 27, 911–916.
- Panksepp, J., and Rossi, J., 3rd (1981). D-glucose infusions into the basal ventromedial hypothalamus and feeding. *Behav. Brain Res.* 3, 381–392.
- Pardridge, W.M., Eisenberg, J., and Yang, J. (1987). Human blood-brain barrier transferrin receptor. *Metabolism.* 36, 892–895.
- Pardridge, W.M., Boado, R.J., and Farrell, C.R. (1990). Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J. Biol. Chem.* 265, 18035–18040.
- Pardridge, W.M., Kang, Y.S., Buciak, J.L., and Yang, J. (1995). Human insulin receptor monoclonal antibody undergoes high affinity binding to human brain capillaries in vitro and rapid transcytosis through the blood-brain barrier in vivo in the primate. *Pharm. Res.* 12, 807–816.
- Park, M., Lin, L., Thomas, S., Braymer, H.D., Smith, P.M., Harrison, D.H.T., and York, D.A. (2004). The F1-ATPase beta-subunit is the putative enterostatin receptor. *Peptides* 25, 2127–2133.
- Park, S., Hong, S.M., Sung, S.R., and Jung, H.K. (2008). Long-term effects of central leptin and resistin on body weight, insulin resistance, and beta-cell function and mass by the modulation of hypothalamic leptin and insulin signaling. *Endocrinology* 149, 445–454.
- Parton, L.E., Ye, C.P., Coppari, R., Enriori, P.J., Choi, B., Zhang, C.-Y., Xu, C., Vianna, C.R., Balthasar, N., Lee, C.E., et al. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature* 449, 228–232.
- Pekala, P., Marlow, M., Heuvelman, D., and Connolly, D. (1990). Regulation of hexose transport in aortic endothelial cells by vascular permeability factor and tumor necrosis factor-alpha, but not by insulin. *J. Biol. Chem.* 265, 18051–18054.
- Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., and Wellman, C.L. (1995). Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp. Neurol.* 131, 229–238.
- Pénicaud, L., Leloup, C., Lorsignol, A., Alquier, T., and Guillod, E. (2002). Brain glucose sensing mechanism and glucose homeostasis. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5, 539–543.
- Pénicaud, L., Leloup, C., Fioramonti, X., Lorsignol, A., and Benani, A. (2006). Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9, 458–462.
- Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P., and Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443, 700–704.
- Pérez-Martín, M., Cifuentes, M., Grondona, J.M., López-Avalos, M.D., Gómez-Pinedo, U., García-Verdugo, J.M., and Fernández-Llebrez, P. (2010). IGF-I stimulates neurogenesis in the hypothalamus of adult rats. *Eur. J. Neurosci.* 31, 1533–1548.
- Peruzzo, B., Pastor, F.E., Blázquez, J.L., Schöbitz, K., Peláez, B., Amat, P., and Rodríguez, E.M. (2000). A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Exp. Brain Res. Exp. Hirnforsch. Experimentation Cérébrale* 132, 10–26.

- Peruzzo, B., Pastor, F.E., Blázquez, J.L., Amat, P., and Rodríguez, E.M. (2004). Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat. *Cell Tissue Res.* *317*, 147–164.
- Peters, A., and Swan, R.C. (1979). The choroid plexus of the mature and aging rat: the choroidal epithelium. *Anat. Rec.* *194*, 325–353.
- Petrov, T., Howarth, A.G., Krukoff, T.L., and Stevenson, B.R. (1994). Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *21*, 235–246.
- Pierce, A.A., and Xu, A.W. (2010). De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 723–730.
- Pilgrim, C. (1978). Transport function of hypothalamic tanycyte ependyma: how good is the evidence? *Neuroscience* *3*, 277–283.
- Pino, R.M. (1986). The cell surface of a restrictive fenestrated endothelium. I. Distribution of lectin-receptor monosaccharides on the choriocapillaris. *Cell Tissue Res.* *243*, 145–155.
- Pinto, S., Roseberry, A.G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., Friedman, J.M., and Horvath, T.L. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* *304*, 110–115.
- Plum, L., Lin, H.V., Aizawa, K.S., Liu, Y., and Accili, D. (2012). InsR/FoxO1 signaling curtails hypothalamic POMC neuron number. *Plos One* *7*, e31487.
- Porte, D., Jr, Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2002). Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr. Rev.* *60*, S20–29; discussion S68–84, 85–87.
- Porter, J.C., Barnea, A., Cramer, O.M., and Parker, C.R., Jr (1978). Hypothalamic peptide and catecholamine secretion: roles for portal and retrograde blood flow in the pituitary stalk in the release of hypothalamic dopamine and pituitary prolactin and LH. *Clin. Obstet. Gynaecol.* *5*, 271–282.
- Prakash, R., Somanath, P.R., El-Remessy, A.B., Kelly-Cobbs, A., Stern, J.E., Dore-Duffy, P., Johnson, M., Fagan, S.C., and Ergul, A. (2012). Enhanced cerebral but not peripheral angiogenesis in the Goto-Kakizaki model of type 2 diabetes involves VEGF and peroxynitrite signaling. *Diabetes* *61*, 1533–1542.
- Preston, J.E., and Segal, M.B. (1992). The uptake of anionic and cationic amino acids by the isolated perfused sheep choroid plexus. *Brain Res.* *581*, 351–355.
- Preston, J.E., Segal, M.B., Walley, G.J., and Zlokovic, B.V. (1989). Neutral amino acid uptake by the isolated perfused sheep choroid plexus. *J. Physiol.* *408*, 31–43.
- Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G.B., and Beauvillain, J.C. (1999). Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience* *94*, 809–819.
- Prevot, V., Bouret, S., Croix, D., Takumi, T., Jennes, L., Mitchell, V., and Beauvillain, J.C. (2000). Evidence that members of the TGFbeta superfamily play a role in regulation of the GnRH neuroendocrine axis: expression of a type I serine-threonine kinase receptor for TGRbeta and activin in GnRH neurones and hypothalamic areas of the female rat. *J. Neuroendocrinol.* *12*, 665–670.
- Prevot, V., Cornea, A., Mungenast, A., Smiley, G., and Ojeda, S.R. (2003). Activation of erbB-1 signaling in tanycytes of the median eminence stimulates transforming growth factor beta1 release via prostaglandin E2 production and induces cell plasticity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *23*, 10622–10632.

- Proescholdt, M.A., Heiss, J.D., Walbridge, S., Mühlhauser, J., Capogrossi, M.C., Oldfield, E.H., and Merrill, M.J. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) modulates vascular permeability and inflammation in rat brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 613–627.
- Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, S.M., Patel, H.R., Berg, A.H., Pajvani, U.B., Scherer, P.E., and Ahima, R.S. (2004). Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat. Med.* 10, 524–529.
- Qian, S., Chen, H., Weingarth, D., Trumbauer, M.E., Novi, D.E., Guan, X., Yu, H., Shen, Z., Feng, Y., Frazier, E., et al. (2002). Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5027–5035.
- Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pellemounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R., and Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 243–247.
- Rao, R. (2009). Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165, 62–68.
- Rao, R.K., Basuroy, S., Rao, V.U., Karnaky Jr, K.J., and Gupta, A. (2002). Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem. J.* 368, 471–481.
- Redzic, Z.B., and Segal, M.B. (2004). The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1695–1716.
- Redzic, Z.B., Preston, J.E., Duncan, J.A., Chodobski, A., and Szmydynger-Chodobska, J. (2005). The choroid plexus-cerebrospinal fluid system: from development to aging. *Curr. Top. Dev. Biol.* 71, 1–52.
- Reese, T.S., and Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34, 207–217.
- Reidelberger, R.D., Kelsey, L., and Heimann, D. (2002). Effects of amylin-related peptides on food intake, meal patterns, and gastric emptying in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 282, R1395–1404.
- Ren, X., Zhou, L., Terwilliger, R., Newton, S.S., and de Araujo, I.E. (2009). Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front. Integr. Neurosci.* 3, 12.
- Réthelyi, M. (1984). Diffusional barrier around the hypothalamic arcuate nucleus in the rat. *Brain Res.* 307, 355–358.
- Riediger, T., Schmid, H.A., Lutz, T., and Simon, E. (2001). Amylin potently activates AP neurons possibly via formation of the excitatory second messenger cGMP. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R1833–1843.
- Riediger, T., Bothe, C., Becskei, C., and Lutz, T.A. (2004). Peptide YY directly inhibits ghrelin-activated neurons of the arcuate nucleus and reverses fasting-induced c-Fos expression. *Neuroendocrinology* 79, 317–326.
- Riediger, T., Eisele, N., Scheel, C., and Lutz, T.A. (2010). Effects of glucagon-like peptide 1 and oxyntomodulin on neuronal activity of ghrelin-sensitive neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298, R1061–1067.
- Risau, W., Gautschi-Sova, P., and Böhlen, P. (1988). Endothelial cell growth factors in embryonic and adult chick brain are related to human acidic fibroblast growth factor. *Embo J.* 7, 959–962.

Robins, S.C., Stewart, I., McNay, D.E., Taylor, V., Giachino, C., Goetz, M., Ninkovic, J., Briancon, N., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., et al. (2013). α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat. Commun.* *4*, 2049.

Rodríguez, A., Gómez-Ambrosi, J., Catalán, V., Gil, M.J., Becerril, S., Sáinz, N., Silva, C., Salvador, J., Colina, I., and Frühbeck, G. (2009). Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int. J. Obes.* *2005* *33*, 541–552.

Rodríguez, E.M., González, C.B., and Delannoy, L. (1979). Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res.* *201*, 377–408.

Rodríguez, E.M., Herrera, H., Peruzzo, B., Rodríguez, S., Hein, S., and Oksche, A. (1986). Light- and electron-microscopic immunocytochemistry and lectin histochemistry of the subcommissural organ: evidence for processing of the secretory material. *Cell Tissue Res.* *243*, 545–559.

Rodríguez, E.M., Blázquez, J.L., Pastor, F.E., Peláez, B., Peña, P., Peruzzo, B., and Amat, P. (2005). Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int. Rev. Cytol.* *247*, 89–164.

Rossi, M., Kim, M.S., Morgan, D.G., Small, C.J., Edwards, C.M., Sunter, D., Abusnana, S., Goldstone, A.P., Russell, S.H., Stanley, S.A., et al. (1998). A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* *139*, 4428–4431.

Rossi, M., Beak, S.A., Choi, S.J., Small, C.J., Morgan, D.G., Ghatei, M.A., Smith, D.M., and Bloom, S.R. (1999). Investigation of the feeding effects of melanin concentrating hormone on food intake—action independent of galanin and the melanocortin receptors. *Brain Res.* *846*, 164–170.

Rostgaard, J., and Qvortrup, K. (1997). Electron Microscopic Demonstrations of Filamentous Molecular Sieve Plugs in Capillary Fenestrae. *Microvasc. Res.* *53*, 1–13.

Saaltink, D.-J., Håvik, B., Verissimo, C.S., Lucassen, P.J., and Vreugdenhil, E. (2012). Doublecortin and doublecortin-like are expressed in overlapping and non-overlapping neuronal cell population: implications for neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* *520*, 2805–2823.

Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4131–4142.

Sánchez, E., Vargas, M.A., Singru, P.S., Pascual, I., Romero, F., Fekete, C., Charli, J.-L., and Lechan, R.M. (2009). Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology* *150*, 2283–2291.

Sánchez-Solana, B., Laborda, J., and Baladrón, V. (2012). Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *26*, 110–127.

Sanders, N.M., Dunn-Meynell, A.A., and Levin, B.E. (2004). Third ventricular alloxan reversibly impairs glucose counterregulatory responses. *Diabetes* *53*, 1230–1236.

Sandoval, D.A., Bagnol, D., Woods, S.C., D'Alessio, D.A., and Seeley, R.J. (2008). Arcuate glucagon-like peptide 1 receptors regulate glucose homeostasis but not food intake. *Diabetes* *57*, 2046–2054.

Satake, S., Kuzuya, M., Miura, H., Asai, T., Ramos, M.A., Muraguchi, M., Ohmoto, Y., and Iguchi, A. (1998). Up-regulation of vascular endothelial growth factor in response to glucose deprivation. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *90*, 161–168.

- Savontaus, E., Conwell, I.M., and Wardlaw, S.L. (2002). Effects of adrenalectomy on AGRP, POMC, NPY and CART gene expression in the basal hypothalamus of fed and fasted rats. *Brain Res.* 958, 130–138.
- Schmidley, J.W., and Wissig, S.L. (1986). Anionic sites on the luminal surface of fenestrated and continuous capillaries of the CNS. *Brain Res.* 363, 265–271.
- Schreibelt, G., Kooij, G., Reijerkerk, A., van Doorn, R., Gringhuis, S.I., van der Pol, S., Weksler, B.B., Romero, I.A., Couraud, P.-O., Piontek, J., et al. (2007). Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *Faseb J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 3666–3676.
- Schulman, J.L., CARLETON, J.L., WHITNEY, G., and WHITEHORN, J.C. (1957). Effect of glucagon on food intake and body weight in man. *J. Appl. Physiol.* 11, 419–421.
- Schulz, M., and Engelhardt, B. (2005). The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2, 8.
- Schwartz, M.W., Figlewicz, D.F., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Greenwood, M.R., and Porte, D., Jr (1990). Insulin binding to brain capillaries is reduced in genetically obese, hyperinsulinemic Zucker rats. *Peptides* 11, 467–472.
- Schwartz, M.W., Sipols, A.J., Marks, J.L., Sanacora, G., White, J.D., Scheurink, A., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Woods, S.C., and Figlewicz, D.P. (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130, 3608–3616.
- Scott, D.E., and Sladek, J.R., Jr (1981). Age related changes in the endocrine hypothalamus: I. Tanycytes and the blood-brain-cerebrospinal fluid barrier. *Neurobiol. Aging* 2, 89–94.
- Scott, D.E., Dudley, G.K., and Knigge, K.M. (1974). The ventricular system in neuroendocrine mechanisms. II. In vivo Monoamine transport by ependyma of the median eminence. *Cell Tissue Res.* 154, 1–16.
- Segal, M.B. (2001). Transport of nutrients across the choroid plexus. *Microsc. Res. Tech.* 52, 38–48.
- De Seranno, S., Estrella, C., Loyens, A., Cornea, A., Ojeda, S.R., Beauvillain, J.-C., and Prevot, V. (2004). Vascular endothelial cells promote acute plasticity in ependymogial cells of the neuroendocrine brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 10353–10363.
- Severi, I., Carradori, M.R., Lorenzi, T., Amici, A., Cinti, S., and Giordano, A. (2012). Constitutive expression of ciliary neurotrophic factor in mouse hypothalamus. *J. Anat.* 220, 622–631.
- Shaver, S.W., Pang, J.J., Wainman, D.S., Wall, K.M., and Gross, P.M. (1992). Morphology and function of capillary networks in subregions of the rat tuber cinereum. *Cell Tissue Res.* 267, 437–448.
- Shearer, K.D., Stoney, P.N., Nanesco, S.E., Helfer, G., Barrett, P., Ross, A.W., Morgan, P.J., and McCaffery, P. (2012). Photoperiodic expression of two RALDH enzymes and the regulation of cell proliferation by retinoic acid in the rat hypothalamus. *J. Neurochem.* 122, 789–799.
- Sheth, B., Fesenko, I., Collins, J.E., Moran, B., Wild, A.E., Anderson, J.M., and Fleming, T.P. (1997). Tight junction assembly during mouse blastocyst formation is regulated by late expression of ZO-1 alpha+ isoform. *Dev. Camb. Engl.* 124, 2027–2037.
- Shin, K., Fogg, V.C., and Margolis, B. (2006). Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 207–235.

Shughrue, P.J., Lane, M.V., and Merchenthaler, I. (1996). Glucagon-like peptide-1 receptor (GLP1-R) mRNA in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 137, 5159–5162.

Sidibe, A., Mullier, A., Chen, P., Baroncini, M., Boutin, J.A., Delagrangue, P., Prevot, V., and Jockers, R. (2010). Expression of the orphan GPR50 protein in rodent and human dorsomedial hypothalamus, tanycytes and median eminence. *J. Pineal Res.* 48, 263–269.

Silver, I.A., and Erecińska, M. (1998). Glucose-induced intracellular ion changes in sugar-sensitive hypothalamic neurons. *J. Neurophysiol.* 79, 1733–1745.

Silverman, A.J., and Knigge, K.M. (1972). Transport capacity of median eminence. II. Thyroxine transport. *Neuroendocrinology* 10, 71–82.

Silverman, A.J., Knigge, K.M., and Peck, W.A. (1972). Transport capacity of median eminence. I. Amino acid transport. *Neuroendocrinology* 9, 123–132.

Simionescu, M., Simionescu, N., Silbert, J.E., and Palade, G.E. (1981). Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. II. Partial characterization of their anionic sites. *J. Cell Biol.* 90, 614–621.

Simionescu, M., Simionescu, N., and Palade, G.E. (1982). Differentiated microdomains on the luminal surface of capillary endothelium: distribution of lectin receptors. *J. Cell Biol.* 94, 406–413.

Simionescu, M., Ghinea, N., Fixman, A., Lasser, M., Kukes, L., Simionescu, N., and Palade, G.E. (1988). The cerebral microvasculature of the rat: structure and luminal surface properties during early development. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 20, 243–261.

Simon, D.B., Lu, Y., Choate, K.A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., et al. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285, 103–106.

Sinclair, E.M., and Drucker, D.J. (2005). Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential. *Physiol. Bethesda Md* 20, 357–365.

Smeltzer, M., Scott, K., Melhorn, S., Krause, E., and Sakai, R. (2012). Amylin blunts hyperphagia and reduces weight and fat gain during recovery in socially stressed rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 303, R676–682.

Smith, G.M., and Shine, H.D. (1992). Immunofluorescent labeling of tight junctions in the rat brain and spinal cord. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 10, 387–392.

Smith, G.P., Jerome, C., Cushin, B.J., Eterno, R., and Simansky, K.J. (1981). Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science* 213, 1036–1037.

Sobue, K., Yamamoto, N., Yoneda, K., Hodgson, M.E., Yamashiro, K., Tsuruoka, N., Tsuda, T., Katsuya, H., Miura, Y., Asai, K., et al. (1999). Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci. Res.* 35, 155–164.

Sone, H., Deo, B.K., and Kumagai, A.K. (2000). Enhancement of glucose transport by vascular endothelial growth factor in retinal endothelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 1876–1884.

Song, Z., and Routh, V.H. (2005). Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 54, 15–22.

- Spranger, J., Verma, S., Göhring, I., Bobbert, T., Seifert, J., Sindler, A.L., Pfeiffer, A., Hileman, S.M., Tschöp, M., and Banks, W.A. (2006). Adiponectin does not cross the blood-brain barrier but modifies cytokine expression of brain endothelial cells. *Diabetes* 55, 141–147.
- Staddon, J.M., Herrenknecht, K., Smales, C., and Rubin, L.L. (1995). Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 2), 609–619.
- Stan, R.V. (2007). Endothelial stomatal and fenestral diaphragms in normal vessels and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 621–643.
- Stan, R.V., Tkachenko, E., and Niesman, I.R. (2004). PV1 is a key structural component for the formation of the stomatal and fenestral diaphragms. *Mol. Biol. Cell* 15, 3615–3630.
- Stein, I., Neeman, M., Shweiki, D., Itin, A., and Keshet, E. (1995). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5363–5368.
- Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307–312.
- Sternson, S.M., Shepherd, G.M.G., and Friedman, J.M. (2005). Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat. Neurosci.* 8, 1356–1363.
- Stewart, P.A., and Hayakawa, K. (1994). Early ultrastructural changes in blood-brain barrier vessels of the rat embryo. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 78, 25–34.
- Stoll, J., Wadhvani, K.C., and Smith, Q.R. (1993). Identification of the cationic amino acid transporter (System γ^+) of the rat blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 60, 1956–1959.
- Strazielle, N., and Ghersi-Egea, J.F. (2000). Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 561–574.
- Strickland, L.A., Jubb, A.M., Hongo, J.-A., Zhong, F., Burwick, J., Fu, L., Frantz, G.D., and Koeppen, H. (2005). Plasmalemmal vesicle-associated protein (PLVAP) is expressed by tumour endothelium and is upregulated by vascular endothelial growth factor-A (VEGF). *J. Pathol.* 206, 466–475.
- Stuart, R.O., and Nigam, S.K. (1995). Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 6072–6076.
- Taguchi, T., Ohtsuka, A., and Murakami, T. (1998). Light and electron microscopic detection of anionic sites in the rat choroid plexus. *Arch. Histol. Cytol.* 61, 243–252.
- Takenaga, Y., Takagi, N., Murotomi, K., Tanonaka, K., and Takeo, S. (2009). Inhibition of Src activity decreases tyrosine phosphorylation of occludin in brain capillaries and attenuates increase in permeability of the blood-brain barrier after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1099–1108.
- Talanti, S., and Kivalo, E. (1961). The infundibular recess in the brain of *Camelus dromedarius* with particular reference to its neurosecretory pathways into the third ventricle. *Experientia* 17, 470–471.
- Taylor, K., Lester, E., Hudson, B., and Ritter, S. (2007). Hypothalamic and hindbrain NPY, AGRP and NE increase consummatory feeding responses. *Physiol. Behav.* 90, 744–750.
- Textor, B., Sator-Schmitt, M., Richter, K.H., Angel, P., and Schorpp-Kistner, M. (2006). c-Jun and JunB are essential for hypoglycemia-mediated VEGF induction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1091, 310–318.

- Thompson, N.M., Gill, D.A.S., Davies, R., Loveridge, N., Houston, P.A., Robinson, I.C.A.F., and Wells, T. (2004). Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* *145*, 234–242.
- Thomzig, A., Wenzel, M., Karschin, C., Eaton, M.J., Skatchkov, S.N., Karschin, A., and Veh, R.W. (2001). Kir6.1 is the principal pore-forming subunit of astrocyte but not neuronal plasma membrane K-ATP channels. *Mol. Cell. Neurosci.* *18*, 671–690.
- Thomzig, A., Laube, G., Prüss, H., and Veh, R.W. (2005). Pore-forming subunits of K-ATP channels, Kir6.1 and Kir6.2, display prominent differences in regional and cellular distribution in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* *484*, 313–330.
- Thürauf, N., Dermietzel, R., and Kalweit, P. (1983). Surface charges associated with fenestrated brain capillaries. I. In vitro labeling of anionic sites. *J. Ultrastruct. Res.* *84*, 103–110.
- Tilling, T., Korte, D., Hoheisel, D., and Galla, H.J. (1998). Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J. Neurochem.* *71*, 1151–1157.
- Tinoco, A.B., Nisembaum, L.G., Isorna, E., Delgado, M.J., and de Pedro, N. (2012). Leptins and leptin receptor expression in the goldfish (*Carassius auratus*). Regulation by food intake and fasting/overfeeding conditions. *Peptides* *34*, 329–335.
- Tissir, F., Qu, Y., Montcouquiol, M., Zhou, L., Komatsu, K., Shi, D., Fujimori, T., Labeau, J., Tyteca, D., Courtoy, P., et al. (2010). Lack of cadherins Celsr2 and Celsr3 impairs ependymal ciliogenesis, leading to fatal hydrocephalus. *Nat. Neurosci.* *13*, 700–707.
- Tome, D. (2004). Protein, amino acids and the control of food intake. *Br. J. Nutr.* *92*, S27–S30.
- Tomita, S., Ueno, M., Sakamoto, M., Kitahama, Y., Ueki, M., Maekawa, N., Sakamoto, H., Gassmann, M., Kageyama, R., Ueda, N., et al. (2003). Defective brain development in mice lacking the Hif-1alpha gene in neural cells. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6739–6749.
- Tong, Q., Ye, C., McCrimmon, R.J., Dhillon, H., Choi, B., Kramer, M.D., Yu, J., Yang, Z., Christiansen, L.M., Lee, C.E., et al. (2007). Synaptic glutamate release by ventromedial hypothalamic neurons is part of the neurocircuitry that prevents hypoglycemia. *Cell Metab.* *5*, 383–393.
- Van den Top, M., Lee, K., Whyment, A.D., Blanks, A.M., and Spanswick, D. (2004). Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat. Neurosci.* *7*, 493–494.
- Tovar, S., Nogueiras, R., Tung, L.Y.C., Castañeda, T.R., Vázquez, M.J., Morris, A., Williams, L.M., Dickson, S.L., and Diéguez, C. (2005). Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* *153*, R1–5.
- Traebert, M., Riediger, T., Whitebread, S., Scharrer, E., and Schmid, H.A. (2002). Ghrelin acts on leptin-responsive neurones in the rat arcuate nucleus. *J. Neuroendocrinol.* *14*, 580–586.
- Tran, N.D., Correale, J., Schreiber, S.S., and Fisher, M. (1999). Transforming growth factor-beta mediates astrocyte-specific regulation of brain endothelial anticoagulant factors. *Stroke J. Cereb. Circ.* *30*, 1671–1678.
- Tschöp, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* *407*, 908–913.
- Tsukita, S., and Furuse, M. (2000a). Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J. Cell Biol.* *149*, 13–16.

- Tsukita, S., and Furuse, M. (2000b). The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *915*, 129–135.
- Tu, H.M., Kim, S.W., Salvatore, D., Bartha, T., Legradi, G., Larsen, P.R., and Lechan, R.M. (1997). Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* *138*, 3359–3368.
- Tyler, N.K., and Burns, M.S. (1991). Comparison of lectin reactivity in the vessel beds of the rat eye. *Curr. Eye Res.* *10*, 801–810.
- Uemura, A., Ogawa, M., Hirashima, M., Fujiwara, T., Koyama, S., Takagi, H., Honda, Y., Wiegand, S.J., Yancopoulos, G.D., and Nishikawa, S.-I. (2002). Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *J. Clin. Invest.* *110*, 1619–1628.
- Ugrumov, M.V., and Mitskevich, M.S. (1980). The adsorptive and transport capacity of tanycytes during the perinatal period of the rat. *Cell Tissue Res.* *211*, 493–501.
- Urayama, A., and Banks, W.A. (2008). Starvation and triglycerides reverse the obesity-induced impairment of insulin transport at the blood-brain barrier. *Endocrinology* *149*, 3592–3597.
- Vázquez, M.J., González, C.R., Varela, L., Lage, R., Tovar, S., Sangiao-Alvarellos, S., Williams, L.M., Vidal-Puig, A., Nogueiras, R., López, M., et al. (2008). Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology* *149*, 4534–4543.
- Vio, K., Rodríguez, S., Yulis, C.R., Oliver, C., and Rodríguez, E.M. (2008). The subcommissural organ of the rat secretes Reissner's fiber glycoproteins and CSF-soluble proteins reaching the internal and external CSF compartments. *Cerebrospinal Fluid Res.* *5*, 3.
- Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S., Jr, and Lowell, B.B. (2011). Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron* *71*, 142–154.
- Wagner, H.J., and Pilgrim, C. (1974). Extracellular and transcellular transport of horseradish peroxidase (HRP) through the hypothalamic tanycyte ependyma. *Cell Tissue Res.* *152*, 477–491.
- Van de Wall, E., Leshan, R., Xu, A.W., Balthasar, N., Coppari, R., Liu, S.M., Jo, Y.H., MacKenzie, R.G., Allison, D.B., Dun, N.J., et al. (2008). Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* *149*, 1773–1785.
- Wang, Q.-P., Guan, J.-L., Pan, W., Kastin, A.J., and Shioda, S. (2008). A diffusion barrier between the area postrema and nucleus tractus solitarius. *Neurochem. Res.* *33*, 2035–2043.
- Wang, R., Cruciani-Guglielmacci, C., Migrenne, S., Magnan, C., Cotero, V.E., and Routh, V.H. (2006). Effects of oleic acid on distinct populations of neurons in the hypothalamic arcuate nucleus are dependent on extracellular glucose levels. *J. Neurophysiol.* *95*, 1491–1498.
- Weissman, T.A., Riquelme, P.A., Ivic, L., Flint, A.C., and Kriegstein, A.R. (2004). Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron* *43*, 647–661.
- Wierup, N., Richards, W.G., Bannon, A.W., Kuhar, M.J., Ahrén, B., and Sundler, F. (2005). CART knock out mice have impaired insulin secretion and glucose intolerance, altered beta cell morphology and increased body weight. *Regul. Pept.* *129*, 203–211.
- Wiesinger, H., Hamprecht, B., and Dringen, R. (1997). Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia* *21*, 22–34.

- Van Wijk, D.C., Roubos, E.W. (2009). Neurochemistry and plasticity of the median eminence and neural pituitary lobe in relation to background adaptation of *Xenopus laevis*. *Ann N Y Acad Sci.* 1163, 524-7
- Willie, J.T., Chemelli, R.M., Sinton, C.M., and Yanagisawa, M. (2001). To eat or to sleep? Orexin in the regulation of feeding and wakefulness. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 429–458.
- Wolburg, H., and Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* 38, 323–337.
- Wolburg, H., and Paulus, W. (2010). Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 75–88.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniessel, U., Krauss, B., Schmid, E.M., Ocalan, M., Farrell, C., and Risau, W. (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J. Cell Sci.* 107 (Pt 5), 1347–1357.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Liebner, S., and Engelhardt, B. (2001). Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci. Lett.* 307, 77–80.
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., and Fallier-Becker, P. (2009). Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* 335, 75–96.
- Woods, S.C., Stein, L.J., McKay, L.D., and Porte, D., Jr (1984). Suppression of food intake by intravenous nutrients and insulin in the baboon. *Am. J. Physiol.* 247, R393–401.
- Wyrwicka, W., and Dobrzecka, C. (1960). Relationship between feeding and satiation centers of the hypothalamus. *Science* 132, 805–806.
- Xu, A.W., Kaelin, C.B., Morton, G.J., Ogimoto, K., Stanhope, K., Graham, J., Baskin, D.G., Havel, P., Schwartz, M.W., and Barsh, G.S. (2005a). Effects of hypothalamic neurodegeneration on energy balance. *Plos Biol.* 3, e415.
- Xu, B., Goulding, E.H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R.D., Jones, K.R., Tecott, L.H., and Reichardt, L.F. (2003). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat. Neurosci.* 6, 736–742.
- Xu, X., Jhun, B.S., Ha, C.H., and Jin, Z.-G. (2008). Molecular mechanisms of ghrelin-mediated endothelial nitric oxide synthase activation. *Endocrinology* 149, 4183–4192.
- Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M., and Ide, C. (2005b). Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp. Neurol.* 192, 251–264.
- Yang, X.J., Kow, L.M., Funabashi, T., and Mobbs, C.V. (1999). Hypothalamic glucose sensor: similarities to and differences from pancreatic beta-cell mechanisms. *Diabetes* 48, 1763–1772.
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., and Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.* 5, 1066–1070.
- Yeh, W.-L., Lin, C.-J., and Fu, W.-M. (2008). Enhancement of glucose transporter expression of brain endothelial cells by vascular endothelial growth factor derived from glioma exposed to hypoxia. *Mol. Pharmacol.* 73, 170–177.

- Yeo, G.S.H., Lank, E.J., Farooqi, I.S., Keogh, J., Challis, B.G., and O'Rahilly, S. (2003). Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum. Mol. Genet.* *12*, 561–574.
- Young, A.A. (2012). Brainstem sensing of meal-related signals in energy homeostasis. *Neuropharmacology* *63*, 31–45.
- Yu, A.S., Hirayama, B.A., Timbol, G., Liu, J., Diez-Sampedro, A., Kepe, V., Satyamurthy, N., Huang, S.-C., Wright, E.M., and Barrio, J.R. (2013). Regional distribution of SGLT activity in rat brain in vivo. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *304*, C240–247.
- Zeltser, L.M., Seeley, R.J., and Tschöp, M.H. (2012). Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance. *Nat. Neurosci.* *15*, 1336–1342.
- Zhang, H., Zhang, G., Gonzalez, F.J., Park, S.-M., and Cai, D. (2011). Hypoxia-inducible factor directs POMC gene to mediate hypothalamic glucose sensing and energy balance regulation. *Plos Biol.* *9*, e1001112.
- Zhang, J.V., Ren, P.-G., Avsian-Kretchmer, O., Luo, C.-W., Rauch, R., Klein, C., and Hsueh, A.J.W. (2005). Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* *310*, 996–999.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* *372*, 425–432.
- Zigman, J.M., Jones, J.E., Lee, C.E., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (2006). Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* *494*, 528–548.
- Zlokovic, B.V., Jovanovic, S., Miao, W., Samara, S., Verma, S., and Farrell, C.L. (2000). Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology* *141*, 1434–1441.
- Del Zoppo, G.J., Milner, R., Mabuchi, T., Hung, S., Wang, X., and Koziol, J.A. (2006). Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 1261–1266.

Flipping the tanycyte switch: how circulating signals gain direct access to the metabolic brain

Prévot V, Langlet E, Dehouck B.

Aging. 2013

Flipping the tanycyte switch: how circulating signals gain direct access to the metabolic brain**Vincent Prevot, Fanny Langlet, and Benedicte Dehouck**

The survival of an organism relies on its ability to promptly, effectively and reproducibly communicate with brain networks that control food intake and energy homeostasis [1, 2]. Although the access of most circulating factors to the brain requires transcellular transport across the blood-brain barrier, certain hypothalamic areas that play a critical role in the control of appetite and body weight, such as the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH), might require direct access to peripheral homeostatic signals by a privileged route that bypasses brain barriers. The question as to whether such a route exists and can be modulated to meet physiological demands in response to changes in feeding status is largely unexplored, and represents an issue central to our understanding of the mechanisms controlling energy balance and metabolism [3]. In a recent study, we have established a new physiological concept in the regulation of energy homeostasis by showing that the nutritional status of an individual modulates the permeability of discrete blood-hypothalamus barriers to circulating metabolic signals, permitting them to directly access a subset of ARH neurons [4].

Many metabolic activities are coordinated by neurons of the ARH [1, 2]. This regulation is primarily mediated by the balance between anorexigenic neurons expressing proopiomelanocortin (POMC) and orexigenic neurons expressing neuropeptide Y (NPY) and Agouti-related protein (AgRP). For example, under fasting conditions, decreased systemic levels of nutrients (e.g. glucose) and changes in related hormone levels (e.g. decreased leptin and increased ghrelin) act to activate NPY/AgRP neurons and inhibit POMC neurons in the hypothalamus. This leads to a marked anabolic state within the hypothalamus that translates into a potent stimulus for the animal to seek and ingest food. The ARH lies adjacent to the median eminence, which contains a blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier (see Figure 1) composed of tanycytes, specialized hypothalamic glia that line the floor of the third ventricle and extend processes to contact a specialized capillary plexus [4]. The endothelial cells of this median eminence capillary plexus are unique in

being fenestrated and their permeability allows for the passive and rapid extravasation of the majority of nutrients and metabolic hormones circulating in the pituitary portal blood (i.e., with molecular sizes below 20 kDa) [5]. However, the restriction of this capillary fenestration to the median eminence [4] together with the occurrence of tight junction complexes between adjacent tanycytes that act as a physical barrier [4], sequesters these molecules within the median eminence and prevents their diffusion to the rest of the brain via the CSF in animals fed *ad libitum* [4] (Figure 1). In contrast, in fasting mice, dips in blood glucose levels, likely perceived by tanycytes themselves thanks to their glucosensing properties [6], trigger VEGFA expression in these cells, and VEGF accumulation in the median eminence acts on endothelial VEGFR2 to promote the fenestration of capillary loops that reach the ARH [4]. In consequence, some target neurons in the ventromedial ARH are no longer insulated by the blood-brain and blood-CSF barriers but become directly exposed to peripheral metabolic signals, a process that is aided by the sealing of the paracellular space between the parenchyma and the CSF by the reorganization of the tight junction complexes of tanycytes that contact these newly permeable microvessel loops (Figure 1) [4]. This situation is reversed upon refeeding. The increased accessibility of the ARH during fasting is confirmed both by the leakage of intravenously injected dye into the ventromedial ARH [4] and by the increased binding of blood-borne fluorescently-labeled ghrelin, an orexigenic hormone, to NPY/AgRP neurons [5], a phenomenon associated with a hyperphagic response upon refeeding [4]. Together, these findings suggest that VEGF-mediated structural changes at the brain-hypothalamic barrier, by modulating the access of blood-borne metabolic substrates to the ARH, play an important role in the adaptive response to fasting.

The median eminence is not the only brain region to exhibit this kind of gliovascular organization [7]. For example, both fenestrated capillaries and neurons capable of sensing metabolic signals are found in the brainstem region containing the area postrema. Whether nutritional status modulates the plasticity of blood-CSF

barriers in this or other regions needs to be determined in future studies. Similarly, the pathophysiological implications of this reorganization of endothelial fenestration/tight junction complexes also remain to be explored. For instance, are these fasting-induced blood-hypothalamic barrier changes altered in animal models of diet-induced hormone resistance? Is VEGF-A signaling involved in the control of physiological and/or high-fat-diet-induced neurogenic activity in hypothalamic

lamic tanycytes [6]? Is the attenuated response to fasting in aged animals [8] associated with altered vascular/glial reorganization in the median eminence? And finally, could this VEGF-dependent brain-hypothalamus barrier plasticity hold therapeutic potential for treating dysfunctions of the neuroendocrine control of energy homeostasis in hormone-resistant individuals [8]? The piecing together of these and other parts of the metabolic puzzle promises to be quite exciting!

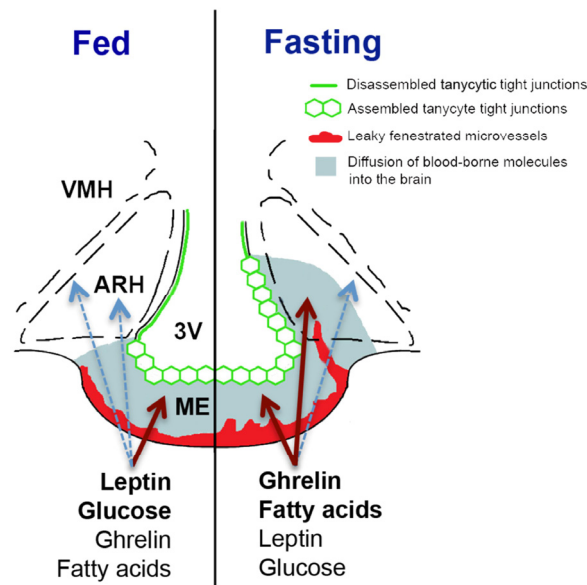


Figure 1. Schematic diagram illustrating structural differences between the median eminence and ARH of mice fed *ad libitum* and fasting mice, and their effects on the diffusion of blood-borne signals into the brain. The arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH) lies lateral to the third ventricle (3V) and immediately dorsolateral to the median eminence (ME). In mice fed normally (left half of the figure), the fenestrated blood vessels of the ME permit the local diffusion of macromolecules from the circulation, while vessels in the ARH proper exhibit blood-brain barrier properties that block this diffusion (not shown). Hence, circulating metabolic signals whose levels are high in the fed state (e.g., leptin and glucose) require BBB transport to access ARH neurons. Under these conditions, tight junctions (green) between tanycytes line the ventricular wall of the ME, preventing the diffusion of circulating factors into the 3V and CSF. During fasting or energy restriction (right half of the figure), the levels of hormones such as ghrelin rise, along with products of lipolysis (e.g., fatty acids), while leptin and glucose levels fall. Concomitantly, some ME vessels extending into the ARH become fenestrated, while the tight junction barrier along the 3V extends dorsally. These changes allow the freer diffusion of circulating signals that indicate energy restriction to ARH cells, including AgRP/NPY neurons that lie in the ventromedial ARH, while preventing the access of these substances to the rest of the brain through the CSF. The focal plasticity of this dual-faceted blood-hypothalamus barrier thus enhances the orexigenic/anabolic response to energy deficits.

Vincent Prevot, Fanny Langlet, and Benedicte Dehouck
Laboratory of Development and Plasticity of the Postnatal Brain, Jean-Pierre Aubert Research Centre (JPARC), Inserm U837, University of Lille 2, Lille, 59000, France
 Email: vincent.prevot@inserm.fr

Received: 4/22/13; Published: 5/11/13

REFERENCES

1. Myers MG Jr and Olson DP. *Nature*. 2012; 491:357-363.
2. Williams KW and Elmquist JK. *Nat Neurosci*. 2012; 15:1350-1355.
3. Myers MG Jr. *Cell Metab*. 2013; 17:467-468.
4. Langlet F, Levin BE, Luquet S. et al. *Cell Metab*. 2013; 17:607-617.
5. Schaeffer M, Langlet F, Lafont C. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110:1512-1517.
6. Bolborea M and Dale N. *Trends Neurosci*. 2013; 36:91-100.
7. Langlet F, Mullier A, Bouret SG. et al. *J Comp Neurol*. 2013; DOI: 10.1002/cne.23355.
8. Carrascosa JM, Ros M, Andres A. et al. *Exp Gerontol*. 2009; 44:20-25.

Melanin-concentrating hormone regulates beat frequency of ependymal cilia and ventricular volume

Conductier G, Brau F, Viola A, Langlet F, Ramkumar N, Dehouck B, Lemaire T, Chapot R, Lucas L, Rovère C, Maitre P, Hosseiny S, Petit-Paitel A, Adamantidis A, Lakaye B, Risold PY, Prévot V, Meste O, Nahon JL, Guyon A.

Nat Neurosci. 2013

Ghrelin: central and peripheral implications in anorexia nervosa

Méquinion M, Langlet F, Zgheib S, Dickson S, Dehouck B, Chauveau C, Viltart O.

Front Endocrinol. 2013

1 **Ghrelin: Central and Peripheral Implications in Anorexia**
2 **Nervosa**

3 Mathieu Méquinion¹, Fanny Langlet¹, Sara Zgheib², Suzanne Dickson³,
4 Bénédicte Dehouck^{1,4}, Christophe Chauveau^{2*}, Odile Viltart^{1,5*†}

5 ¹UMR INSERM 837, Development and Plasticity of Postnatal Brain, Lille, France;

6 ²Pathophysiology of inflammatory of bone diseases, EA 4490, Université Lille Nord de

7 France - Lille 2 - ULCO, Boulogne sur Mer, France; ⁴Institute of Neuroscience and

8 Physiology, Department of Physiology/Endocrinology, The Sahlgrenska Academy, University

9 of Gothenburg, Gothenburg, Sweden; ⁴Université Lille Nord de France- Université d'Artois,

10 Liévin; ⁵Université Lille Nord de France-USTL (Lille 1), Villeneuve d'Ascq, France

11 **REVIEW**

12 ***Running title:*** Ghrelin and chronic food restriction

13 ***Key-words:*** ghrelin, anorexia, food intake, energy balance, central alterations, peripheral
14 alterations, reward, animal models

15
16
17 * the authors contributed equally to the writing of the paper

18 **† Correspondence:**

19 Dr. Odile Viltart

20 Development and Plasticity of the Postnatal Brain, Team 2, Jean-Pierre Aubert Research
21 Center, UMR INSERM 837, Bât Biserte, 1 place de Verdun, 59045 Lille cedex, France

22 odile.viltart@univ-lille1.fr

23

23 **FIGURES AND TABLES**

24 Table 1: Metabolic states and food restriction

25 Table 2: Addiction disorder criteria

26 Table 3: Compared levels of neuropeptides regulating food intake in AN patients and healthy
27 matched population

28 Table 4: Compared levels of hormones regulating food intake in AN patients and healthy
29 matched population

30 Table 5: Compared levels of bone turnover markers regulating food intake in AN patients and
31 healthy matched population

32 Table 6: Compared levels of other factors altered in AN patients

33 Figure 1: Biosynthesis of ghrelin

34 Figure 2: Action of ghrelin in the brain

35 Figure 3: Homeostatic brain vs hedonic non-homeostatic brain

36 Figure 4: Access of ghrelin signal to its neuronal targets

37

38 **Cross reference with another chapter of this issue:**

39 **Actions of agonists and antagonists of the ghrelin/GHS-R pathway on GH secretion,**
40 **appetite and c-Fos activity** By Rim Hassouna, Alexandra Labarthe, Philippe Zizzari,
41 Catherine Videau, Michael Culler, Jacques Epelbaum and Virginie Tolle

42

42 **ABSTRACT:**

43 Increasing clinical and therapeutic interest in the neurobiology of eating disorders reflects
44 their dramatic impact on health. Chronic food restriction resulting in severe weight loss is a
45 major symptom described in restrictive anorexia nervosa (AN) patients, and they also suffer
46 from metabolic disturbances, infertility, osteopenia and osteoporosis. Restrictive AN, mostly
47 observed in young women, is the third largest cause of chronic illness in teenagers of
48 industrialized countries. From a neurobiological perspective, AN-linked behaviours can be
49 considered an adaptation that permits the endurance of reduced energy supply, involving
50 central and/or peripheral reprogramming. The severe weight loss observed in AN patients is
51 accompanied by significant changes in hormones involved in energy balance, feeding
52 behaviour and bone formation, all of which can be replicated in animals models. Increasing
53 evidence suggests that AN could be an addictive behaviour disorder, potentially linking
54 defects in the reward mechanism with suppressed food intake, heightened physical activity
55 and mood disorder. Surprisingly, the plasma levels of ghrelin, an orexigenic hormone that
56 drives food-motivated behaviour, are increased. This increase in plasma ghrelin levels seems
57 paradoxical in light of the restrained eating adopted by AN patients, and may rather result
58 from an adaptation to the disease. The aim of this review is to describe the role played by
59 ghrelin in AN focusing on its central vs peripheral actions. In AN patients and in rodent AN
60 models, chronic food restriction induces profound alterations in the « ghrelin » signalling that
61 leads to the development of inappropriate behaviours like hyperactivity or addiction to food
62 starvation and therefore a greater depletion in energy reserves. The question of a transient
63 insensitivity to ghrelin and/or a potential metabolic reprogramming is discussed in regard of
64 new clinical treatments currently investigated.

65

66

66 Introduction

67 Feeding is a behaviour that ensures an adequate and varied supply of nutritional substrates
68 essential to maintain energy levels for basal metabolism, physical activity, growth and
69 reproduction and hence, for survival of every living organism on Earth. In the case of
70 mammals, that must maintain a stable body temperature, the maintainance of a high metabolic
71 rate requires constant availability of a sufficient amount of energy stores. The tight balance
72 between energy demand and expenditure is fine-tuned by an adapted dialog between
73 homeostatic and hedonic brain systems that are regulated by peripheral signals involved in
74 feeding behaviour and energy homeostasis. Mechanisms for feeding control remain a current
75 and crucial scientific subject for understanding the etiology and potential therapeutic
76 approaches for the treatment of food intake disorders that include obesity, on one hand, and
77 severe forms of anorexia nervosa (AN) on the other.

78 Voluntary anorexia is a disease not unique to man and has even been described in many
79 vertebrate species that favour migration activity (Wang *et al.*, 2006). In this case, surviving
80 food deprivation involves an adaptation of metabolism, such that internal energy stores
81 available at the onset of fasting are used to maintain basal metabolism and physical activity.
82 The biochemical and physiological adaptations that result from a lack of food help to preserve
83 physiological function in order to maintain behaviours like food-seeking or predator
84 avoidance and also, to resume all metabolic processes necessary when food becomes
85 available. However, absolute or long term food deprivation observed in nature or in restrictive
86 AN proceeds in stages in which the individual/organism tries to adapt its metabolism to
87 energy costs but that culminates in death, due to exhaustion of energy stores. As clearly
88 described by Wang *et al.* (2006), the different stages progress from fasting to starvation, but
89 *“The demarcation between these two states is rarely appreciated, perhaps owing to lack of*
90 *definition. In humans, fasting often refers to abstinence from food, whereas starvation is used*
91 *for a state of extreme hunger resulting from a prolonged lack of essential nutrients. In other*
92 *words, starving is a state in which an animal, having depleted energy stores, normally would*
93 *feed to continue normal physiological processes”*. Briefly, three metabolic phases are
94 described during food deprivation (Wang *et al.*, 2006) where energy metabolic adaptations
95 occur to allow supply of fuel in the different parts of the organism, especially the brain (see
96 Table 1). In regard to these metabolic stages, the transition from fasting to starvation occurs
97 by the end of phase II or the beginning of phase III. Thus, voluntary anorexia as seen in
98 restrictive AN should correspond to phases I and II.

99 Restrictive AN is a feeding behaviour disorder for which severe chronic food restriction
100 causes dramatic physiological and psychological effects that are detrimental for health. AN is
101 most prevalent in women aged of 25 years old or younger (whose BMI reaches values largely
102 below 18.5 kg/m²) and is currently the third largest cause of chronic illness in teenagers
103 (Lucas *et al.*, 1991). The prevalence of AN has drastically increased within recent decades. It
104 leads to central and/or peripheral reprogramming that permits the individual/organism to
105 endure a reduced energy supply. These drastic conditions not only induce severe weight loss
106 and metabolic disturbance, but also infertility, osteopenia and osteoporosis. Moreover, AN is
107 increasingly recognised as an addictive behaviour disorder. *-Indeed, many of its common
108 primary characteristics – food obsession coupled with food restriction, weight loss,
109 heightened physical activity and the strong association with mood disorder (such as anxiety or
110 depression), strongly suggest a potential alteration of the central (dopaminergic) reward
111 system.

112 AN patients exhibit significant changes in the release of key hormones involved in energy
113 balance and feeding control (Hasan and Hasan, 2011). For example, the plasma levels of
114 ghrelin, an orexigenic hormone mostly released from the empty stomach, are increased in AN
115 patients along all the day (Germain *et al.*, 2009, 2010). This hormone acts centrally to
116 increase food intake (Wren *et al.*, 2001a,b) and food-motivated behaviour (Skibicka *et al.*,
117 2012), but has also been suggested to be required for the maintenance of blood glucose
118 homeostasis during severe calorie restriction (Zhao *et al.*, 2010). The increases in plasma
119 ghrelin levels in AN seem paradoxical in light of the restrained eating adopted by these
120 patients and suggest an adaptive response to the disease. In regard to the metabolic
121 deficiencies occurring in restrictive AN (see *infra*), the aim of this review is to highlight the
122 impact of ghrelin in the adaptation of the organism to chronic food restriction until it falls into
123 exhaustion and death. A better understanding of the role of this gastric hormone in
124 dysfunctional AN-like feeding behaviour is important when evaluating its therapeutic
125 potential for the treatment of AN, envisaged to be used alongside mainstay psychiatric and
126 nutritional therapies.

127 **1. Physiological alterations in anorexia nervosa**

128 *1.1. Types and subtypes of Anorexia nervosa: new DSM-V classification*

129 Chronic food restriction is linked to several disorders classified in DSM-V (Diagnostic and
130 Statistical Manual of Mental Disorders). In the provisional version of DSM-V (of spring
131 2012; <http://www.dsm5.org/meetus/pages/eatingdisorders.aspx>), the *Feeding and Eating*
132 *Disorders* category includes three disorders as manifested by persistent failure to meet
133 appropriate nutritional and/or energy needs and significant weight loss, *AN*,
134 *avoidant/restrictive food intake disorder (ARFIDO)*, and *atypical AN*.

135 Diagnostic criteria for AN includes the restriction of energy intake relative to requirements, a
136 drastic significant loss of body weight, an intense fear of gaining weight, body image
137 disturbance and/or a persistent lack of recognition of the seriousness of the current low body
138 weight. In a recent review (Garcia *et al.*, 2011), the lifetime prevalence of AN was estimated
139 to be 1.9% in female adults to 2.6% in female adolescents in industrialized countries. In the
140 binge-eating/purging subtype, the individual engages in recurrent episodes of binge eating or
141 purging behaviour while such episodes do not occur in the restricting subtype. Patients from
142 these two subtypes also exhibit differences in eating disorder symptom indicators (Olatunji *et*
143 *al.*, 2012). However, the subtype determination at the time of the diagnosis should be
144 considered carefully since, over a 7-year period, the majority of women with AN were found
145 to cross over to the restricting and binge eating/purging AN subtypes (Eddy *et al.*, 2008). In a
146 21-year follow-up study, Löwe *et al.* (2001) showed that 16% of AN patients deceased due to
147 consequences of their illness: about 50% died because of somatic complications leading to
148 heart attack and the remainder committed suicide. Moreover, mortality is significantly more
149 common among inpatients with somatic comorbidity (like renal, cardiac, bone and digestive
150 pathologies) than among inpatients without a somatic disease (Erdur *et al.*, 2012). Finally,
151 among the psychiatric comorbidities, AN is often associated with depression, anxiety,
152 obsessive compulsive or personality disorders and drug abuse (Erdur *et al.*, 2012). Whether
153 AN resembles an addiction behaviour disorder remains one major question for physicians and
154 researchers alike. The criteria proposed by Goodman (1990) to identify addictive disorder
155 (Table 2) are found in AN patients. Indeed, Speranza *et al.* (2012) showed that 35% of the
156 restrictive AN subtype patients, 48% of the binge eating/purging AN subtype patients and
157 60% of the patients have substance-use disorders and hence, exhibit an addictive disorder

158 according to Goodman's criteria. From these criteria, an emerging hypothesis of AN
159 implicates neurobiological mechanisms (and hence, investigation strategies for treatments and
160 diagnostic markers) that are based on a reward deficit and on the recognition as an addictive
161 behaviour disorder (Alguacil *et al.*, 2011). In fact, among the different theories linking AN
162 and addiction, interestingly, the "auto-addiction opioid model" proposes that this chronic
163 eating disorder could represent an addiction to the body's endogenous opioids, especially β -
164 endorphins (see Davis and Claridge, 1998). Starvation and excessive exercise, that concern a
165 high percentage of AN patients (Davis *et al.*, 1997; Kohl *et al.*, 2004), are associated with
166 increased levels of β -endorphin, known to further stimulate dopamine in the mesolimbic
167 reward centers (Bergh and Södersten, 1996; Casper, 1998). This mesolimbic pathway plays a
168 pivotal role in addictive behaviours related to drugs and dietary behaviours (Avena and
169 Bocarsly, 2011; Perelló et Zigman, 2012). Importantly, this mesolimbic dopamine pathway is
170 activated by ghrelin (Jerlhag *et al.*, 2006; Abizaid *et al.*, 2006) (see *infra*) and, since AN
171 patients have high plasma ghrelin levels (Germain *et al.*, 2009, 2010), it follows that there
172 may be a dysfunctional ghrelin-(dopamine) reward signal in these patients. However, as
173 discussed by Barbarich-Marsteller *et al.* (2011), there are fundamental differences between
174 AN and addiction. Indeed, the main goal of an individual suffering from a substance abuse
175 disorder is to pursue the immediate effects of the drug on mood and/or behaviour (alleviation
176 of anxiety, for example), whereas the goals of an AN patient are both immediate and long-
177 term. In these patients, dieting and starvation produce immediate feelings of hunger that may
178 induce a sense of control over one's body and thereby a sense of control over one's life while,
179 in the long-term, it produces sustained weight loss and thinness that take on an irrationally
180 important value.

181 In the *Avoidant/Restrictive Food Intake DisOrder* (ARFIDO), insufficient food intake is
182 associated with significant weight loss, nutritional deficiency, dependence on enteral feeding
183 or nutritional supplements and/or a marked psychosocial dysfunction. In these patients, the
184 eating disturbance does not occur exclusively during the course of AN, and is not associated
185 with body image disturbances. ARFIDO is a new recognized eating disorder previously
186 classified in the left over category *Eating Disorder Not Otherwise Specified* (EDNOS)
187 corresponding to the majority of in-and-out patients treated for eating disorders. Its
188 prevalence remains to be determined.

189 The last disorder, *atypical AN*, is in the EDNOS category. It includes all the criteria for AN
190 diagnosis except that, despite significant weight loss, the individual's weight is within or
191 above the normal range. The lifetime prevalence of atypical AN ranges from 2.4% in female
192 adults to 7.7% in female adolescents (Garcia *et al.*, 2011).

193 Considering this recent classification, in this review we focus on restrictive AN in which the
194 individual is subjected to chronic food restriction that may or may not be associated with
195 intense physical exercise. In fact, the course of AN is extremely variable, with approximately
196 50%- 60% of individuals recovering, 20%-30% partially recovering, and 10%-20% remain
197 chronically ill (Fisher, 2003 ; Löwe *et al.*, 2001). The unknown etiology of AN renders this
198 complex psychiatric disease difficult to treat and current pharmacological treatments have
199 little efficacy during the acute phase of illness or in preventing relapse (Barbarich-Marsteller,
200 2007). However, the physiological alterations induced by severe chronic food restriction
201 impact on peripheral compartments (fat, bone, reproductive axis, energy balance) and on
202 central pathways (reward, food intake, mood regulation, *etc.*) for which the outcome is
203 usually similar whatever the initial cause (personal history, infancy trauma, socio-cultural
204 pressures, personality traits, neurobiological, genetic background, *etc.*). Some authors even

205 support the view that the physiological mechanisms involved in the regulation of feeding
206 behaviour in AN might, in many neurobiological effects, parallel those of obesity. As recently
207 suggested by Jacquemont *et al.* (2011): “*abnormal eating behaviours, such as hyperphagia*
208 *and anorexia, could represent opposite pathological manifestations of a common energy-*
209 *balance mechanism, although the precise relationships between these mirror phenotypes*
210 *remain to be determined*”. Thus, the development of effective/new pharmacological
211 treatments for this disease area would be enhanced if the mechanisms maintaining the
212 abnormal behaviours characteristic of AN are better understood.

213 *1.2. Central and peripheral alterations in anorexia nervosa*

214 Whatever the initial and causal factors leading to AN, all patients display similar energy
215 metabolic deficits and are unable to adapt their feeding behaviour to energy demand and
216 costs. In this state, survival requires the development of physiological changes that drive the
217 individual/animal to adapt itself to these drastic conditions. Among all of the variations
218 induced by chronic food restriction, the endocrine, immune, bone, and metabolic changes first
219 allow adaptations to starvation, and are subsequently often directly involved in the
220 complications of the disease (Estour *et al.*, 2010). In addition, some of the feeding-regulatory
221 factors are also involved directly (or not) in the modulation of reward-related and
222 motivational processes, as well as in cognition and emotions associated with the disease. It
223 should be noted that some of these endocrine changes persist after recovery and might
224 contribute to susceptibility for AN recurrence (Lawson and Klibanski, 2008).

225 Among the biological factors whose levels are altered in AN patients, neurotransmitters and
226 neuropeptides regulating appetite and feeding may contribute to some of the occurring central
227 perturbations (Table 3). Overall, a high degree of heterogeneity has been observed between
228 studies, for most of the assayed factors (plasma and cerebrospinal fluid samples). This
229 heterogeneity could be explained by differences in the clinical characteristics of the samples
230 (as severity and duration of the illness or subtype) and/or the increasing reliability of the
231 methods used to ascertain factor concentrations over the last two decades. Consequentially, it
232 is impossible to link any tendency in changes of levels and/or sensitivity to (an)orexigenic
233 factors to AN, necessitating further investigation.

234 Systemic hormones directly regulating food intake have been widely studied in AN patients
235 (Table 4). However, some anorexigenic hormones such as leptin decrease while others, such
236 as peptide YY₃₋₃₆ (PYY₃₋₃₆), increase. The same pattern is also observed for the orexigenic
237 hormone, ghrelin (see *infra*). There exists sparse and contradictory data about the
238 anorexigenic factors cholecystokinin (CKK) and glucagon-like peptide 1 (GLP1) in relation
239 to this disease area rendering, it difficult to interpret observed variations in the context of AN.
240 Concerning PYY₃₋₃₆, most studies reported increased levels; although an anorexigenic
241 peptide, this increase is difficult to explain as PYY₃₋₃₆ is normally released in response to food
242 intake. On the contrary, around 50 studies relate a very low leptin blood level in AN patients
243 compared to a healthy matched control population (Table 4). This endogenous signal of
244 energy stores is positively correlated to body mass index. Leptin is considered to be a good
245 predictor of growth hormone (GH) burst, cortisol, estradiol and thyroid hormone levels and its
246 receptor is widely distributed throughout the body suggesting a pivotal role in mediating the
247 hormonal adaptation to chronic starvation. Furthermore, AN patients display high plasma
248 levels of adiponectin, another adipose-derived circulating cytokine. This anorexigenic
249 hormone plays an important role in energy homeostasis and insulin sensitivity. The high
250 levels of adiponectin in AN might contribute to the higher insulin sensitivity found in these

251 patients. Indeed, insulin levels are usually strongly decreased that could be related to the
252 hypoglycaemia observed in AN patients.

253 More than 90% of adult women with AN are osteopenic, and almost 40% are osteoporotic at
254 one or more sites (Grinspoon *et al.*, 2000). Osteopenia and osteoporosis are frequent
255 consequences of AN, that very often persist after weight gain. Moreover, as synthesized by
256 Confavreux *et al.* (2009), “bone can now be considered as a true endocrine organ secreting
257 osteocalcin, a hormone pharmacologically active on glucose and fat metabolism. Indeed
258 osteocalcin stimulates insulin secretion and β -cell proliferation. Simultaneously, osteocalcin
259 acts on adipocytes to induce adiponectin, which secondarily reduce insulin resistance”. For
260 these reasons, studies comparing bone turnover markers in AN patients with healthy control
261 are presented in Table 5. Anorectic patients display increased levels of bone resorption
262 markers and decreased bone formation markers. We may conclude that the bone mass
263 alteration in patients with AN is dual: an increase of resorption and a decrease of bone
264 formation. Moreover, the decrease in osteocalcin level could also contribute to the
265 hypoinsulinemia and hyperadiponectinemia usually described.

266 A number of other endocrine disturbances have also been described in AN patients (Table 6).
267 Hypothalamic-pituitary-adrenal axis deregulation is commonly suggested in AN. Indeed, AN
268 is characterized by hypercortisolemia (Table 6) and, as mentioned by Miller *et al.* (2011):
269 “overnight blood cortisol levels are inversely associated with bone mineral density and
270 positively associated with severity of depression and anxiety symptoms in women with
271 anorexia nervosa (Lawson *et al.*, 2009). Therefore, hypercortisolemia may also contribute to
272 the severe bone loss incurred and the highly prevalent psychiatric comorbidities in women
273 with anorexia nervosa”. Hypothalamic amenorrhea is another characteristic feature of AN,
274 and has been attributed to a state of severe energy deficit from restricted energy intake,
275 increased energy expenditure or both. Women and adolescent girls with AN have lower levels
276 of estradiol, luteinizing hormone (LH), and for some of them follicle stimulating hormone
277 (FSH) (Table 6). The low levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and insulin may also
278 contribute to this hypogonadal state and impact on bone turnover. The GH/IGF-1 axis is also
279 altered in most of the studies (Table 6). Indeed, AN is associated with a nutritionally acquired
280 hepatic resistance to GH with decreased production of IGF-1 and increased GH levels. Such
281 an increase is due to a reduced feedback at the level of the pituitary and hypothalamus from
282 low IGF-1 levels, and high levels of ghrelin (Table 4, see *infra*). Most studies report low
283 levels of T3 and/or T4 thyroid hormones in patients with AN (Table 6). T3 and T4 plasma
284 levels are enhanced by leptin administration in women with AN, and the levels of these three
285 hormones are positively associated (Haas *et al.*, 2005; Misra *et al.*, 2005a). Moreover, ghrelin
286 is known to inhibit the release of pituitary thyroid stimulating hormone (Wren *et al.*, 2000),
287 and studies indicate negative correlations between ghrelin and thyroid hormones plasma
288 levels in AN (Misra *et al.*, 2005c). These data suggest that low leptin and high ghrelin levels
289 may contribute to lower thyroid hormone levels in AN. Finally, inflammatory cytokines were
290 assayed in AN patients and matched healthy controls (Corcos *et al.*, 2003). Data did not show
291 significant variations suggesting that AN might not have an inflammatory component.

292 *1.3. Animal models of chronic food restriction: a way to decipher the physiological* 293 *mechanisms of anorexia nervosa*

294 The use of appropriate animal models mimicking most of the physiological changes occurring
295 in AN might help to determine more precisely the potential mechanisms, central and/or
296 peripheral, involved in the early adaptive state that precedes exhaustion of the

297 individual/animal. However, developing and using animal models of psychiatric disorders is
298 inherently difficult due to the complex nature of these illnesses. In the literature, numerous
299 models of genetic deficient mice for one or multiple genes involved in the regulation of
300 feeding behaviour/reward/energy balance have been developed (for review see Kim, 2012;
301 Siegfried *et al.*, 2003). These genetic models give essential mechanistic data related to one
302 specific pathway but do not completely mirror the symptoms observed in human disease
303 (Willner, 1984; Smith, 1989). Indeed, the use of more “environmental models” that mimic
304 most of the physiological symptoms of AN are preferred as they provide insight regarding
305 how the disease might progress towards exhaustion. Initially, the most widely used animal
306 model, whatever the species, is the chronic food restriction model (for review see Kim, 2012).
307 However, it does not take into account several conditions observed in AN patients that are
308 self-starvation, hyperactivity and chronic stress. The rat model of self-starvation developed by
309 Routtenberg and Kuznesof (1967) consists in housing one rat in a cage equipped with a
310 running wheel and submitting the animal to a food restriction (1 h-feeding per day). This
311 model later coined the term “the activity-based anorexia (ABA) model”. It produces a rapid
312 decrease in body weight and food intake, hyperactivity, hypothermia, loss of estrus and an
313 increase in HPA axis activity (Hall et Hanford, 1954; Routtenberg and Kuznesof, 1967;
314 Burden *et al.*, 1993). Moreover, in this model, the rats eat less than inactive rats fed with the
315 same schedule, and can even starve themselves to death. In the ABA model, the long-term
316 exposure (few days) to low leptin and high ghrelin levels, induced a tissue-specific
317 expression pattern of ghrelin and leptin receptors (Pardo *et al.*, 2010). Furthermore,
318 Verhagen *et al.* (2011) found that plasma ghrelin levels are highly associated with food
319 anticipatory behaviour, measured by running wheel activity in rats. This effect is
320 dependent of the central ghrelin signaling system *via* GHS-R1A. In many aspects this model
321 mimics numerous physiological alterations observed in AN. However, as specified by
322 Klenotich and Dulawa (2012), the ABA paradigm is strongly dependent upon factors that
323 amplify or reduce some parts of the phenotype, i.e. the choice of rodent strain (more or less
324 resistant to ABA, Gelegen *et al.*, 2007), the sex of animal (female are more vulnerable to
325 ABA), the age (younger animals are more susceptible to ABA), the temperature (increasing
326 the temperature to 32°C strongly reduces the ABA behaviour, Cerrato *et al.*, 2012), the time
327 of the day the animals receive food and the hydration/dryness of the food. In fact, Boakes and
328 Juraskova (2001; Boakes, 2007) demonstrated that the “self-starvation” observed in ABA rats
329 might reflect both the reduced palatability of the dry chow for a dehydrated animal and satiety
330 signals from a stomach full of water. Thus, giving hydrated food during the 1h-feeding
331 schedule completely abolishes the ABA phenotype (rapid weight loss, hyperactivity, *etc.*).
332 Currently, we are developing an adaptation of the ABA model in female mice that aims to
333 follow the long term (more than 2 weeks) physiological alterations induced by a combination
334 of physical activity and 50% food restriction. Our recent results, involving a 2-week protocol,
335 indicate that our selected ABA model induces a rapid and stable loss of weight, changes the
336 circadian locomotor activity, alters energy balance (corresponding to the passage from phase I
337 to phase II; Table 1), induces hypoglycaemia, hypoleptinemia, hyperghrelinemia and a central
338 alteration in the hypothalamic feeding centers (Méquinion, personal data). Thus, the
339 combination of exercise (in running wheels) and food deprivation following a certain
340 schedule might be considered as two important chronic stress factors that could reinforce the
341 weight loss by modifying feeding behaviour, as observed in our study. Other models based on
342 chronic stress that are associated with food deprivation use tail pinching, cold swimming
343 (Shimizu *et al.*, 1989, Wong *et al.*, 1993) or separation. We choose this last model, named
344 “Separation-Based Anorexia” (SBA) to study the impact of chronic stress associated with
345 caloric insufficiency. In our protocol, 8-week old female mice are separated and fed with a
346 time-restricted food access for up to 10 weeks. Our recent results showed a 20-25% body

347 weight loss with a cumulative food intake just under that of the control group. Moreover,
348 SBA mice displayed reduced lean, fat and bone masses associated with hypoleptinemia and
349 alteration in GH/IGF-1 axis. Finally, an alteration of the oestrous cycle was also observed
350 (Zgheib, personal data).

351 To date, these described “environmental animal models” (ABA and SBA) remain the only
352 models that enable long term studies of how chronic food restriction impacts upon physiology
353 at different levels (energy balance, reproduction, bone/fat regulation, *etc.*), and of the
354 mechanisms responsible for the sustenance of these alterations on different tissues often not
355 available on patients (brain, bones, fat, muscle, liver, *etc.*). They will also facilitate
356 determination of whether the dramatic outcome of the patients might be related to a specific
357 dysregulation of one or many biological factors that can be considered as a marker of the
358 disease and potentially also in its evolution. In addition, ABA and SBA models exhibit good
359 face validity for most of the physiological symptoms of AN.

360 **2. Ghrelin a key energy balance hormone: role in anorexia nervosa**

361 *2.1. Origin and biosynthesis of ghrelin*

362 Ghrelin is a 28 amino acid, initially isolated from rat stomach (Kojima *et al.*, 1999). The
363 preproghrelin messenger RNA (mRNA) is mainly expressed in the X/A-like oxyntic gland
364 cells of the gastric fundus mucosa equivalent to P/D1 cells in humans (Bordi, 2000). Ghrelin
365 is also produced in other parts of the gastrointestinal tract, and it is expressed at lower levels
366 in pancreas, kidney, testis, placenta and bone (Gnanapavan *et al.*, 2002; Gonzales *et al.*, 2008)
367 and hypothalamic neurones (Cowley *et al.*, 2003). The 117 amino acid preproghrelin is
368 processed by cleavage and results in two peptides (Figure 1): obestatin and proghrelin (Jeffery
369 *et al.*, 2005). Des-acyl ghrelin is then cleaved from the 94 amino acid proghrelin precursor by
370 enzymes like the prohormone convertase 1/3 (Zhu *et al.*, 2006). This 28 amino acid peptide is
371 modified post-translationally in the active acylated form of ghrelin, capable to bind to its
372 receptor, the growth hormone secretagogue receptor 1a (GHS-R1a). The octanoylation at the
373 third N-terminal amino acid, usually serine (Kojima *et al.*, 1999), is catalysed the enzyme
374 ghrelin octanoyl-acyltransferase (GOAT, Yang *et al.*, 2008), which is expressed
375 predominantly in the stomach, gut and pancreas, but also at other sites (Kang *et al.*, 2012).
376 Ghrelin concentrations in blood comprise principally des-acyl ghrelin (85%–90%) and in
377 lesser amounts acyl-ghrelin (10%–15%) and C-terminal proghrelin peptides (Pemberton and
378 Richards, 2007).

379 *2.2. Ghrelin receptor and distribution*

380 Ghrelin is the only known ligand to bind to GHS-R1a (Howard *et al.*, 1996, Gutierrez *et al.*,
381 2008). This receptor belongs to the G-protein coupled receptor family (GPCR) (Holst and
382 Schwartz 2006) and has two variants, GHS-R1a and GHS-R1b, which are splice variants of
383 the same gene. Type 1a is the full-length, seven-transmembrane domain receptor, and the type
384 1b isoform is a C-terminally truncated, five-transmembrane domain variant (Kojima *et al.*,
385 1999). Only the GHS-R1a is fully functional, binding mostly with acylated ghrelin on $G\alpha_q$ -
386 protein, whereas the 1b isoform is thought to be physiologically inactive. It should be noted
387 that desacyl-ghrelin does not compete with acyl-ghrelin for GHS-R1a to any significant
388 extent. Indeed, supraphysiological concentrations of desacyl ghrelin are necessary to allow
389 binding and activation of GHS-R1a (Veldhuis and Bowers, 2010; Delhanty *et al.*, 2012).
390 Although derived from the same precursor, obestatin is a cognate ligand for the orphan

391 receptor GPR39, another member of the ghrelin receptor subfamily (McKee *et al.*, 1997;
392 Holst *et al.*, 2004).

393 GHS-R1a is abundantly expressed within the CNS. Notably, a large population of GHS-R1a-
394 expressing neurones are located in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC), which has a
395 crucial role in energy balance control. Other hypothalamic areas expressing this receptor of
396 relevance for feeding control include the ventromedial hypothalamus (VMH), paraventricular
397 nucleus (PVN), anteroventral preoptic nucleus, anterior hypothalamic area, lateral
398 hypothalamic area (LHA), suprachiasmatic nucleus, supraoptic nucleus, and the
399 tuberomammillary nuclei (Guan *et al.*, 1997; Gnanapavan *et al.*, 2002; Camiña 2006; Harrold
400 *et al.*, 2008). Moreover, mRNA studies also demonstrate the presence of this receptor in
401 limbic and mesolimbic structures known to be involved in motor control, emotional reactivity
402 and reward/motivation systems such as the hippocampus (dentate gyrus, CA2 and CA3
403 regions), pars compacta of the substantia nigra, ventral tegmental area (VTA), raphe nuclei,
404 laterodorsal tegmental nucleus (Guan *et al.*, 1997; Zigman *et al.*, 2006) and amygdala
405 (Alvarez-Crespo *et al.*, 2012). In the periphery, GHS-R1a is expressed in different tissues and
406 organs implicated in energy balance, e.g. in the anterior lobe of the pituitary on somatotroph
407 cells (Briggs and Andrews, 2010), pancreas, spleen, stomach, intestine, heart, thyroid, gonads,
408 adrenal, liver, skeletal muscle and adipose tissues (Papotti *et al.*, 2000). The truncated form is
409 also found in various tissues but its exact role is not well known (Gnanapavan *et al.*, 2002;
410 Camina *et al.*, 2006). Interestingly, GHS-R1a is constitutively active even when unstimulated
411 by the afferent ghrelin signal (Petersen *et al.*, 2009). Finally, ghrelin receptors are able to
412 interact with other receptors to form homo- or hetero-dimers, like GHS-R1a/GHS-R1a and
413 GHS-R1a/GHS-R1b (Chow *et al.*, 2012). Co-expression of the truncated variant of ghrelin
414 receptor with the full length variant attenuated the constitutive signalling probably because
415 the translocation of the ghrelin receptor from the plasma membrane to the cell nucleus is
416 decreased (Mokrosiński *et al.*, 2010). GHS-R1a also appears to heterodimerize with other
417 GPCRs, at least in *in vitro* test systems, and can explain the differential ghrelin signalling
418 (review in Schellekens *et al.*, 2010). Heterodimerization of GHS-R1A with the dopamine
419 receptor D2 has recently been shown to occur in mouse hypothalamic neurones that regulate
420 appetite (Kern *et al.*, 2012) Since GHS-R1a acts as an allosteric modulator of D1 and D2
421 signalling, this finding implies a functional role for the expressed GHS-R1a in brain areas that
422 may be less accessible to peripherally produced ghrelin and where there is no local production
423 of ghrelin (Jiang *et al.*, 2006; Kern *et al.*, 2012).

424 2.3. Roles of ghrelin

425 In line with the broad expression of ghrelin and its receptor, this hormone is involved in
426 multiple biological functions, many of which are linked to feeding control. Initially, this gut-
427 brain signal was shown to have direct pituitary GH-releasing effects, reproducing the known
428 effects of the so-called growth hormone secretagogues (GHS). This term refers a group of
429 synthetic GHS-R1a ligands, the first group of which was derived from metenkephalin
430 (described by Bowers *et al.* (1977)) and included the hexapeptide GHRP-6 (Bowers *et al.*,
431 1984) that is now recognised as a synthetic ghrelin mimetic. Both ghrelin and its receptor
432 have been strongly conserved during evolution, supporting the notion that GHS-R1a and its
433 natural ligand play a fundamentally important role in biology (Palyha *et al.*, 2000).

434 Ghrelin's most characterised effects are: (i) its ability to stimulate GH secretion, likely of
435 relevance for glucose homeostasis and energy balance; (ii) its role as an orexigenic hormone
436 acting at key hypothalamic and midbrain circuits involved in feeding control; (iii) its

437 involvement in various other physiological functions like gastrointestinal, cardiovascular,
438 pulmonary and immune function, sleep duration, learning, memory and behaviour, cellular
439 proliferation, immunomodulation, reproduction and bone physiology. Most of these
440 physiological functions are altered in AN indicating a potential role for ghrelin in the
441 pathogenesis of this disease.

442 2.3.1. Role of ghrelin in the regulation of appetite, food intake and energy balance

443 Ghrelin acts at different levels to stimulate GH secretion and thus modulate hepatic IGF-1
444 production (Peino *et al.*, 2000). GHS-R1a is expressed by GHRH arcuate neurones but also
445 by GH cells in the anterior pituitary gland (Kojima *et al.*, 1999). Ghrelin and GHS activate
446 arcuate nucleus cells (Dickson *et al.*, 1993; Hewson and Dickson, 2000) including
447 neuroendocrine cells in this region (Dickson *et al.*, 1996), notably a sub-population of GHRH
448 neurones (Dickson and Luckman, 1997; Osterstock *et al.*, 2011). Indeed, these compounds
449 acts in synergy with GHRH to induce a greater GH release than would be induced by GHRH
450 alone (Bowers *et al.*, 1984; Arvat *et al.*, 2001; Hataya *et al.*, 2001). This ghrelin-stimulated
451 GH release is dose-dependent and could explain why AN patients have elevated circulating
452 GH levels (Kojima and Kangawa, 2005; Misra *et al.*, 2006; Miljic *et al.*, 2006; Germain *et al.*,
453 2007, 2010; Estour *et al.*, 2011). Chronic starvation is associated with GH resistance and
454 relatively low IGF-1 levels involving a feedback mechanism, rather than body composition
455 parameters or other circulating factors, *e.g.* free fatty acid or insulin levels (Stoving *et al.*,
456 1999; Brick *et al.*, 2010). Besides its role in growth, GH stimulates lipolysis through a
457 mechanism independent of IGF-1 (Fazeli *et al.*, 2010), for which the effects are largely
458 anabolic. The increased GH secretion and the reduction of IGF-1 in starvation may be
459 adaptive since they respectively serve the function of mobilizing fat stores in the setting of
460 reduced energy availability and reduce anabolism. However, the reduction of IGF-1 levels
461 may also have deleterious effects, contributing to bone and muscle loss in AN women. Even
462 if the mechanisms underlying the development of GH resistance in states of chronic
463 undernutrition are not as well established, ghrelin might strongly participate to such endocrine
464 dysregulation. Studies conducted in rodents support a close link between ghrelin signaling
465 and altered GH/IGF-1 status. In rodents, fasting induced higher expression of GHS-R1a and
466 overexpression of GHS-R1a in female mice provoked higher expression of GH and GHRH
467 (Veldhuis and Bowers, 2010). Furthermore, suppressed ghrelin signalling (using antisense
468 RNA knockdown against GHS-R1a or a GHS-R1a antagonist, BIM-28163), caused a
469 decrease in GH peak pulsatility with or without a decrease in plasma levels of IGF-1 (Zizzari
470 *et al.*, 2005; Veldhuis and Bowers, 2010). Finally, plasma ghrelin concentration is negatively
471 correlated with body weight and subcutaneous, visceral and total adiposity (reviewed in
472 Veldhuis and Bowers, 2010), probably due to a long-term effect on ghrelin in driving pulsatile
473 GH secretion, which is strongly lipolytic.

474 Ghrelin is perhaps best known as a circulating hunger signal necessary for meal initiation and
475 meal anticipation with a secretion occurring in a pulsatile manner starting with a preprandial
476 rise and postprandial fall one hour after food intake (Ariyasu *et al.*, 2001; Cummings *et al.*,
477 2001; Tschöp *et al.*, 2001; Zizzari *et al.*, 2011; Merkenstein *et al.*, 2012). Moreover, whatever
478 the route of injection, ghrelin increases food intake both in humans and animals (Wren *et al.*,
479 2001a; 2001b). In addition, prolonged food reduction or severe caloric restriction causes an
480 increase in plasma ghrelin concentration (Wren *et al.*, 2001b; Méquinion, personal data). In
481 AN patients, ghrelin levels are increased up to two-fold and return to normal levels after
482 weight restoration (Otto *et al.*, 2001, 2005; Tolle *et al.*, 2003; Germain *et al.*, 2009; Yi *et al.*,
483 2011). However, it appears that fluctuations in ghrelin are not always influenced by food

484 intake in AN (Germain *et al.*, 2009) suggesting impairment in its regulation, probably due to a
485 chronic adaptation to long term food restriction (Yi *et al.*, 2011). Mice lacking the gene for
486 ghrelin or its receptor have normal food intake when fed chow, probably due to compensatory
487 adaptation during embryonic development, but show a degree of protection from obesity
488 when fed a high fat diet, especially from an early age (Sun *et al.*, 2003, 2004; Worley *et al.*,
489 2004, 2005).

490 Ghrelin also appears to be of importance in the regulation of lipid and glucose metabolism. It
491 has been attributed a role in the maintenance of normal blood glucose levels (Grove and
492 Cowley 2005). There are indications that ghrelin's effects on the GH axis may have relevance
493 for glucose homeostasis (and even survival) during chronic food deprivation. Mice lacking
494 acyl-ghrelin (due to knockout of GOAT) lose glycaemic control and become moribund by one
495 week of 60% food deprivation, an effect that can be circumvented by infusion of either acyl-
496 ghrelin or GH throughout this one-week period (Zhao *et al.*, 2010). The work of Sun *et al.*
497 (2008) on ghrelin homeostasis in ghrelin KO and GHS-R KO mice demonstrate that the
498 ghrelin/GHS-R pathway appears to play an important role in glucose homeostasis by
499 regulating insulin sensitivity and glucose sensing, particularly under conditions of negative
500 energy balance. However, data indicating an action of ghrelin on plasma insulin levels are still
501 controversial (Sangiao-Alvarellos and Cordido 2010; Castañeda *et al.*, 2010). Intravenous
502 ghrelin injection leads to a decrease in plasma insulin and an increase in blood glucose
503 (Broglia *et al.*, 2001). This result is not found universally and it may be related to the
504 physiological *vs* pharmacological doses used (Castañeda *et al.*, 2010). Ghrelin could
505 potentially decrease insulin secretion by altering insulin sensitivity (Castañeda *et al.*, 2010).
506 This is in agreement with the results obtained during insulin and glucose tolerance tests
507 performed in AN patients (Harada *et al.*, 2008; Broglia *et al.*, 2004a). Moreover, under
508 chronic food restriction, fatty acids are mobilized and their oxidation could increase the
509 production of octanoic acid, thereafter used to octanoylate desacyl-ghrelin, leading to a global
510 increase of plasma ghrelin levels. Thus, the greater levels of glucose observed in ABA mice
511 (Méquinion, personal data) or wild type mice during the early phases of the chronic food
512 restriction might be driven by this increase in ghrelin. This might contribute to the adaptive
513 state in the first stages of AN, before a depletion of the supply of free fatty acids and
514 induction of ketosis. Ghrelin acts directly on the liver, to favor glycogenolysis but also on
515 muscle and adipose tissues. Indeed, subcutaneous injection of ghrelin in rats induces an
516 increase of hepatic triglycerides associated with an increase in the gene expression of
517 enzymes involved in lipogenesis like acetyl-CoA carboxylase (ACC) and fatty acid synthase
518 (FAS, Barazzoni *et al.*, 2005) as well as increased expression of ACC and FAS mRNA in
519 white visceral adipose tissue (Thompson *et al.*, 2003; Barazzoni *et al.*, 2005). By contrast,
520 subcutaneous ghrelin injection induces a decrease of triglyceride content in muscle without
521 modifying ACC expression and AMPK phosphorylation (Barazzoni *et al.*, 2005). These
522 effects are especially observed in the gastronemius muscle, a fast-twitch muscle that is
523 predominantly glycolytic. Similar variations are observed in the food-restricted condition
524 (Samec *et al.*, 2002). Finally, Pardo *et al.* (2010) describe, in the ABA model, a tissue-specific
525 expression pattern of GHS-R1a receptors in visceral and subcutaneous fat and within the
526 muscle. Indeed, the oxidative-soleus type of muscle appears to be more susceptible to
527 circulating ghrelin levels than the glycolytic-gastronemius type under exercise and food
528 restriction situations. All of these modifications could provide a defense mechanism to
529 maintain energy homeostasis in the unbalanced energy state that is found in AN patients.

530 2.3.2. The central orexigenic effect of ghrelin

531 Appetite, food intake and energy balance are finely tuned by a complex intercommunication
532 between neural networks and peripheral tissues (Figure 2). Within the CNS, various
533 hypothalamic nuclei containing orexigenic and anorexigenic neurones regulate the different
534 facets of food intake. The ARC cells targeted by ghrelin and its mimetics include the
535 orexigenic neuropeptide Y (NPY) cells (Dickson and Luckman, 1997) that co-express another
536 orexigenic peptide, agouti-related peptide (AgRP). Following administration of ghrelin, these
537 neurones are activated, reflected by the induction of Fos-protein in discrete cell groups
538 (Hewson and Dickson, 2000; Wang *et al.*, 2002), by increased action potential firing (Cowley
539 *et al.*, 2003; Andrews *et al.*, 2008) and by an increased expression of NPY and AgRP mRNA
540 (Kamegai *et al.*, 2000; Kamegai *et al.*, 2001; Nakazato *et al.*, 2001). Furthermore, the
541 stimulatory effects of ghrelin on NPY/AgRP neurones are complemented by a reduction of
542 the ARC anorexigenic pro-opiomelanocortin (POMC) neuronal activity *via* inhibitory GABA-
543 ergic inputs from NPY/AgRP neurones (Cowley *et al.*, 2003). Interestingly, sensitivity of the
544 ARC cells to ghrelin appears to be nutritionally regulated as the Fos response was increased
545 up to 3-fold in fasting rats relative to fed animals (Hewson and Dickson, 2000) an effect that
546 was reversed once again upon refeeding (Luckman *et al.*, 1999). Collectively, these data
547 indicate that ghrelin activates a key orexigenic pathway in the hypothalamic ARC, the
548 NPY/AgRP cells and that this response is metabolically regulated. Consistent with this,
549 stimulation of hypothalamic GHS-R1a results in an anabolic response characterized by an
550 increase in food intake (Wren *et al.*, 2000) and a decrease in energy utilization (Tschöp *et al.*,
551 2000). The feeding effects ghrelin appear to require normal NPY/AgRP signalling since
552 ablation of NPY or AgRP neurones or the use of NPY receptor antagonists abolish these
553 effects (Chen *et al.*, 2004; Luquet *et al.*, 2007). Conditional deletion of NPY/AgRP co-
554 expressing neurones in the ARC of adult mice (by targeting the human diphtheria toxin to the
555 AgRP locus) caused a rapid starvation to death (Luquet *et al.*, 2005). Moreover, mice
556 homozygous for the anorexia (*anx*) mutation, characterized by poor food intake and death by
557 three to five weeks after birth (Maltais *et al.*, 1984) display a lower density of hypothalamic
558 neuropeptides. The data of Nilsson *et al.* (2011) support the hypothesis of degeneration of
559 hypothalamic ARC neurone populations; the AgRP system appears to be the first system
560 affected and the POMC system being secondary in this process. Finally, in our models of
561 chronic food restriction (SBA and ABA), we found an alteration of the AgRP signal with an
562 accumulation of this peptide in ARC neurones (Méquinion & Nilsson, personal data). Thus,
563 there are numerous lines of evidence supporting the fact that in chronic food restriction (and
564 probably in AN), a dysregulation of the AgRP system occurs that contributes to deficient
565 ghrelin signaling at the level of the ARC. Recent neuroimaging data obtained from AN
566 patients differing in disease duration showed a significant reduction of total white matter
567 volume and focal gray matter atrophy in various brain areas such as the hypothalamus,
568 especially in patients with shorter food restriction. Collectively, these studies highlight the
569 potential role of endocrine and central (hypothalamic) dysfunction in the altered homeostatic
570 metabolic status in AN, as described in animal models (Boghi *et al.*, 2011).

571 At the hypothalamic level, ghrelin has also been reported to act directly or indirectly on other
572 nuclei linked to feeding control such as the VMH, PVN and LHA (Lopez *et al.*, 2008; Mano-
573 Otagiri *et al.*, 2009; Lamont *et al.*, 2012). Although not coupled to c-fos expression, VMN
574 cells exhibit a robust electrical response following bath application of a ghrelin agonist
575 (Hewson *et al.*, 1999). The elegant study of Lopez *et al.* (2008) showed that, in fasted rats, an
576 elevated ghrelin tone was associated with an increased activation of hypothalamic AMPK and
577 a decreased mRNA expression of enzymes (like FAS) involved in the *de novo* fatty acid
578 biosynthesis only in the VMH. They concluded that the energy peripheral signals sensed to

579 regulate fatty acid metabolism in the hypothalamus and consequently the feeding behaviour,
580 may not be a nutrient, but ghrelin through an action at the level of the VMH.

581 Ghrelin's effects in the PVN are also likely linked to feeding control as direct intra-PVN
582 injection of ghrelin induces a robust feeding response that is coupled to neuronal (c-fos)
583 activation (Olszewski *et al.*, 2003). Consistent with this, a reduction of GHS-R1a gene in the
584 PVN using RNA interference in rats, significantly reduced body weight and blood ghrelin
585 levels without affecting food intake (Shrestha *et al.*, 2009). These data reflect a role for
586 ghrelin in the modulation of PVN neurone activity in that is linked to energy homeostasis, but
587 the mechanisms of action remains to be elucidated.

588 In the LHA, ghrelin is thought to mediate hyperphagia through orexin neurones. Indeed,
589 central administration of ghrelin or a ghrelin mimetic induces Fos expression in orexin-
590 containing, but not melanin-concentrating hormone-containing, neurones (Lawrence *et al.*,
591 2002; Olszewski *et al.*, 2003) and activates glucose responding neurones (Chen *et al.*, 2005a)
592 in this area. Furthermore, ghrelin-induced feeding is suppressed in orexin KO mice (Toshinai
593 *et al.*, 2003). The role of orexin neurones to simulate feeding behaviour (appetite/metabolism)
594 is now well established although they are also especially important for sleep and wakefulness
595 (España and Scammell, 2011; Gao, 2012) and play important roles in the stress response, in
596 analgesia and reward/addiction (see Kukkonen, 2012). Moreover, ghrelin's effects to increase
597 the reward value of a high-fat diet appear to involve a LHA-VTA orexin pathway (Perello *et*
598 *al.*, 2010).

599 The action of ghrelin to increase food intake and associated appetitive behaviours involves an
600 integrated neurobiological response exerted at many levels, not only via the hypothalamus.
601 For example, structures located in the caudal brainstem also express GHS-R1a. In particular,
602 ghrelin receptors are found in all three components of the dorsal vagal complex with a highest
603 expression within the area postrema, a moderately dense signal in the nucleus of the solitary
604 tract and a low density signal in the dorsal motor nucleus of the vagus, (Zigman *et al.*, 2006).
605 Peripheral injection of ghrelin and, prior to its discover, ghrelin mimetics, induces c-Fos
606 induction in the nucleus of the solitary tract and area postrema (Lawrence *et al.*, 2002; Bailey
607 *et al.*, 2000). The effects of ghrelin on food intake/behaviour are similar when injected into
608 the 4th as for the 3rd ventricle, in terms of the amount of food eaten, the number of meals and
609 meal size during the first few hours after treatment (Faulconbridge *et al.*, 2003). The effects of
610 ghrelin in the dorsal vagal complex might be more related to autonomic effects such as on the
611 cardiovascular system. However, since the hypothalamus is strongly connected with the
612 nucleus solitary tract, we cannot exclude an indirect effect of the ghrelin to hypothalamic
613 structures through an activation of brainstem areas, although appears not to include a
614 noradrenergic pathway (Bailey *et al.*, 2000) (see *infra*).

615 2.3.3. Ghrelin and the reward system

616 Besides the homeostatic ghrelin-sensitive pathways, ghrelin also appears to target mesolimbic
617 circuits linked to reward. Hedonic (non-homeostatic) brain pathways are also involved in
618 feeding control and are modulated by circulating energy balance signals such as ghrelin,
619 thereby influencing the evaluation of the pleasure derived from the taste, smell or texture of
620 food. Many regions of the corticolimbic and mesolimbic brain are thus involved in learning,
621 memory, emotion and reward processing associated with food. Among these complex feeding
622 networks (for review see Van Vugt, 2010; Figure 3), the VTA-Acc (dopaminergic) pathway
623 plays a pivotal role in conferring reward from a wide range of reinforcers, from chemical

624 drugs of abuse to natural rewards such as food (Nestler, 1996, Corwin *et al.*, 2011). Using
625 optogenetic techniques, Adamantidis *et al.* (2011) demonstrated that phasic activation
626 dopaminergic VTA neurones is associated with reward-predicting cues and facilitates the
627 development of positive reinforcement during reward-seeking and behavioural flexibility. As
628 reviewed in Carr (2011), burst firing of VTA dopaminergic neurones may operate as a
629 “teaching signal”. For example, in the case of food intake, when rats are presented with a
630 highly palatable food for the first time, this triggers dopamine release in the Acc (shell),
631 whereas repeated exposure to the same palatable food blunts the dopamine response despite
632 avid consumption. Interestingly, food restriction has been described to sustain the Acc (shell)
633 dopamine release in this model. Moreover, simply delivering cues linked previously to the
634 food reward can be sufficient to reinstate the Acc (shell) dopamine response, indicating
635 transference of the dopamine response from the reinforcer to the cue (for review see Volkov
636 *et al.*, (2011). Ghrelin has emerged as one important modulator of the VTA-NAcc
637 (dopaminergic) reward pathway (for review see Skibicka and Dickson, 2011). More than 50
638 % of the dopaminergic VTA neurones express GHS-R (Zigman *et al.*, 2006), although it is
639 also expressed on other cell types in this area (Abizaid *et al.*, 2006). Whether administered
640 peripherally, into the brain ventricles or into the VTA, ghrelin administration triggers a robust
641 Acc dopamine response (Jerlhag *et al.*, 2006; 2007; Abizaid *et al.*, 2006) that is accompanied
642 by an increased feeding response in rodents (Naleid *et al.*, 2005 Egecioglu *et al.*, 2010) and an
643 increase in food-motivated behaviour (Skibicka *et al.*, 2011; 2012). Central ghrelin signalling,
644 *via* GHS-R1A, appears to be important not only for food reward (Egecioglu *et al.*, 2010), but
645 also for the reward associated with artificial rewards like alcohol, cocaine and amphetamine
646 (Jerlhag *et al.*, 2010, 2009; Wellman *et al.*, 2005). As an example, the locomotor stimulating
647 effect of cocaine is decreased in ghrelin-KO mice compared to their wild type littermates
648 (Abizaid *et al.*, 2010). Furthermore, in rodents, ghrelin elevates the motivation to obtain high-
649 sugar or high-fat reward (Skibicka *et al.*, 2011, 2012, Perello *et al.*, 2010). In particular, both
650 peripheral and central injections of ghrelin augment the food-motivated behaviour of a
651 satiated rat to get sugar whereas blockade of ghrelin signalling reduces the operant responding
652 of an hungry rat to the level of a satiated rat (Skibicka *et al.*, 2012). These data strongly
653 support the involvement of ghrelin in behaviours related to food reward. Thereby one can
654 suggest that ghrelin could be considered as a key internal cue, available during period of
655 energy deficit to motivate adequate food intake behaviour (Skibicka and Dickson, 2011).
656 These data reinforce the now well-documented role of ghrelin in food reward, considering
657 that the shell region of the Acc is described to process unpredicted rewards and motivational
658 states to reinforce food intake behaviours, but also use of drugs of abuse. However, the action
659 of circulating ghrelin upon GHS-R1A-expressing cells in the VTA, located mostly on
660 dopaminergic neurones, begs the question of how this hormone reaches deep brain structures
661 that are far away from circumventricular organs (see *infra*). Finally, one study shows that
662 presence of food is necessary to induce dopamine release (Kawahara *et al.*, 2009). Chronic
663 ghrelin treatment also modifies the expression of dopaminergic receptors in Acc, more
664 specially D1 and D3 (Skibicka *et al.*, 2012), which are described to be involved in obesity,
665 food reward (D1 receptors) and inhibition of reward behaviour (D3 receptors). Similar data
666 were obtained from human imaging studies that emphasize the role of ghrelin in food reward.
667 Indeed, intravenous ghrelin injection to human subjects increases activity in brain areas
668 involved in the evaluation of the reward value attributed to food and food cues including the
669 striatum, amygdala, insula and orbitofrontal cortex (Malik *et al.*, 2008).

670

671 2.3.4. Other functions

672 Almost 6000 articles have been published on ghrelin, since its discovery in 1999 (Kojima *et*
673 *al.*, 1999) and it is not surprising that its biological effects extend beyond feeding and energy
674 balance, effects that may also be relevant for AN. These include peripheral effects (eg. gastric
675 motility, bone homeostasis, cardiovascular system, glucose homeostasis, reproduction,
676 immune system) as well as CNS effects (mood disorder, sleep disturbance).

677 There is now increasing evidence that ghrelin stimulates motor activity in the gastrointestinal
678 tract (gastric motility and emptying). In fact, ghrelin shares high homology degree with
679 motilin (Kojima and Kangawa, 2005), a hormone released by endocrine cells of duodenum
680 and jejunum during fasting and which increases gastric motility after feeding (Sanger *et al.*,
681 2008). Ghrelin has been described to use both central and local pathways to exert its effects
682 on the gut through receptors located on vagal afferents, in the nodose ganglion and myenteric
683 plexus. In fact in normal rodents, central pathways are operational whereas after vagotomy,
684 ghrelin is able to exert effects *via* the myenteric plexus (see review of Peeteers, 2003).
685 Moreover, in mice, central administration of ghrelin accelerates gastric emptying (Asakawa *et*
686 *al.*, 2001) and changes the excitability of neurones located in the PVN identified as receiving
687 ascending afferent signals from mechanoreceptors in the stomach (Zhao *et al.*, 2003).
688 Clinically, it has been reported that the intravenous administration of ghrelin accelerates the
689 rate of gastric emptying and induces gastrointestinal contraction in healthy volunteers
690 (Fujitsuka *et al.*, 2012). Since the plasma levels of ghrelin are high in AN patients, one can
691 hypothesize an alteration of the signalling both at central and peripheral levels that may
692 worsen the outcome of the patients. These findings suggest that ghrelin could provide a
693 therapeutic target for disorders related to gastrointestinal discomfort.

694 Surprisingly, ghrelin is also involved in sleep-wakefulness regulation. Indeed, experiments
695 conducted in adult male rats demonstrate that repeated intravenously administrations of
696 ghrelin stimulate wakefulness, decrease slow wave sleep and reduce the duration of rapid eye
697 movement sleep (Tolle *et al.*, 2002). This action could involve a reduction in the release of
698 acetylcholine from the dorsal tegmental nucleus (LDTg) on neurones expressing somatotropin
699 release-inhibiting factor known to indirectly regulate the rapid eye movement sleep periods
700 (Tolle *et al.*, 2002). In fact, among the various neurochemical systems involved in
701 wakefulness (acetylcholine, norepinephrine, dopamine, serotonin, histamine), the
702 hypothalamic orexigenic neurones are crucial promoters of wakefulness since deficiency in
703 the orexin system leads to disorders such as narcolepsy (Modirrousta *et al.*, 2005). The status
704 of activity in orexin neurones is closely related with the nutritional and behavioural state of
705 animals. Moreover, Lamont *et al.* (2012) observed that both GHS-R and ghrelin KO mice had
706 fewer orexin-immunoreactive cells than their wild-type littermates. Their data support the
707 synergistic relationship between ghrelin and orexin in the coordination of metabolism, reward
708 and arousal to adopt the adapted behaviour for food seeking and restoration of energy
709 deficiency. In humans, AN patients exhibit sleep disorders. As an example, AN adolescents
710 have an increase in wakefulness after sleep onset, a fragmentation of sleep as well as a
711 reduction of slow-wave sleep and slow-wave activity during their total sleep time (Nobili *et*
712 *al.*, 2004; Lauer and Krieg, 2004). Even if deepening of nocturnal sleep follows a partial
713 weight restoration, the neurobiological mechanisms linking starvation, mood disorders and
714 sleep disturbance remain to be elucidated.

715 The impact of ghrelin on anxiety behaviours remains controversial: studies show an anxiolytic
716 effect under caloric restriction or after subcutaneous ghrelin injection (Lutter *et al.*, 2008)
717 while anxiogenic effects are observed in others (acute) studies with intracerebroventricular or
718 intraperitoneal ghrelin injection (Asakawa *et al.*, 2001; see review Chuang and Zigman 2009).

719 Interestingly, chronic central ghrelin treatment was found to increase anxiety-like behavior in
720 rats (Hansson *et al.*, 2012). Recently, one study investigating the amygdala as a target for
721 ghrelin found that acute ghrelin injection at this site elicits behaviours consist with a reduction
722 in anxiety-like behavior, but only in rats that were not allowed access to food during the
723 initial hour after injection. It was concluded that ghrelin, acting at the level of the amygdala,
724 may provide an especially important signal to suppress anxiety-like behaviours that would
725 otherwise prohibit the animal from finding food (Alvarez-Crespo *et al.*, 2012). It is not yet
726 known whether the ghrelin system regulates anxiety behavior associated with AN. One study
727 found that a SNP in the preproghrelin gene was associated with panic disorder in a small
728 patient group (Hansson *et al.*, 2012).

729 Among the disorders described in AN, osteopenia/osteoporosis is also one major problem that
730 cause long term outcomes with in particular a strong increase of the bone fracture incidence
731 (Lucas *et al.*, 1999). Ghrelin has and ghrelin mimetics have been shown to increase bone
732 mineral density (Svensson *et al.*, 2000; Fukushima *et al.*, 2005; Delhanty *et al.*, 2006) by a
733 mechanism that appears to include the promotion of both proliferation and differentiation of
734 osteoblasts (cells involved in bone formation), involving GHS-R1a and GHS-R1b receptors
735 (Fukushima *et al.*, 2005; Delhanty *et al.*, 2006). The etiopathogenesis of bone disease in AN
736 is complex and multifaceted. Indeed, the low bone mineral density (Legroux-Gerot *et al.*,
737 2005, 2007, 2008; Estour *et al.*, 2010) is usually linked with alteration of multiple factors
738 (Tables 3-6) that are thought to contribute to the “uncoupling” of bone turnover, leading to
739 increased bone resorption and decreased bone formation (see Howgate *et al.*, 2012). However,
740 it has been demonstrated that ghrelin affects bone metabolism by operating in an
741 autocrine/paracrine mode, independent of the GH/IGF-1 axis (see Nikolopoulos *et al.*, 2010).
742 Weight recovery is associated with partial recovery of bone mineral density. There is
743 currently no approved effective therapy that completely reverses the bone mineral density
744 deficit. The most convincing results were obtained with a treatment of recombinant human
745 IGF-1 alone or in combination with the oral contraceptive pills (see Misra and Klibanski,
746 2011). The link between ghrelin and estrogen on bone metabolism is always matter of debate
747 even if it is established that ghrelin suppresses pulsatile LH and FSH pulsatility (Meczekalski
748 *et al.*, 2008; Kluge *et al.*, 2012)

749 Another criterion used to characterize AN patients is amenorrhea. Indeed, in negative energy
750 balance conditions like in AN, the increase of plasma ghrelin is associated with decrease of
751 LH secretion (Table 6). Evidence is mounting that ghrelin may operate as a pleiotropic
752 modulator of gonadal function and reproduction (Tena-Sempere, 2008; Repaci *et al.*, 2011;
753 Muccioli *et al.*, 2011). Notably, most of the actions of ghrelin upon the reproductive axis
754 reported to date are inhibitory. Ghrelin can suppress not only LH, but also FSH secretion in
755 male and female rats (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2005; Martini *et al.*, 2006). Such effects
756 are also described in humans (Kluge *et al.*, 2012). Centrally, ghrelin exerts a predominant
757 action directly at the level of the GnRH pulse generator by inhibiting directly GnRH release
758 (Fernandez-Fernandez *et al.*, 2005; Muccioli *et al.*, 2011) or by an indirect modulation of
759 other neuronal pathways. For example, Forbes *et al.* (2009) recently showed the ability of
760 ghrelin to decrease Kiss1 mRNA expression in the medial preoptic area. Given the
761 importance of the kisspeptin system to control the reproductive axis, these data provide new
762 hypothesis for ghrelin-induced suppression of pulsatile LH secretion. Once again, in the AN,
763 ghrelin might dynamically mediate the suppressive effect of energy deficit on the onset of
764 puberty, gonadal function and fertility. Here, the effects of ghrelin on the gonadal axis might
765 protect females in a condition of strong energy insufficiency to develop a reproductive
766 behaviour that can be deleterious for her and her progeny.

767 Finally, ghrelin is also involved in other physiological functions that are more or less affected
768 in AN like cardiovascular function or immune system. Among the cardiovascular effects, this
769 hormone improves left ventricular contractility and cardiac output in healthy humans
770 (Enomoto *et al.*, 2003; Tesauro *et al.*, 2010) and lowers blood pressure in mice concomitantly
771 with a decrease in sympathetic nerve activity that is not caused by a direct action on blood
772 vessels (Callaghan *et al.*, 2012). In AN, the neuroendocrine alterations are also accompanied
773 by autonomic dysfunctions like lower blood pressure values, lack of circadian variation of
774 blood pressure and bradycardia (Oswiecimska *et al.*, 2007). Thus, ghrelin might participate in
775 AN to the cardiovascular complications observed in AN (Casiero and Frishman, 2006;
776 Jáuregui-Garrido and Jáuregui-Lobera 2012), but no studies currently display any correlation
777 between these cardiovascular risks and the high plasma levels of ghrelin.

778 The role of ghrelin on the immune system remains unclear. However, Taub (2008) describes
779 its implication in the regulation of immune factors, by inhibiting inflammatory cytokine
780 production, more specifically in mediating anti-inflammatory effects on IL-1, TNF- α and IL-
781 6 cytokine expression by T-cells and mononuclear cells *via* GHS-R, and promoting thymic
782 function. In AN, data related to the evaluation of circulating pro-inflammatory or
783 inflammatory cytokines or in adipocytes are still a matter of debate and, as underlined by
784 Nova and Marcos (2006), “controversial findings have been published regarding some aspects
785 of the immune system that are otherwise impaired in more typical types of malnutrition”.

786 2.3.5. Des-acyl ghrelin and obestatin: a controversial metabolic function ?

787 Concerning des-acyl ghrelin, its role in food intake has been much debated. The recent paper
788 of Delhanty *et al.* (2012) gives numerous arguments supporting des-acyl ghrelin as an
789 hormone that can be metabolically active, when co-administrated with acyl-ghrelin, by
790 counteracting the effects of acyl ghrelin on insulin secretion and glucose metabolism. Des-
791 acyl ghrelin appears to be increased in AN patients (Harada *et al.*, 2008; Germain *et al.*,
792 2009). Kojima *et al.* (1999) showed that des-acyl ghrelin was not able to bind to GHSR1a.
793 Although the des-acyl ghrelin receptor remains unknown, the increasing data suggesting that
794 desacyl-ghrelin is a biologically active molecular, indicate that a dedicated receptor may exist.

795 Several studies show controversial effects of des-acyl ghrelin on food intake that are either
796 inhibitory (Asakawa *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2005b) or stimulatory (Toshinai *et al.*, 2006) in
797 rodents. These results can be due to the different methods used like the type of injection, the
798 dose used, the time of injection (light or dark period), the nutritional status, fed or fasted.
799 However, the overexpression of des-acyl ghrelin in a transgenic mouse model results in a
800 small phenotype, associated with a reduction of food intake and body fat mass, reduced IGF-1
801 plasma levels without significant changes in circulating GH and also higher des-acyl ghrelin
802 with no change in total ghrelin plasma levels (Ariyasu *et al.*, 2005). In these mice, no
803 significant differences have been noticed for glycemia and insulinemia (Asakawa *et al.*, 2005;
804 Ariyasu *et al.*, 2005) while studies other studies have shown that des-acyl ghrelin inhibits
805 glucose release *in vivo* and *in vitro* (Broglia *et al.*, 2004b; Gauna *et al.*, 2005; Qader *et al.*,
806 2008). Moreover, it appears that ghrelin and des-acyl ghrelin do not have the same blood
807 concentration in systemic and in portal circulations suggesting that liver could be involved in
808 ghrelin regulation (Goodyear *et al.*, 2010).

809 Concerning lipid metabolism, *in vivo* studies showed that des-acyl ghrelin as well as ghrelin
810 increase bone marrow adipogenesis in rat shinbone (Thompson *et al.*, 2004) and both forms
811 enhance lipid accumulation in visceral tissue in humans (Rodriguez *et al.*, 2009). The

812 mechanisms involved remain unclear. Similarly, acute or chronic des-acyl ghrelin injections
813 in adult male rats cause an inhibition of LH secretion like ghrelin (Martini *et al.*, 2006). By
814 contrast, transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin do not display any changes in LH
815 and FSH levels (Ariyasu *et al.*, 2005).

816 Des-acyl ghrelin may also have a role in gastric motility. Indeed, intracerebroventricular or
817 intravenous injections alter motor activity in the antrum with a decrease of antrum activity
818 only in fasted rats (Chen *et al.*, 2005b). Mice overexpressing des-acyl ghrelin exhibit a
819 decrease in gastric emptying (Asakawa *et al.*, 2005). Other studies are necessary to
820 understand the mechanisms involved since vagotomy does not disrupt the (intravenous) des-
821 acyl ghrelin effect (Chen *et al.*, 2005b).

822 Studies about the effects of des-acyl ghrelin on the cardiovascular system are rare.
823 Nevertheless, like acyl ghrelin, it promotes bradycardia and hypotension (Tsubota *et al.*,
824 2004). Moreover, ghrelin and des-acyl ghrelin display vasodilator effect and no inotropic
825 effects when they are applied on human artery *in vitro* (Kleinz *et al.*, 2006).

826 Similarly, concerning obestatin, it remains again an open question whether this peptide is a
827 physiologically relevant peptide to regulate energy homeostasis, food intake and gastric
828 motility (Gourcerol *et al.*, 2007). Obestatin binds to GRP 39, a receptor of the same subfamily
829 than ghrelin receptor, to decrease food intake and body weight in an opposite manner to
830 ghrelin (Stengel *et al.*, 2009; Hassouna *et al.*, 2010; Mokrosinski *et al.* 2010; Veldhuis and
831 Bowers, 2010). Subsequent studies failed to show activation of this receptor and only few
832 studies have reproduced the obestatin effects under specific conditions. Such results should be
833 interpreted with caution since variations are observed according to the kits and conditions
834 applied for obestatin assays (Hassouna *et al.*, 2010). Due to their potential functions, it should
835 be interesting to measure ghrelin/obestatin ratio to better understand their roles in the
836 alteration of energy balance. It seems that AN affects obestatin blood levels with a lower
837 ghrelin/obestatin ratio in AN patients of restrictive type compared to constitutional thin
838 women (Germain *et al.*, 2008; 2010). Moreover, other functions are attributed to this hormone
839 such as the inhibition of thirst, gastric motility, cell survival, pancreatic hormone secretion,
840 sleep, thermoregulation, memory and anxiety (Szentirmai *et al.*, 2009; Hassouna *et al.*, 2010;
841 Veldhuis and Bowers 2010).

842 **3. Access of ghrelin to its neuronal targets**

843 To dynamically report energy homeostasis alterations and ensure an appropriate neuronal
844 response, blood-borne ghrelin must rapidly access the central nervous system. Intriguingly,
845 the physiological mechanisms controlling the access of ghrelin to its neuronal target remain
846 currently debated. Indeed, although a central origin of ghrelin has been described (Cowley *et*
847 *al.*, 2003), it is now recognized that blood-derived ghrelin is able to target neuronal networks
848 within the central nervous system to regulate energy homeostasis. However, it remains
849 unclear how this key energy status-signaling hormone can rapidly access sensory neurones to
850 alter feeding responses. Ghrelin mainly targets neurones located in the ARC where different
851 blood/brain interfaces have been described. The blood–brain barrier is one such interface and
852 one of the best described in the hypothalamic nuclei as in all other regions of the brain. The
853 blood-brain barrier is located on brain capillaries where endothelial cells are tightly apposed
854 by continuous tight junctions that prevent the free passage of molecules through the
855 paracellular pathway. For circulating factors to access to the brain through the blood-brain
856 barrier endothelium requires transcellular transport. Many studies have investigated the

857 transport of circulating ghrelin across the blood-brain barrier. Banks *et al.* (2002)
858 demonstrated the existence of ghrelin saturable transport system in mice from the brain to the
859 blood but transport into the brain was much less pronounced. Remarkably, human ghrelin,
860 which differs from mouse ghrelin by 2 amino acids, can be transported in both directions in
861 mice. So, although receptor-mediated transport of ghrelin cannot be excluded, uptake
862 mechanisms of this peptide remain unclear. Moreover, the efficiency of this blood-brain
863 barrier remains to be studied in a chronic caloric restriction context. Improved CNS
864 penetration during fasting is one possible mechanism to explain the 3 fold increase in the
865 number of cells expressing fos after peripheral ghrelin injection in fasted versus fed rats
866 (Hewson and Dickson 2000). The role of another blood/brain interface that is materialized by
867 fenestrated vessels is also to consider. Indeed, these vessels are part of the blood-CSF barrier
868 that is mostly described in the median eminence, the circumventricular organ adjacent to the
869 ARC (Mullier *et al.*, 2010). Median eminence vasculature differs from typical brain vessels as
870 they harbor a fenestrated endothelium that lacks tight junction complexes. These structural
871 characteristics and the presence of various blood-derived molecules in the median eminence
872 and the other circumventricular organs parenchyma suggest high permeability of this specific
873 vasculature (Broadwell *et al.*, 1983; Ciofi, 2011; Morita and Miyata, 2012). Permeable
874 vasculature can be found in the external part of the median eminence forming pituitary portal
875 capillary plexus that displays some long intrainfundibular loops spreading into the median
876 eminence parenchyma. Interestingly, fenestrated vessels are also found within the ARC with a
877 higher density into the ventromedial ARC where they are bordered by NPY expressing
878 neurones (Ciofi *et al.*, 2009). These data give support to the access of ghrelin from the
879 circulation to the ventromedial sensory neurones *via* median eminence/ARC fenestrated
880 vasculature (Figure 4).

881 The action of ghrelin on food intake may not be only due to its action on hypothalamus.
882 Indeed, an indirect role of ghrelin on hypothalamic structures through an activation of
883 brainstem areas has been suggested. Indirect pathway may occur through the binding of
884 ghrelin to gastric vagal afferent neurones (Date *et al.*, 2002). However, the expression of
885 GHS-R1a within the dorsal vagal complex supports a direct action of ghrelin to brain
886 parenchyma. Among this complex, the area postrema is a circumventricular organ that
887 characteristically present fenestrated vasculature. These vessels may be responsible for the
888 diffusion of ghrelin and its delivery to the dorsal vagal complex that communicates with
889 hypothalamic control centers (Figure 4).

890 Fenestrated vasculature could represent a direct vascular route while allowing passive
891 diffusion of peripheral molecules into the hypothalamus and the area postrema. This route
892 may be responsible of acute regulation and complete chronic feedback accomplished by
893 uptake of circulating molecules *via* receptor-mediated transport across the blood-brain barrier.

894 The transport of ghrelin through the blood/brain interfaces has been poorly investigated in
895 metabolic disorders excepted in obesity where few data are available. Banks *et al.* (2008)
896 showed an inverse relation between body weight and ghrelin access to the brain suggesting
897 that physiological states influence the rate at which ghrelin is transported across the
898 blood/brain interfaces. A better understanding of the access of ghrelin to its neuronal target
899 may leads to novel therapeutic interventions.

900 **4. Conclusion: ghrelin as a potential treatment for anorexia nervosa**

901 In restrictive AN, the high plasma levels of ghrelin, even adaptive in view of its main role in
902 meal initiation, let us to hypothesize a potential insensitivity to this endocrine signal both
903 peripherally and centrally in association with this disease. It should be also mentioned that
904 AN patients often cannot increase their food intake not only because of fear of obesity, but
905 also because of chronic or recurrent abdominal discomfort, fullness and chronic constipation,
906 functions in which efficient ghrelin participation is required. Injections of exogenous ghrelin
907 have been shown to increase the adiposity and to stimulate appetite in healthy individuals and
908 cancer patients (Peino *et al.*, 2000; Wren *et al.*, 2001a, Neary *et al.*, 2004).

909 For AN patients, only a few preliminary studies have been performed to examine the effects
910 of ghrelin administration (Miljic *et al.*, 2006; Hotta *et al.*, 2009; Ogiso *et al.*, 2011). In these
911 clinical studies, the mode of administration was different leading to different outcomes. In the
912 study of Miljic *et al.* (2006), a single-dose continuous administration of ghrelin for 5 h failed
913 to affect appetite in all AN patients treated. Hotta *et al.* (2009) report that intravenous
914 administration of ghrelin in anorectic patients twice a day for 14 days improves epigastric
915 discomfort or constipation and increases the hunger score, which is related to gastric
916 emptying. An increase of the body weight was obtained, from 1.5 to 2.4 kg, and daily energy
917 intake during ghrelin infusion increased by 12% to 36% compared with the pretreatment
918 period. Nutritional parameters such as total protein and triglyceride levels improved. These
919 findings suggest that ghrelin may have therapeutic potentials in AN patients who cannot gain
920 weight because of gastrointestinal dysfunction. Further studies are need to elucidate the
921 potential impact of ghrelin by itself or agonists to ameliorate the outcomes of the AN patients.

922 In animals, several attempts have been made (see the other chapter submitted by Hassouna *et*
923 *al.* “Actions of agonists and antagonists of the ghrelin/GHS-R pathway on GH secretion,
924 appetite and c-Fos activity”). Recently, Costantini *et al.* (2011) detailed an unexpected effect
925 of GSK1614343, a novel ghrelin receptor antagonist with no partial agonist properties, that
926 induced both in rats and dogs an increase of food intake, body weight and reduced the pro-
927 opiomelanocortin mRNA levels in the hypothalamus of rats chronically treated with the
928 compound. Although it may seem counterintuitive to consider the use of ghrelin antagonists
929 in this disease area, one study in rodents suggested that suppressed ghrelin signalling reduces
930 (food anticipatory) hyperlocomotor activity in the ABA model (Verhagen *et al.*, 2011).
931 Barnett *et al.* (2011) demonstrated that the administration of a GOAT inhibitor improved
932 glucose tolerance and decreased weight gain in wild-type mice but not in ghrelin KO mice.
933 Such treatment also led to decreased serum levels of acyl ghrelin without any effect on serum
934 levels of desacyl ghrelin. Even if this GOAT inhibitor might be expected to pave the way for
935 clinical targeting of GOAT in metabolic diseases such as obesity and diabetes mellitus, one
936 can suggest that, a GOAT activator, which has not been reported yet, may be a potential new
937 treatment of AN if it improves food intake and body weight gain in patients with AN.

938 Finally, in the future it will be possible to assess more precisely the exact contribution of
939 ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin in the evolution of the AN both in humans and
940 adequate animal models (Cardona-Cano *et al.*, 2012). The roles played by these peptides in
941 feeding behaviour, adaptation to starvation, reward mechanisms, emotional behaviour, and
942 stress responses in animals and humans led them to be potential therapeutic targets for AN
943 treatments. The way and the mode of administration remain to be further determined and
944 clarified. Neuroimaging studies have reported reduced brain volumes affecting both ventral
945 and dorsal neural circuit dysfunctions in AN patients, with altered metabolisms of serotonin
946 and dopamine that are closely associated to ghrelin, contributing to their puzzling symptoms
947 (Kaye *et al.*, 2009; Brooks *et al.*, 2011). It will be important to determine whether the ghrelin

948 signal reaches its central targets leading, as it is observed for leptin in obesity, to a « ghrelin-
949 resistance » or a « transient ghrelin-insensitivity ». More investigations are needed to better
950 suppress the neuronal activity of ghrelin signalling and to identify the specific pathways that
951 may underlie the deleterious behaviours in patients suffering from AN. Investigation of the
952 ghrelin peptide system will open up a new window of research for tackling psychosomatic
953 disorders beyond the gastrointestinal tract, particularly restrictive AN and obesity/metabolic
954 syndrome, two disorders at the extreme of the body weight continuum.
955
956
957

957 **REFERENCES**

- 958
- 959 Abizaid, A., Liu, Z.W., Andrews, Z.B., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J.D., Roth, R.H.,
 960 Sleeman, M.W., Picciotto, M.R., Tschöp, M.H., Gao, X.B., and Horvath, T.L. (2006). Ghrelin
 961 modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while
 962 promoting appetite. *J. Clin. Invest.* 116, 3229–3239.
- 963 Abizaid, A., Mineur, Y.S., Roth, R.H., Elsworth, J.D., Sleeman, M.W., Picciotto, M.R., and Horvath,
 964 T.L. (2010). Reduced locomotor responses to cocaine in ghrelin-deficient mice. *Neuroscience* 192,
 965 500-506.
- 966 Adamantidis, A.R., Tsai, H.C., Boutrel, B., Zhang, F., Stuber, G.D., Budygin, E.A., Touriño, C.,
 967 Bonci, A., Deisseroth, K., and de Lecea, L. (2011). Optogenetic interrogation of dopaminergic
 968 modulation of the multiple phases of reward-seeking behavior. *J. Neurosci.* 31(30), 10829-10835.
- 969 Alguacil, L.F., Salas, E., and González-Martín, C. (2011). Identification of new drug targets and
 970 biomarkers related to obesity and eating disorders: an approach based on reward deficit and
 971 addiction. *Curr. Pharm. Des.* 17(5), 462-470.
- 972 Alvarez-Crespo, M., Skibicka, K.P., Farkas, I., Molnár, C.S., Egecioglu, E., Hrabovszky, E., Liposits,
 973 Z., and Dickson, S.L. (2012). The amygdala as a neurobiological target for ghrelin in rats:
 974 neuroanatomical, electrophysiological and behavioral evidence. *PLoSOne* 7(10), e46321.
- 975 Andrews, Z.B., Liu, Z.W., Wallingford, N., Erion, D.M., Borok, E., Friedman, J.M., Tschöp, M.H.,
 976 Shanabrough, M., Cline, G., Shulman, G.I., Coppola, A., Gao, X.B., Horvath, T.L., and Diano, S.
 977 (2008). UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature*
 978 454(7206), 846-851.
- 979 Arimura, C., Nozaki, T., Takakura, S., Kawai, K., Takii, M., Sudo, N., and Kubo, C. (2010).
 980 Predictors of menstrual resumption by patients with anorexia nervosa. *Eat. Weight Disord.* 15(4),
 981 e226-233.
- 982 Ariyasu, H., Takaya, K., Iwakura, H., Hosoda, H., Akamizu, T., Arai, Y., Kangawa, K., and Nakao, K.
 983 (2005). Transgenic mice overexpressing des-acyl ghrelin show small phenotype. *Endocrinology*
 984 146(1),355-364.
- 985 Ariyasu, H., Takaya, K., Tagami, T., Ogawa, Y., Hosoda, K., Akamizu, T., Suda, M., Koh, T., Natsui,
 986 K., Toyooka, S., Shirakami, G., Usui, T., Shimatsu, A., Doi, K., Hosoda, H., Kojima, M.,
 987 Kangawa, K., and Nakao, K. (2001). Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding
 988 state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol.*
 989 *Metab.* 86(10), 4753-4758.
- 990 Arvat, E., Maccario, M., Di Vito, L., Broglio, F., Benso, A., Gottero, C., Papotti, M., Muccioli, G.,
 991 Dieguez, C., Casanueva, F.F., Deghenghi, R., Camanni, F., and Ghigo, E. (2001). Endocrine
 992 activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and
 993 interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone. *J. Clin.*
 994 *Endocrinol. Metab.* 86, 1169–1174.
- 995 Asakawa, A., Inui, A., Fujimiya, M., Sakamaki, R., Shinfuku, N., Ueta, Y., Meguid, M.M., and
 996 Kasuga, M. (2005). Stomach regulates energy balance via acylated ghrelin and desacyl ghrelin. *Gut*
 997 54(1), 18-24.
- 998 Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Yuzuriha, H., Nagata, T., Ueno, N., Makino, S., Fujimiya, M.,
 999 Nijijima, A., Fujino, M.A., and Kasuga, M. (2001). Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from
 1000 stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120, 337-345.
- 1001 Avena, N.M., and Bocarsly, M.E. (2012) Dysregulation of brain reward systems in eating disorders:
 1002 neurochemical information from animal models of binge eating, bulimia nervosa, and anorexia
 1003 nervosa. *Neuropharmacology* 63(1), 87-96.
- 1004 Bailey, A.R., von Engelhardt, N., Leng, G., Smith, R.G., and Dickson, S.L. (2000). Growth hormone
 1005 secretagogue activation of the arcuate nucleus and brainstem occurs via a non-noradrenergic
 1006 pathway. *J. Neuroendocrinol.* 12(3), 191-197.
- 1007 Balligand, J.L., Brichard, S.M., Brichard, V., Desager, J.P., and Lambert, M. (1998). Hypoleptinemia
 1008 in patients with anorexia nervosa: loss of circadian rhythm and unresponsiveness to short-term
 1009 refeeding. *Eur. J. Endocrinol.* 138, 415-420.

- 1010 Banks, W.A., Tschop, M., Robinson, S.M., and Heiman, M.L. (2002). Extent and direction of ghrelin
1011 transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *J.*
1012 *Pharmacol. Exp. Ther.* 302(2), 822-827.
- 1013 Banks, W.A., Burney, B.O., and Robinson, S.M. (2008). Effects of triglycerides, obesity, and
1014 starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. *Peptides* 29(11), 2061-2065.
- 1015 Baranowska, B. (1990). Are disturbances in opioid and adrenergic systems involved in the hormonal
1016 dysfunction of anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 15, 371-379.
- 1017 Baranowska, B., Wasilewska-Dziubińska, E., Radzikowska, M., Płonowski, A., and Roguski, K.
1018 (1997). Neuropeptide Y, galanin, and leptin release in obese women and in women with anorexia
1019 nervosa. *Metabolism* 46(12), 1384-1389.
- 1020 Baranowska, B., Radzikowska, M., Wasilewska-Dziubinska, E., Roguski, K., and Borowiec, M.
1021 (2000). The role of VIP and somatostatin in the control of GH and prolactin release in anorexia
1022 nervosa and in obesity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 921, 443-455.
- 1023 Baranowska, B., Wolinska-Witort, E., Wasilewska-Dziubinska, E., Roguski, K., and Chmielowska, M.
1024 (2001). Plasma leptin, neuropeptide Y (NPY) and galanin concentrations in bulimia nervosa and in
1025 anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol. Lett.* 22, 356-358.
- 1026 Barazzoni, R., Bosutti, A., Stebel, M., Cattin, M.R., Roder, E., Visintin, L., Cattin, L., Biolo, G.,
1027 Zanetti, M., and Guarnieri, G. (2005). Ghrelin regulates mitochondrial- lipid metabolism gene
1028 expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle *Am. J. Physiol. Endocrinol.*
1029 *Metab.* 288, E228-E235.
- 1030 Barbarich-Marsteller, N.C. (2007). Neurochemistry and pharmacological treatments: Where is the
1031 field of anorexia nervosa heading? *Central Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 7: 35-43.
- 1032 Barbarich-Marsteller, N.C., Foltin, R.W., and Walsh, B.T. (2011). Does anorexia nervosa resemble an
1033 addiction? *Curr. Drug Abuse Rev.* 4(3), 197-200.
- 1034 Barnett, B.P., Hwang, Y., Taylor, M.S., Kirchner, H., Pfluger, P.T., Bernard, V., Lin, Y.Y., Bowers,
1035 E.M., Mukherjee C., Song, W.J., Longo, P.A., Leahy, D.J., Hussain, M.A., Tschöp, M.H., Boeke,
1036 J.D., Cole, P.A. (2010). Glucose and weight control in mice with a designed ghrelin O-
1037 acyltransferase inhibitor. *Science* 330(6011), 1689-1692.
- 1038 Bergh, C., and Södersten, P. (1996). Anorexia nervosa, self-starvation and the reward of stress. *Nat.*
1039 *Med.* 2, 21-22.
- 1040 Berrettini, W.H., Kaye, W.H., Sunderland, T., May, C., Gwirtsman, H.E., Mellow, A., and Albright,
1041 A. (1988). Galanin immunoreactivity in human CSF: studies in eating disorders and Alzheimer's
1042 disease. *Neuropsychobiology* 19(2), 64-68.
- 1043 Boakes, R.A. (2007). Self-starvation in the rat: running versus eating. *Span. J. Psychol.* 10(2), 251-7.
- 1044 Boakes, R.A., and Juraskova, I. (2001). The role of drinking in the suppression of food intake by
1045 recent activity. *Behav. Neurosci.* 115(3), 718-30.
- 1046 Boghi, A., Sterpone, S., Sales, S., D'Agata, F., Bradac, G.B., Zullo, G., and Munno, D. (2011). In vivo
1047 evidence of global and focal brain alterations in anorexia nervosa. *Psychiatry Res.* 192(3), 154-159.
- 1048 Bolton, J.G., Patel, S., Lacey, J.H., and White, S. (2005). A prospective study of changes in bone
1049 turnover and bone density associated with regaining weight in women with anorexia nervosa.
1050 *Osteoporos. Int.* 16(12), 1955-1962.
- 1051 Bordi, C., D'Adda, T., Azzoni, C., Ferraro G. (2000). Classification of gastric endocrine cells at the
1052 light and electron microscopical levels. *Microsc. Res. Technol.* 48, 258-271.
- 1053 Bosy-Westphal, A., Brabant, G., Haas, V., Onur, S., Paul, T., Nutzinger, D., Klein, H., Hauer, M., and
1054 Müller, M.J. (2005). Determinants of plasma adiponectin levels in patients with anorexia nervosa
1055 examined before and after weight gain. *Eur. J. Nutr.* 44, 355-359.
- 1056 Bowers, C.Y., Chang, J., Momany, F., and Folkers, K. (1977). "Effect of the enkephalins and
1057 enkephalin analogs on release of pituitary hormones in vitro," in *Molecular Endocrinology*, eds I.
1058 MacIntyre and M. Szelke, (Elsevier/North Holland, Amsterdam, The Netherlands), 287-292.
- 1059 Bowers, C.Y., Momany, F.A., Reynolds, G.A., and Hong, A. (1984). On the in vitro and in vivo
1060 activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth
1061 hormone. *Endocrinology* 114(5), 1537-45.

- 1062 Brambilla, F., Ferrari, E., Petraglia, F., Facchinetti, F., Catalano, M., and Genazzani, A.R. (1991).
1063 Peripheral opioid secretory pattern in anorexia nervosa. *Psychiatry Res.* 39, 115-127.
- 1064 Brambilla, F., Santonastaso, P., Caregato, L., and Favaro, A. (2006). Disorders of eating behavior:
1065 correlation between hypothalamo-pituitary-thyroid function and psychopathological aspects.
1066 *Psychoneuroendocrinology.* 31(1), 131-136.
- 1067 Brick, D.J., Gerweck, A.V., Meenaghan, E., Lawson, E.A., Misra, M., Fazeli, P., Johnson, W.,
1068 Klibanski, A., and Miller, K.K. (2010). Determinants of IGF1 and GH across the weight spectrum:
1069 from anorexia nervosa to obesity. *Eur. J. Endocrinol.* 163(2), 185-191.
- 1070 Briggs, D.I., and Andrews, Z.B. (2011). Metabolic status regulates ghrelin function on energy
1071 homeostasis. *Neuroendocrinology* 93(1), 48-57.
- 1072 Broadwell, R.D., Balin, B.J., Salzman, M., and Kaplan, R.S. (1983). Brain-blood barrier? Yes and no.
1073 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80(23), 7352-7356.
- 1074 Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Muccioli, G., Papotti, M., van der Lely, A.J.,
1075 Deghenghi, R., and Ghigo, E. (2001). Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the
1076 stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J. Clin. Endocrinol.*
1077 *Meta.* 86(10), 5083-5086.
- 1078 Broglio, F., Gianotti, L., Destefanis, S., Fassino, S., Abbate Daga, G., Mondelli, V., Lanfranco, F.,
1079 Gottero, C., Gauna, C., Hofland, L., Van der Lely, A.J., and Ghigo, E. (2004a). The endocrine
1080 response to acute ghrelin administration is blunted in patients with anorexia nervosa, a ghrelin
1081 hypersecretory state. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 60(5), 592-599.
- 1082 Broglio, F., Gottero, C., Prodam, F., Gauna, C., Muccioli, G., Papotti, M., Abribat, T., Van Der Lely,
1083 A.J., and Ghigo, E. (2004b). Non-acylated ghrelin counteracts the metabolic but not the
1084 neuroendocrine response to acylated ghrelin in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(6), 3062-
1085 3065.
- 1086 Brooks, S.J., Barker, G.J., O'Daly, O.G., Brammer, M., Williams, S.C., Benedict, C., Schiöth, H.B.,
1087 Treasure, J., and Campbell, I.C. (2011). Restraint of appetite and reduced regional brain volumes in
1088 anorexia nervosa: a voxel-based morphometric study. *BMC Psychiatry* 17, 171-179.
- 1089 Buehren, K., Konrad, K., Schaefer, K., Kratzsch, J., Kahraman-Lanzerath, B., Lente, C., and Herpertz-
1090 Dahlmann, B. (2011). Association between neuroendocrinological parameters and learning and
1091 memory functions in adolescent anorexia nervosa before and after weight recovery. *J. Neural*
1092 *Transm.* 118(6), 963-968.
- 1093 Burden, V.R., White, B.D., Dean, R.G., and Martin, R.J. (1993). Activity of the hypothalamic-
1094 pituitary-adrenal axis is elevated in rats with activity-based anorexia. *J. Nutr.* 123(7), 1217-1225.
- 1095 Caillot-Augusseau, A., Lafage-Proust, M.H., Margailan, P., Vergely, N., Faure, S., Paillet, S., Lang,
1096 F., Alexandre, C., and Estour, B. (2000). Weight gain reverses bone turnover and restores circadian
1097 variation of bone resorption in anorexic patients. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 52(1), 113-121.
- 1098 Calero, J.A., Muñoz, M.T., Argente, J., Traba, M.L., Méndez-Dávila, C., García-Moreno, C., and de la
1099 Piedra, C. (1999). A variation in Bone Alkaline Phosphatase levels that correlates positively with
1100 bone loss and normal levels of aminoterminal propeptide of collagen I in girls with anorexia
1101 nervosa. *Clin. Chim. Acta* 285(1-2), 121-129.
- 1102 Callaghan, B., Hunne, B., Hirayama, H., Sartor, D.M., Nguyen, T.V., Abogafie, F.C., Ferens, D.M.,
1103 McIntyre, P., Ban, K., Baell, J., Furness, J.B., and Brock, J.A. (2012). Sites of action of ghrelin
1104 receptor ligands in cardiovascular control. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* Aug 10. [Epub
1105 ahead of print].
- 1106 Camiña, J.P. (2006) Cell biology of the ghrelin receptor. *J. Neuroendocrinol.* 18(1), 65-76.
- 1107 Cardona Cano, S., Merkesteyn, M., Skibicka, K.P., Dickson, S.L., and Adan, R.A. (2012). Role of
1108 ghrelin in the pathophysiology of eating disorders: implications for pharmacotherapy. *CNS Drugs.*
1109 26(4), 281-296.
- 1110 Carr, K.D. (2011). Food scarcity, neuroadaptations, and the pathogenic potential of dieting in an
1111 unnatural ecology: binge eating and drug abuse. *Physiol. Behav.* 104(1), 162-167.
- 1112 Casiero, D., and Frishman, W.H. (2006). Cardiovascular complications of eating disorders. *Cardiol.*
1113 *Rev.* 14(5), 227-231.

- 1114 Casper, R.C. (1998). Behavioral activation and lack of concern, core symptoms of anorexia nervosa?
1115 *Int. J. Eat. Disord.* 24, 381-393.
- 1116 Castañeda, T.R., Tong, J., Datta, R., Culler, M., and Tschöp, M.H. (2010). Ghrelin in the regulation of
1117 body weight and metabolism. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31, 44–60.
- 1118 Cerrato, M., Carrera, O., Vazquez, R., Echevarría, E., and Gutierrez, E. (2012). Heat makes a
1119 difference in activity-based anorexia: a translational approach to treatment development in anorexia
1120 nervosa. *Int. J. Eat. Disord.* 45(1), 26-35.
- 1121 Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Weingarth, D.T., Adams, J.R., Frazier, E.G., Shen, Z.,
1122 Marsh, D.J., Feighner, S.D., Guan, X.M., Ye, Z., Nargund, R.P., Smith, R.G., Van der Ploeg, L.H.,
1123 Howard, A.D., MacNeil, D.J., and Qian, S. (2004). Orexigenic action of peripheral ghrelin is
1124 mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein. *Endocrinology* 145 (6), 2607-2612.
- 1125 Chen, X., Ge, Y.L., Jiang, Z.Y., Liu, C.Q., Depoortere, I., and Peeters, T.L. (2005a). Effects of ghrelin
1126 on hypothalamic glucose responding neurons in rats. *Brain Res.* 1055(1-2), 131-136.
- 1127 Chen, C.Y., Inui, A., Asakawa, A., Fujino, K., Kato, I., Chen, C.C., Ueno, N., and Fujimiya, M.
1128 (2005b). Des-acyl ghrelin acts by CRF type 2 receptors to disrupt fasted stomach motility in
1129 conscious rats. *Gastroenterology* 129(1), 8-25.
- 1130 Chiodera, P., Volpi, R., Capretti, L., Marchesi, C., d'Amato, L., De Ferri, A., Bianconi, L., and Coiro,
1131 V. (1991). Effect of estrogen or insulin-induced hypoglycemia on plasma oxytocin levels in
1132 bulimia and anorexia nervosa. *Metabolism* 40(11), 1226-1230.
- 1133 Chow, K.B., Sun, J., Chu, K.M., Tai Cheung, W., Cheng, C.H., and Wise, H. (2012). The truncated
1134 ghrelin receptor polypeptide (GHS-R1b) is localized in the endoplasmic reticulum where it forms
1135 heterodimers with ghrelin receptors (GHS-R1a) to attenuate their cell surface expression. *Mol.*
1136 *Cell. Endocrinol.* 348(1), 247-54.
- 1137 Chuang, J.C., and Zigman, J.M. (2010). Ghrelin's Roles in Stress, Mood, and Anxiety Regulation. *Int.*
1138 *J. Pept.* 2010. pii: 460549.
- 1139 Ciofi, P. (2011). The arcuate nucleus as a circumventricular organ in the mouse. *Neurosci. Lett.*
1140 487(2), 187-190.
- 1141 Ciofi, P., Garret, M., Lapirot, O., Lafon, P., Loyens, A., Prevot, V., and Levine, J.E. (2009). Brain-
1142 endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*
1143 150(12), 5509-5519.
- 1144 Confavreux, C.B., Levine, R.L., and Karsenty, G. (2009). A paradigm of integrative physiology, the
1145 crosstalk between bone and energy balances. *Mol. Cell. Endocrinol.* 310(1-2), 21-29.
- 1146 Corcos, M., Guilbaud, O., Paterniti, S., Moussa, M., Chambry, J., Chaouat, G., Consoli, S.M., and
1147 Jeammet, P. (2003). Involvement of cytokines in eating disorders: a critical review of the human
1148 literature. *Psychoneuroendocrinology* 28(3), 229-249.
- 1149 Corwin, R.L., Avena, N.M., and Boggiano, M.M. (2011). Feeding and reward: perspectives from three
1150 rat models of binge eating. *Physiol. Behav.* 104(1), 87-97.
- 1151 Costantini, V.J., Vicentini, E., Sabbatini, F.M., Valerio, E., Lepore, S., Tessari, M., Sartori, M.,
1152 Michielin, F., Melotto, S., Bifone, A., Pich, E.M., and Corsi, M. (2011). GSK1614343, a novel
1153 ghrelin receptor antagonist, produces an unexpected increase of food intake and body weight in
1154 rodents and dogs. *Neuroendocrinology* 94(2), 158-168.
- 1155 Cowley, M.A., Smith, R.G., Diano, S., Tschöp, M., Pronchuk, N., Grove, K.L., Strasburger, C.J.,
1156 Bidlingmaier, M., Esterman, M., Heiman, M.L., Garcia-Segura, L.M., Nillni, E.A., Mendez, P.,
1157 Low, M.J., Sotonyi, P., Friedman, J.M., Liu, H., Pinto, S., Colmers, W.F., Cone, R.D., and
1158 Horvath, T.L. (2003). The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS
1159 demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron.* 37(4), 649-661.
- 1160 Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., and Weigle, D.S. (2001). A
1161 preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*
1162 50(8):1714-1719.
- 1163 Date, Y., Murakami, N., Toshinai, K., Matsukura, S., Nijijima, A., Matsuo, H., Kangawa, K., and
1164 Nakazato, M. (2002). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and
1165 growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123(4), 1120-1128.

- 1166 Davis, C., and Claridge, G. (1998) The eating disorders as addiction: a psychobiological perspective.
1167 *Addict. Behav.* 23(4), 463-75.
- 1168 Davis, C., Katzman, D.K., Kaptein, S., Kirsh, C., Brewer, H., Kalmbach, K., Olmsted, M.P.,
1169 Woodside, D.B., and Kaplan, A.S. (1997). The prevalence of high-level exercise in the eating
1170 disorders: etiological implications. *Compr. Psychiatry* 38(6), 321-326.
- 1171 Delhanty, P.J., van der Eerden, B.C., van der Velde, M., Gauna, C., Pols, H.A., Jahr, H., Chiba, H.,
1172 van der Lely, A.J., and van Leeuwen, J.P. (2006). Ghrelin and unacylated ghrelin stimulate human
1173 osteoblast growth via mitogen-activated protein kinase (MAPK)/phosphoinositide 3-kinase (PI3K)
1174 pathways in the absence of GHS-R1a. *J. Endocrinol.* 188(1), 37-47.
- 1175 Delhanty, P.J., Neggers, S.J., and Van der Lely, A.J. (2012) Ghrelin: The Differences between Acyl-
1176 and Des-acyl Ghrelin. *Eur. J. Endocrinol.* 2012 Aug 16. [Epub ahead of print]
- 1177 Delporte, M.L., Brichard, S.M., Hermans, M.P., Beguin, C., and Lambert, M. (2003).
1178 Hyperadiponectinaemia in anorexia nervosa. *Clin. Endocrinol.* 58, 22-29.
- 1179 Demitrack, M.A., Lesem, M.D., Listwak, S.J., Brandt, H.A., Jimerson, D.C., and Gold, P.W. (1990).
1180 CSF oxytocin in anorexia nervosa and bulimia nervosa: clinical and pathophysiologic
1181 considerations. *Am. J. Psychiatry* 147(7), 882-886.
- 1182 Di Carlo, C., Tommaselli, G.A., De Filippo, E., Pisano, G., Nasti, A., Bifulco, G., Contaldo, F., and
1183 Nappi, C. (2002). Menstrual status and serum leptin levels in anorectic and in menstruating women
1184 with low body mass indexes. *Fertil. Steril.* 78(2), 376-382.
- 1185 Dickson, S.L., Leng, G., and Robinson, I.C. (1993). Systemic administration of growth hormone-
1186 releasing peptide activates hypothalamic arcuate neurons. *Neuroscience* 53(2), 303-306.
- 1187 Dickson, S.L., Doutrelant-Viltart, O., Dyball, R.E., and Leng, G. (1996). Retrogradely labelled
1188 neurosecretory neurones of the rat hypothalamic arcuate nucleus express Fos protein following
1189 systemic injection of GH-releasing peptide-6. *J. Endocrinol.* 151(2), 323-331.
- 1190 Dickson, S.L., and Luckman, S.M. (1997). Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in
1191 neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus
1192 following systemic injection of the GH secretagogue, GH-releasing peptide-6. *Endocrinology*
1193 138(2):771-777.
- 1194 Djurovic, M., Pekic, S., Petakov, M., Damjanovic, S., Doknic, M., Dieguez, C., Casanueva, F.F., and
1195 Popovic, V. (2004). Gonadotropin response to clomiphene and plasma leptin levels in weight
1196 recovered but amenorrhoeic patients with anorexia nervosa. *J. Endocrinol. Investig.* 27, 523-527.
- 1197 Dolezalova, R., Lacinova, Z., Dolinkova, M., Kleiblova, P., Haluzikova, D., Housa, D., Papezova, H.,
1198 and Haluzik, M. (2007). Changes of endocrine function of adipose tissue in anorexia nervosa:
1199 comparison of circulating levels versus subcutaneous mRNA expression. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*
1200 67(5), 674-678.
- 1201 Dominguez, J., Goodman, L., Sen Gupta, S., Mayer, L., Etu, S.F., Walsh, B.T., Wang, J., Pierson, R.,
1202 and Warren, M.P. (2007). Treatment of anorexia nervosa is associated with increases in bone
1203 mineral density, and recovery is a biphasic process involving both nutrition and return of menses.
1204 *Am. J. Clin. Nutr.* 86(1), 92-99.
- 1205 Dostalova, I., Kopsky, V., Duskova, J., Papezova, H., Pacak, K., and Nedvidkova, J. (2005). Leptin
1206 concentrations in the abdominal subcutaneous adipose tissue of patients with anorexia nervosa
1207 assessed by in vivo microdialysis. *Regul. Pept.* 128, 63-68.
- 1208 Dostalova, I., Smitka, K., Papezova, H., Kvasnickova, H., and Nedvidkova, J. (2007). Increased
1209 insulin sensitivity in patients with anorexia nervosa: the role of adipocytokines. *Physiol. Res.* 56,
1210 587-594.
- 1211 Eddy, K.T., Dorer, D.J., Franko, D.L., Tahilani, K., Thompson-Brenner, H., and Herzog, D.B. (2008).
1212 Diagnostic crossover in anorexia nervosa and bulimia nervosa: implications for DSM-V. *Am. J.*
1213 *Psych.* 165, 245-250.
- 1214 Egecioglu, E., Jerlhag, E., Salomé, N., Skibicka, K.P., Haage, D., Bohlooly, Y.M., Andersson, D.,
1215 Bjursell, M., Perrissoud, D., Engel, J.A., and Dickson, S.L. (2010). Ghrelin increases intake of
1216 rewarding food in rodents. *Addict. Biol.* 15, 304- 311.
- 1217 Ehrlich, S., Salbach-Andrae, H., Eckart, S., Merle, J.V., Burghardt, R., Pfeiffer, E., Franke, L.,
1218 Uebelhack, R., Lehmkuhl, U., and Hellweg, R. (2009). Serum brain-derived neurotrophic factor

1219 and peripheral indicators of the serotonin system in underweight and weight-recovered adolescent
1220 girls and women with anorexia nervosa. *J. Psychiatry Neurosci.* 34, 323-329.

1221 Enomoto, M., Nagaya, N., Uematsu, M., Okumura, H., Nakagawa, E., Ono, F., Hosoda, H., Oya, H.,
1222 Kojima, M., Kanmatsuse, K., and Kangawa, K. (2003). Cardiovascular and hormonal effects of
1223 subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy
1224 humans. *Clin. Sci. (Lond).* 105(4), 431-435.

1225 Erdur, L., Kallenbach-Dermutz, B., Lehmann, V., Zimmermann-Viehoff, F., Köpp, W., Weber, C.,
1226 and Deter, H.C. (2012) Somatic comorbidity in anorexia nervosa: First results of a 21-year follow-
1227 up study on female inpatients. *Biopsychosoc. Med.* 6(1), 4.

1228 España, R.A., Scammell, T.E. (2011). Sleep neurobiology from a clinical perspective. *Sleep* 34(7),
1229 845-858.

1230 Estour, B., Germain, N., Diconne, E., Frere, D., Cottet-Emard, J.M., Carrot, G., Lang, F., and Galusca,
1231 B. (2010). Hormonal profile heterogeneity and short-term physical risk in restrictive anorexia
1232 nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95(5), 2203-2210.

1233 Faje, A.T., Fazeli, P.K., Katzman, D.K., Miller, K.K., Breggia, A., Rosen, C.J., Mendes, N.,
1234 Klibanski, A., and Misra M. (2012). Sclerostin levels and bone turnover markers in adolescents
1235 with anorexia nervosa and healthy adolescent girls. *Bone* 51(3), 474-479.

1236 Faulconbridge, L.F., Cummings, D.E., Kaplan, J.M., and Grill, H.J. (2003). Hyperphagic effects of
1237 brainstem ghrelin administration. *Diabetes* 52, 2260 –2265.

1238 Fazeli, P.K., Lawson, E.A., Prabhakaran, R., Miller, K.K., Donoho, D.A., Clemmons, D.R., Herzog,
1239 D.B., Misra, M., and Klibanski, A. (2010a). Effects of recombinant human growth hormone in
1240 anorexia nervosa: a randomized, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 95(11), 4889-
1241 97.

1242 Fazeli, P.K., Misra, M., Goldstein, M., Miller, K.K., and Klibanski A. (2010b). Fibroblast growth
1243 factor-21 may mediate growth hormone resistance in anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
1244 95(1), 369-374.

1245 Fernández-Fernández, R., Tena-Sempere, M., Navarro, V.M., Barreiro, M.L., Castellano, J.M.,
1246 Aguilar, E., and Pinilla, L. (2005). Effects of ghrelin upon gonadotropin-releasing hormone and
1247 gonadotropin secretion in adult female rats: in vivo and in vitro studies. *Neuroendocrinology* 82(5-
1248 6), 245-55.

1249 Ferron, F., Considine, R.V., Peino, R., Lado, I.G., Dieguez, C., Casanueva, F.F. (1997). Serum leptin
1250 concentrations in patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa and nonspecific eating disorders
1251 correlate with the body mass index but are independent of the respective disease. *Clin. Endocrinol.*
1252 46, 289-293.

1253 Fisher, M. (2003). The course and outcome of eating disorders in adults and in adolescents: a review.
1254 *Adolesc. Med.* 14(1), 149-58.

1255 Forbes, S., Li, X.F., Kinsey-Jones, J., and O'Byrne, K. (2009). Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA
1256 expression in the hypothalamic medial preoptic area and pul- satile luteinising hormone secretion
1257 in the female rat. *Neurosci. Lett.* 460, 143–7.

1258 Fujimoto, S., Inui, A., Kiyota, N., Seki, W., Koide, K., Takamiya, S., Uemoto, M., Nakajima, Y.,
1259 Baba, .S, and Kasuga, M. (1997). Increased cholecystokinin and pancreatic polypeptide responses
1260 to a fat-rich meal in patients with restrictive but not bulimic anorexia nervosa. *Biol. Psychiatry* ;41,
1261 1068-1070.

1262 Fujitsuka, N., Asakawa, A., Amitani, H., Fujimiya, M., and Inui, A. (2012). Ghrelin and
1263 gastrointestinal movement. *Methods Enzymol.* 514, 289-301.

1264 Fukushima, N., Hanada, R., Teranishi, H., Fukue, Y., Tachibana, T., Ishikawa, H., Takeda, S.,
1265 Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kangawa, K., Nagata, K., and Kojima, M. (2005). Ghrelin directly
1266 regulates bone formation. *J. Bone Miner. Res.* 20(5), 790-8.

1267 Galusca, B., Bossu, C., Germain, N., Kadem, M., Frere, D., Lafage-Proust, M.H., Lang, F., and
1268 Estour, B. (2006). Age-related differences in hormonal and nutritional impact on lean anorexia
1269 nervosa bone turnover uncoupling. *Osteoporos. Int.* 17(6), 888-896.

1270 Galusca, B., Jeandel, L., Germain, N., Alexandre, D., Leprince, J., Anouar, Y., Estour, B., and
1271 Chartrel, N. (2012). Orexigenic neuropeptide 26RFa: new evidence for an adaptive profile of
1272 appetite regulation in anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97(6), 2012-2018.

- 1273 Gao, X.B. (2012). Plasticity in neurons synthesizing wake/arousal promoting hormone
1274 hypocretin/orexin. *Vitam. Horm.* 89, 35-59.
- 1275 Garcia, F., D., Délavenne, H., and Déchelotte, P. (2011). Atypical eating disorders a review. *Nutrition*
1276 *and Dietary Supplements* 3, 67-75.
- 1277 Gauna, C., Delhanty, P.J., Hofland, L.J., Janssen, J.A., Broglio, F., Ross, R.J., Ghigo, E., and van der
1278 Lely, A.J. (2005). Ghrelin stimulates, whereas des-octanoyl ghrelin inhibits, glucose output by
1279 primary hepatocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90(2), 1055-60.
- 1280 Gelegen, C., Collier, D.A., Campbell, I.C., Oppelaar, H., van den Heuvel, J., Adan, R.A., and Kas,
1281 M.J. (2007). Difference in susceptibility to activity-based anorexia in two inbred strains of mice.
1282 *Eur. Neuropsychopharmacol.* 17(3), 199-205.
- 1283 Gendall, K.A., Kaye, W.H., Altemus, M., McConaha, C.W., and La Via, M.C. (1999). Leptin,
1284 neuropeptide Y, and peptide YY in long-term recovered eating disorder patients. *Biol. Psychiatry*
1285 46(2), 292-299.
- 1286 Geraciotti, T.D. Jr., Liddle, R.A., Altemus, M., Demitrack, M.A., and Gold, P.W. (1992). Regulation of
1287 appetite and cholecystokinin secretion in anorexia nervosa. *Am. J. Psychiatry* 149, 958-961.
- 1288 Germain, N., Galusca, B., Le Roux, C.W., Bossu, C., Ghatei, M.A., Lang, F., Bloom, S.R., and Estour,
1289 B. (2007). Constitutional thinness and lean anorexia nervosa display opposite concentrations of
1290 peptide YY, glucagon-like peptide 1, ghrelin, and leptin. *Am. J. Clin. Nutr.* 85(4), 967-971.
- 1291 Germain, N., Galusca, B., Grouselle, D., Frere, D., Tolle, V., Zizzari, P., Lang, F., Epelbaum, J., and
1292 Estour, B. (2009). Ghrelin/obestatin ratio in two populations with low bodyweight: constitutional
1293 thinness and anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 34(3), 413-419.
- 1294 Germain, N., Galusca, B., Grouselle, D., Frere, D., Billard, S., Epelbaum, J., and Estour, B. (2010).
1295 Ghrelin and obestatin circadian levels differentiate bingeing-purging from restrictive anorexia
1296 nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95(6), 3057-3062.
- 1297 Gerner, R.H., and Gwirtsman, H.E. (1981). Abnormalities of dexamethasone suppression test and
1298 urinary
1299 MHPG in anorexia nervosa. *Am. J. Psychiatry* 138(5), 650-653.
- 1300 Gerner, R.H., and Sharp, B. (1982a). CSF beta-endorphin-immunoreactivity in normal, schizophrenic,
1301 depressed, manic and anorexic subjects. *Brain Res.* 237(1), 244-247.
- 1302 Gerner, R.H., and Yamada, T. (1982b). Altered neuropeptide concentrations in cerebrospinal fluid of
1303 psychiatric patients. *Brain Res.* 238(1), 298-302.
- 1304 Gianotti, L., Pincelli, A.I., Scacchi, M., Rolla, M., Bellitti, D., Arvat, E., Lanfranco, F., Torsello, A.,
1305 Ghigo, E., Cavagnini, F., and Müller, E.E. (2000). Effects of recombinant human insulin-like
1306 growth factor I administration on spontaneous and growth hormone (GH)-releasing hormone-
1307 stimulated GH secretion in anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85(8), 2805-2809.
- 1308 Gnanapavan, S., Kola, B., Bustin, S.A., Morris, D.G., McGee, P., Fairclough, P., Bhattacharya, S.,
1309 Carpenter, R., Grossman, A.B., and Korbonits, M. (2002). The tissue distribution of the mRNA of
1310 ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87(6), 2988.
- 1311 Gniuli, D., Liverani, E., Capristo, E., Greco, A.V., and Mingrone, G. (2001). Blunted glucose
1312 metabolism in anorexia nervosa. *Metabolism* 50, 876-881.
- 1313 González, C.R., Vázquez, M.J., López, M., and Diéguez, C. (2008). Influence of chronic
1314 undernutrition and leptin on GOAT mRNA levels in rat stomach mucosa. *J. Mol. Endocrinol.*
1315 41(6), 415-21.
- 1316 Goodman, A. (1990). Addiction: Definition and implications. *Br. J. Addiction* 85, 1403-1408.
- 1317 Goodyear, S., Arasardnam, R.P., Quraishi, N., Mottershead, M., and Nwokolo, C.U. (2010). Acylated
1318 and des acyl ghrelin in human portal and systemic circulations. *Mol. Biol. Rep.* 37(8), 3697-3701.
- 1319 Gordon, C.M., Goodman, E., Emans, S.J., Grace, E., Becker, K.A., Rosen, C.J., Gundberg, C.M., and
1320 Leboff, M.S. (2002). Physiologic regulators of bone turnover in young women with anorexia
1321 nervosa. *J. Pediatr.* 141(1), 64-70.
- 1322 Gourcerol, G., St-Pierre, D.H., and Tache, Y. (2007). Lack of obestatin effects on food intake: should
1323 obestatin be renamed ghrelin-associated peptide (GAP)? *Regul. Pept.* 141, 1-7.

- 1324 Grinspoon, S., Miller, K., Coyle, C., Krempin, J., Armstrong, C., Pitts, S., Herzog, D., and Klibanski,
1325 A. (1999). Severity of osteopenia in estrogen-deficient women with anorexia nervosa and
1326 hypothalamic amenorrhea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84(6), 2049-2055.
- 1327 Grinspoon, S., Thomas, E., Pitts, S., Gross, E., Mickley, D., Miller, K., Herzog, D., and Klibanski, A.
1328 (2000). Prevalence and predictive factors for regional osteopenia in women with anorexia nervosa.
1329 *Ann. Intern. Med.* 133(10), 790-794.
- 1330 Grove, K.L., and Cowley, M.A. (2005). Is ghrelin a signal for the development of metabolic systems?
1331 *J. Clin. Invest.* 115(12), 3393-3397.
- 1332 Guan, X.M., Yu, H., Palyha, O.C., McKee, K.K., Feighner, S.D., Sirinathsinghji, D.J., Smith, R.G.,
1333 Van der Ploeg, L.H., and Howard, A.D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth
1334 hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Mol. Brain Res.* 48(1), 23-29.
- 1335 Gutierrez, J.A., Solenberg, P.J., Perkins, D.R., Willency, J.A., Knierman, M.D., Jin, Z., Witcher, D.R.,
1336 Luo, S., Onyia, J.E., and Hale, J.E. (2008). Ghrelin octanoylation mediated by an orphan lipid
1337 transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 6320-6325.
- 1338 Haas, V., Onur, S., Paul, T., Nutzinger, D.O., Bosy-Westphal, A., Hauer, M., Brabant, G., Klein, H.,
1339 and Muller, M.J. (2005). Leptin and body weight regulation in patients with anorexia nervosa
1340 before and during weight recovery. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 889-896.
- 1341 Haas, V.K., Kohn, M.R., Clarke, S.D., Allen, J.R., Madden, S., Müller, M.J., and Gaskin, K.J. (2009).
1342 Body composition changes in female adolescents with anorexia nervosa. *Am. J. Clin. Nutr.* 89(4),
1343 1005-1010.
- 1344 Hansson, C., Haage, D., Taube, M., Egecioglu, E., Salomé, N., and Dickson, S.L. (2011). Central
1345 administration of ghrelin alters emotional responses in rats: behavioural, electrophysiological and
1346 molecular evidence. *Neuroscience* 180, 201-211.
- 1347
- 1348 Hall, J.F., and Hanford, P.V. (1954). Activity as a function of a restricted feeding schedule. *J. Comp.*
1349 *Physiol. Psychol.* 47(5), 362-373.
- 1350 Haluzíková, D., Dostálová, I., Kaválková, P., Roubíček, T., Mráz, M., Papezová, H., Haluzík, M.
1351 (2009). Serum concentrations of adipocyte fatty acid binding protein in patients with anorexia
1352 nervosa. *Physiol. Res.* 58(4), 577-581.
- 1353 Harada, T., Nakahara, T., Yasuhara, D., Kojima, S., Sagiya, K., Amitani, H., Laviano, A., Naruo,
1354 T., and Inui, A. (2008). Obestatin, acyl ghrelin, and des-acyl ghrelin responses to an oral glucose
1355 tolerance test in the restricting type of anorexia nervosa. *Biol. Psychiatry.* 63(2), 245-247.
- 1356 Harrold, J.A., Dovey, T., Cai, X.J., Halford, J.C., and Pinkney, J. (2008). Autoradiographic analysis of
1357 ghrelin receptors in the rat hypothalamus. *Brain Res.* 1196, 59-64.
- 1358 Hasan, T.F., and Hasan, H. (2011). Anorexia nervosa: a unified neurological perspective. *Int. J. Med.*
1359 *Sci.* 8(8), 679-703.
- 1360 Hassouna, R., Zizzari, P., Tolle, V. (2010). The ghrelin/obestatin balance in the physiological and
1361 pathological control of growth hormone secretion, body composition and food intake. *J.*
1362 *Neuroendocrinol.* 22(7), 793-804.
- 1363 Hataya, Y., Akamizu, T., Takaya, K., Kanamoto, N., Ariyasu, H., Saijo, M., Moriyama, K., Shimatsu,
1364 A., Kojima, M., Kangawa, K., and Nakao, K. (2001). A low dose of ghrelin stimulates growth
1365 hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans. *J. Clin. Endocrinol.*
1366 *Metab.* 86, 4552.
- 1367 Hebebrand, J., Blum, W.F., Barth, N., Coners, H., Englaro, P., Juul, A., Ziegler, A., Warnke, A.,
1368 Rascher, W., and Remschmidt, H. (1997). Leptin levels in patients with anorexia nervosa are
1369 reduced in the acute stage and elevated upon short-term weight restoration. *Mol. Psychiatry* 2, 330-
1370 334.
- 1371 Heer, M., Mika, C., Grzella, I., Heussen, N., and Herpertz-Dahlmann, B. (2004). Bone turnover during
1372 inpatient nutritional therapy and outpatient follow-up in patients with anorexia nervosa compared
1373 with that in healthy control subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* 80(3), 774-781.

- 1374 Hewson, A.K., and Dickson, S.L. (2000). Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1
1375 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J. Neuroendocrinol.* 12(11),
1376 1047-1049.
- 1377 Hewson, A.K., Viltart, O., McKenzie, D.N., Dyball, R.E., and Dickson, S.L (1999). GHRP-6-induced
1378 changes in electrical activity of single cells in the arcuate, ventromedial and periventricular nucleus
1379 neurones [correction of nuclei] of a hypothalamic slice preparation in vitro. *J. Neuroendocrinol.*
1380 11(12), 919-923. Erratum in: *J. Neuroendocrinol.* (2000) 12(4):377.
- 1381 Holst, B., and Schwartz, T.W. (2006). Ghrelin receptor mutations--too little height and too much
1382 hunger. *J. Clin. Invest.* 116(3), 637-641.
- 1383 Holst, B., Holliday, N.D., Bach, A., Elling, C.E., Cox, H.M., and Schwartz, T.W. (2004). Common
1384 structural basis for constitutive activity of the ghrelin receptor family. *J. Biol. Chem.* 279(51),
1385 53806-53817.
- 1386 Holtkamp, K., Hebebrand, J., Mika, C., Grzella, I., Heer, M., Heussen, N., and Herpertz-Dahlmann, B.
1387 (2003a). The effect of therapeutically induced weight gain on plasma leptin levels in patients with
1388 anorexia nervosa. *J. Psychiat. Res.* 37, 165-169.
- 1389 Holtkamp, K., Mika, C., Grzella, I., Heer, M., Pak, H., Hebebrand, J., and Herpertz-Dahlmann, B.
1390 (2003b). Reproductive function during weight gain in anorexia nervosa. Leptin represents a
1391 metabolic gate to gonadotropin secretion. *J. Neural. Transm.* 110(4), 427-435.
- 1392 Holtkamp, K., Hebebrand, J., Mika, C., Heer, M., Heussen, N., and Herpertz-Dahlmann, B. (2004).
1393 High serum leptin levels subsequent to weight gain predict renewed weight loss in patients with
1394 anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 29, 791-797.
- 1395 Hotta, M., Ohwada, R., Akamizu, T., Shibasaki, T., Takano, K., and Kangawa, K. (2009). Ghrelin
1396 increases hunger and food intake in patients with restricting-type anorexia nervosa: a pilot study.
1397 *Endocr. J.* 56, 1119-1128.
- 1398 Hotta, M., Shibasaki, T., Masuda, A., Imaki, T., Demura, H., Ling, N., and Shizume, K. (1986). The
1399 responses of plasma adrenocorticotropin and cortisol to corticotropin-releasing hormone (CRH)
1400 and cerebrospinal fluid immunoreactive CRH in anorexia nervosa patients. *J. Clin. Endocrinol.*
1401 *Metab.* 62, 319-324.
- 1402 Hotta, M., Ohwada, R., Katakami, H., Shibasaki, T., Hizuka, N., and Takano, K. (2004). Plasma levels
1403 of intact and degraded ghrelin and their responses to glucose infusion in anorexia nervosa. *J. Clin.*
1404 *Endocrinol. Metab.* 89, 5707-5712.
- 1405 Housova, J., Anderlova, K., Krizova, J., Haluzikova, D., Kremen, J., Kumstyrova, T., Papezova, H.,
1406 and Haluzik, M. (2005). Serum adiponectin and resistin concentrations in patients with restrictive
1407 and binge/purge form of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90,
1408 1366-1370.
- 1409 Howard, A.D., Feighner, S.D., Cully, D.F., Arena, J.P., Liberators, P.A., Rosenblum, C.I., Hamelin,
1410 M., Hreniuk, D.L., Palyha, O.C., Anderson, J., Paress, P.S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K.K., McKee,
1411 K.K., Pong, S.S., Chung, L.Y., Elbrecht, A., Dashkevich, M., Heavens, R., Rigby, M.,
1412 Sirinathsinghji, D.J., Dean, D.C., Melillo, D.G., Patchett, A.A., Nargund, R., Griffin, P.R.,
1413 DeMartino, J.A., Gupta, S.K., Schaeffer, J.M., Smith, R.G., and Van der Ploeg L.H. (1996). A
1414 receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*
1415 273(5277), 974-977.
- 1416 Howgate, D.J., Graham, S.M., Leonidou, A., Korres, N., Tsiridis, E., and Tsapakis, E. (2012). Bone
1417 metabolism in anorexia nervosa: molecular pathways and current treatment modalities. *Osteoporos.*
1418 *Int.* Epub 2012 Aug 9.
- 1419 Invitti, C., Brunani, A., Pasqualinotto, L., Dubini, A., Bendinelli, P., Maroni, P., and Cavagnini, F.
1420 (1995). Plasma galanin concentrations in obese, normal weight and anorectic women. *Int. J. Obes.*
1421 *Relat. Metab. Disord.* 19(5), 347-349.

- 1422 Iwahashi, H., Funahashi, T., Kurokawa, N., Sayama, K., Fukuda, E., Okita, K., Imagawa, A.,
1423 Yamagata, K., Shimomura, I., Miyagawa, J.I., and Matsuzawa, Y. (2003). Plasma adiponectin
1424 levels in women with anorexia nervosa. *Horm. Metab. Res.* 35(9), 537-540.
- 1425 Jacquemont, S., Reymond, A., Zufferey, F., Harewood, L., *et al.* (2011). Mirror extreme BMI
1426 phenotypes associated with gene dosage at the chromosome 16p11.2 locus. *Nature* 478(7367), 97-
1427 102.
- 1428 Janas-Kozik, M., Krupka-Matuszczyk, I., Malinowska-Kolodziej, I., and Lewin-Kowalik, J. (2007).
1429 Total ghrelin plasma level in patients with the restrictive type of anorexia nervosa. *Regul. Pept.*
1430 140, 43-46.
- 1431 Jáuregui-Garrido, B., and Jáuregui-Lobera, I. (2012). Sudden death in eating disorders. *Vasc. Health*
1432 *Risk Manag.* 8, 91-8.
- 1433 Jeffery, P.L., Duncan, R.P., Yeh, A.H., Jaskolski, R.A., Hammond, D.S., Herington, A.C., and
1434 Chopin, L.K. (2005). Expression of the ghrelin axis in the mouse: an exon 4-deleted mouse
1435 proghrelin variant encodes a novel C terminal peptide. *Endocrinology* 146(1), 432-40.
- 1436 Jerlhag, E., Egecioglu, E., Dickson, S.L., Andersson, M., Svensson, L., and Engel, J.A. (2006).
1437 Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic
1438 systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addict Biol.* 11(1):45-54.
- 1439 Jerlhag, E., Egecioglu, E., Dickson, S.L., Douhan, A., Svensson, L., and Engel, J.A. (2007). Ghrelin
1440 administration into tegmental areas stimulates locomotor activity and increases extracellular
1441 concentration of dopamine in the nucleus accumbens. *Addict. Biol.* 12, 6–16.
- 1442 Jerlhag, E., Egecioglu, E., Landgren, S., Salomé, N., Heilig, M., Moechars, D., Datta, R., Perrissoud,
1443 D., Dickson, S.L., and Engel, J.A. (2009). Requirement of central ghrelin signaling for alcohol
1444 reward. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11318– 11323.
- 1445 Jerlhag, E., Egecioglu, E., Dickson, S.L., and Engel, J.A. (2010). Ghrelin receptor antagonism
1446 attenuates cocaine- and amphetamine-induced locomotor stimulation, accumbal dopamine
1447 release, and conditioned place preference. *Psychopharmacology (Berl)* 211, 415–422.
- 1448 Jiang, H., Betancourt, L., and Smith, R.G. (2006). Ghrelin amplifies dopamine signaling by cross talk
1449 involving formation of growth hormone secretagogue receptor/dopamine receptor subtype 1
1450 heterodimers. *Mol. Endocrinol.* 20(8), 1772-1785.
- 1451 Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2000). Central
1452 effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene
1453 expression. *Endocrinology* 141(12), 4797-4780.
- 1454 Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., and Wakabayashi, I. (2001). Chronic
1455 central infusion of ghrelin increases hypothalamic neuropeptide Y and agouti-related protein
1456 mRNA levels and body weight in rats. *Diabetes* 50 (11), 2438-2443
- 1457 Kang, K., Schmahl, J., Lee, J.M., Garcia, K., Patil, K., Chen, A., Keene, M., Murphy, A., and
1458 Sleeman, M.W. (2012). Mouse ghrelin-O-acyltransferase (GOAT) plays a critical role in bile acid
1459 reabsorption. *FASEB J.* 26(1), 259-71.
- 1460 Karczewska-Kupczewska, M., Straczkowski, M., Adamska, A., Nikolajuk, A., Otziomek, E., Górska,
1461 M., and Kowalska, I. (2010). Insulin sensitivity, metabolic flexibility, and serum adiponectin
1462 concentration in women with anorexia nervosa. *Metabolism* 59, 473-477.
- 1463 Karczewska-Kupczewska, M., Kowalska, I., Nikolajuk, A., Adamska, A., Otziomek, E., Górska, M.,
1464 and Straczkowski, M. (2012). Hyperinsulinemia acutely increases serum macrophage inhibitory
1465 cytokine-1 concentration in anorexia nervosa and obesity. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 76(1), 46-50.
- 1466 Kawahara, Y., Kawahara, H., Kaneko, F., Yamada, M., Nishi, Y., Tanaka, E., and Nishi, A. (2009).
1467 Peripherally administered ghrelin induces bimodal effects on the mesolimbic dopamine system
1468 depending on food-consumptive states. *Neuroscience* 161, 855–864.
- 1469 Kaye, W.H. (1996). Neuropeptide abnormalities in anorexia nervosa. *Psychiatry Res.* 62, 65-74.

- 1470 Kaye, W.H., Berrettini, W., Gwirtsman, H., and George, D.T. (1990). Altered cerebrospinal fluid
1471 neuropeptide Y and peptide YY immunoreactivity in anorexia and bulimia nervosa. *Arch. Gen.*
1472 *Psychiatry* 47(6), 548-556.
- 1473 Kaye, W.H., Gwirtsman, H.E., George, D.T., Ebert, M.H., Jimerson, D.C., Tomai, T.P., Chrousos,
1474 G.P., and Gold P.W. (1987). Elevated cerebrospinal fluid levels of immunoreactive corticotrophin-
1475 releasing hormone in anorexia nervosa: relation to state of nutrition, adrenal function and intensity
1476 of depression. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64, 203-208.
- 1477 Kaye, W.H., Rubinow, D., Gwirtsman, H.E., George, D.T., Jimerson, D.C., and Gold, P.W. (1988).
1478 CSF somatostatin in anorexia nervosa and bulimia: relationship to the hypothalamic pituitary-
1479 adrenal cortical axis. *Psychoneuroendocrinology* 13(3), 265-272.
- 1480 Kaye, W.H., Fudge, J.L., and Paulus, M. (2009). New insights into symptoms and neuro- circuit
1481 function of anorexia nervosa. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 573–84.
- 1482 Kern, A., Albarran-Zeckler, R., Walsh, H.E., and Smith, R.G. (2012). Apo-ghrelin receptor forms
1483 heteromers with DRD2 in hypothalamic neurons and is essential for anorexigenic effects of DRD2
1484 agonism. *Neuron* 73(2), 317-332.
- 1485 Kim, S.F. (2012). Animal models of eating disorders. *Neuroscience.* 211, 2-12.
- 1486 Kinzig, K.P., Coughlin, J.W., Redgrave, G.W., Moran, T.H., and Guarda, A.S. (2007). Insulin,
1487 glucose, and pancreatic polypeptide responses to a test meal in restricting type anorexia nervosa
1488 before and after weight restoration. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E1441-E1446.
- 1489 Kleinz, M.J., Maguire, J.J., Skepper, J.N., and Davenport, A.P. (2006). Functional and
1490 immunocytochemical evidence for a role of ghrelin and des-octanoyl ghrelin in the regulation of
1491 vascular tone in man. *Cardiovasc. Res.* 69(1), 227-235.
- 1492 Klenotich, S.J., and Dulawa, S.C. (2012). The activity-based anorexia mouse model. *Methods Mol.*
1493 *Biol.* 829, 377-393.
- 1494 Kluge, M., Schüssler, P., Schmidt, D., Uhr, M., and Steiger, A. (2012). Ghrelin suppresses secretion of
1495 luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) in women. *J. Clin. Endocrinol.*
1496 *Metab.* 97(3), E448-51.
- 1497 Kohl, M., Foulon, C., Guelfi, J.D. (2004). Hyperactivity and anorexia nervosa: behavioural and
1498 biological perspective. *Encephale* 30(5), 492-9
- 1499 Kojima, M., and Kangawa, K. (2005). Ghrelin: structure and function. *Physiol. Rev.* 85(2), 495-522.
- 1500 Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a
1501 growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762), 656-60.
- 1502 Krizova, J., Papezova, H., Haluzikova, D., Parizkova, J., Jiskra, J., Kotrlikova, E., Haas, T., and
1503 Haluzik, M. (2002). Soluble leptin receptor levels in patients with anorexia nervosa. *Endocr. Res.*
1504 28, 199-205.
- 1505 Krsek, M., Rosicka, M., Papezova, H., Krizova, J., Kotrlikova, E., Haluzk, M., Justova, V., Lacinova,
1506 Z., and Jarkovska, Z.. (2003). Plasma ghrelin levels and malnutrition: a comparison of two
1507 etiologies. *Eat. Weight Disord.* 8, 207-211.
- 1508 Kukkonen, J.P. (2012). Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012. *Am. J.*
1509 *Physiol. Cell Physiol.* 2012 Oct 3. [Epub ahead of print]
- 1510 Lamont, E.W., Patterson, Z., Rodrigues, T., Vallejos, O., Blum, I.D., and Abizaid, A. (2012). Ghrelin-
1511 deficient mice have fewer orexin cells and reduced cFOS expression in the mesolimbic dopamine
1512 pathway under a restricted feeding paradigm. *Neuroscience.* 218, 12-19.
- 1513 Lauer, C.J., and Krieg, J.C. (2004). Sleep in eating disorders. *Sleep Med. Rev.* 8(2):109-118.
- 1514 Lawrence, C.B., Snape, A.C., Baudoin, F.M., and Luckman, S.M. (2002). Acute central ghrelin and
1515 GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers. *Endocrinology* 143, 155–162.

- 1516 Lawson, E.A., and Klibanski, A. (2008). Endocrine abnormalities in anorexia nervosa. *Nat. Clin.*
1517 *Pract. Endocrinol. Metab.* 4(7), 407-414.
- 1518 Lawson, E.A., Donoho, D., Miller, K.K., Misra, M., Meenaghan, E., Lydecker, J., Wexler, T., Herzog,
1519 D.B., and Klibanski, A. (2009). Hypercortisolemia is associated with severity of bone loss and
1520 depression in hypothalamic amenorrhea and anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94,
1521 4710–4716.
- 1522 Lawson, E.A., Donoho, D.A., Blum, J.I., Meenaghan, E.M., Misra, M., Herzog, D.B., Sluss, P.M.,
1523 Miller, K.K., and Klibanski, A. (2011a). Decreased nocturnal oxytocin levels in anorexia nervosa
1524 are associated with low bone mineral density and fat mass. *J. Clin. Psychiatry* 72(11), 1546-1551.
- 1525 Lawson, E.A., Eddy, K.T., Donoho, D., Misra, M., Miller, K.K., Meenaghan, E., Lydecker, J., Herzog,
1526 D., and Klibanski, A. (2011b). Appetite-regulating hormones cortisol and peptide YY are
1527 associated with disordered eating psychopathology, independent of body mass index. *Eur. J.*
1528 *Endocrinol.* 164(2), 253-261.
- 1529 Lawson, E.A., Holsen, L.M., Santin, M., Meenaghan, E., Eddy, K.T., Becker, A.E., Herzog, D.B.,
1530 Goldstein, J.M., and Klibanski, A. (2012). Oxytocin Secretion Is Associated with Severity of
1531 Disordered Eating Psychopathology and Insular Cortex Hypoactivation in Anorexia Nervosa. *J.*
1532 *Clin. Endocrinol. Metab.* 97(10), E1898-E1908.
- 1533 Legroux-Gerot, I., Vignau, J., Collier, F., and Cortet, B. (2005). Bone loss associated with anorexia
1534 nervosa. *Joint Bone Spine* 72(6), 489-495.
- 1535 Legroux-Gerot, I., Vignau, J., Collier, F., and Cortet, B. (2008). Factors influencing changes in bone
1536 mineral density in patients with anorexia nervosa-related osteoporosis: the effect of hormone
1537 replacement therapy. *Calcif. Tissue Int.* 83(5), 315-323.
- 1538 Legroux-Gérot, I., Vignau, J., D'Herbomez, M., Collier, F., Marchandise, X., Duquesnoy, B., and
1539 Cortet, B. (2007). Evaluation of bone loss and its mechanisms in anorexia nervosa. *Calcif. Tissue*
1540 *Int.* 81(3), 174-182.
- 1541 Lesem, M.D., Berrettini, W.H., Kaye, W.H., and Jimerson, D.C. (1991). Measurement of CSF
1542 dynorphin A 1-8 immunoreactivity in anorexia nervosa and normal-weight bulimia. *Biol.*
1543 *Psychiatry* 29, 244-252.
- 1544 Lesem, M.D., Kaye, W.H., Bissette, G., Jimerson, D.C., and Nemeroff, C.B. (1994). Cerebrospinal
1545 fluid TRH immunoreactivity in anorexia nervosa. *Biol. Psychiatry* 35(1), 48-53.
- 1546 López, M., Lage, R., Saha, A.K., Pérez-Tilve, D., Vázquez, M.J., Varela, L., Sangiao-Alvarellos, S.,
1547 Tovar, S., Raghay, K., Rodríguez-Cuenca, S., Deoliveira, R.M., Castañeda, T., Datta, R., Dong,
1548 J.Z., Culler, M., Sleeman, M.W., Alvarez, C.V., Gallego, R., Lelliott, C.J., Carling, D., Tschöp,
1549 M.H., Diéguez, C., and Vidal-Puig, A. (2008). Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the
1550 orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab.* 7(5), 389-399.
- 1551 Löwe, B., Zipfel, S., Buchholz, C., Dupont, Y., Reas, D.L., and Herzog, W. (2001). Long-term
1552 outcome of anorexia nervosa in a prospective 21-year follow-up study. *Psychol. Med.* 31(5), 881-
1553 890.
- 1554 Lucas, A.R., Beard, C.M., O'Fallon, W.M., and Kurland, L.T. (1991). 50-year trends in the incidence
1555 of anorexia nervosa in Rochester, Minn.: a population-based study. *Am. J. Psychiatry* 148(7), 917-
1556 922.
- 1557 Lucas, A.R., Melton, L.J. III, Crowson, C.S., and O'Fallon, W.M. (1999). Long-term frac- ture risk
1558 among women with anorexia nervosa: a population-based co- hort study. *Mayo Clin. Proc.* 74,
1559 972–977.
- 1560 Luckman, S.M., Rosenzweig, I., and Dickson, S.L. (1999). Activation of arcuate nucleus neurons by
1561 systemic administration of leptin and growth hormone-releasing peptide-6 in normal and fasted
1562 rats. *Neuroendocrinology.* 70(2), 93-100.

- 1563 Luquet, S., Perez, F.A., Hnasko, T.S., and Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for
1564 feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310(5748), 683-685.
- 1565 Luquet, S., Phillips, C.T., and Palmiter, R.D. (2007). NPY/AgRP neurons are not essential for feeding
1566 responses to glucoprivation. *Peptides* 28(2), 214-225.
- 1567 Lutter, M., Sakata, I., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., Anderson, J.G., Jung, S., Birnbaum, S.,
1568 Yanagisawa, M., Elmquist, J.K., Nestler, E.J., and Zigman, J.M. (2008). The orexigenic hormone
1569 ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nat. Neurosci.* 11(7), 752-763.
- 1570 Malik, S., McGlone, F., Bedrossian, D., and Dagher, A. (2008). Ghrelin modulates brain activity in
1571 areas that control appetitive behavior. *Cell Metab.* 7, 400-509.
- 1572 Maltais, L.J., Lane, P.W., and Beamer, W.G. (1984). Anorexia, a recessive mutation causing
1573 starvation in preweanling mice. *J. Hered.* 75(6), 468-472.
- 1574 Mano-Otagiri A, Ohata, H., Iwasaki-Sekino, A., Nemoto, T., and Shibasaki, T. (2009). Ghrelin
1575 suppresses noradrenaline release in the brown adipose tissue of rats. *J. Endocrinol.* 201(3), 341-
1576 349.
- 1577 Mantzoros, C., Flier, J.S., Lesem, M.D., Brewerton, T.D., and Jimerson, D.C.. (1997). Cerebrospinal
1578 fluid leptin in anorexia nervosa: correlation with nutritional status and potential role in resistance to
1579 weight gain. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 1845-1851.
- 1580 Martini, A.C., Fernández-Fernández, R., Tovar, S., Navarro, V.M., Vigo, E., Vazquez, M.J., Davies,
1581 J.S., Thompson, N.M., Aguilar, E., Pinilla, L., Wells, T., Dieguez, C., and Tena-Sempere, M.
1582 (2006). Comparative analysis of the effects of ghrelin and unacylated ghrelin on luteinizing
1583 hormone secretion in male rats. *Endocrinology* 147, 2374-2382.
- 1584 McKee, K.K., Tan, C.P., Palyha, O.C., Liu, J., Feighner, S.D., Hreniuk, D.L., Smith, R.G., Howard,
1585 A.D., and Van der Ploeg, L.H. (1997). Cloning and characterization of two human G protein-
1586 coupled receptor genes (GPR38 and GPR39) related to the growth hormone secretagogue and
1587 neurotensin receptors. *Genomics* 46(3), 426-434.
- 1588 Meczekalski, B., Podfigurna-Stopa, A., Warenik-Szymankiewicz, A., and Genazzani, A.R. (2008)
1589 Functional hypothalamic amenorrhea: current view on neuroendocrine aberrations. *Gynecol.*
1590 *Endocrinol.* 24(1), 4-11.
- 1591 Mercader, J.M., Ribasés, M., Gratacòs, M., González, J.R., Bayés, M., de Cid, R., Badía, A.,
1592 Fernández-Aranda, F., and Estivill, X. (2007). Altered brain-derived neurotrophic factor blood
1593 levels and gene variability are associated with anorexia and bulimia. *Genes Brain Behav.* 6, 706-
1594 716.
- 1595 Merkestein, M., Brans, M.A., Luijendijk, M.C., de Jong, J.W., Egecioglu, E., Dickson, S.L., and
1596 Adan, R.A. (2012). Ghrelin mediates anticipation to a palatable meal in rats. *Obesity* (Silver
1597 Spring) 20(5), 963-71.
- 1598 Merle, J.V., Haas, V., Burghardt, R., Döhler, N., Schneider, N., Lehmkuhl, U., and Ehrlich, S. (2011).
1599 Agouti-related protein in patients with acute and weight-restored anorexia nervosa. *Psychol. Med.*
1600 41(10), 2183-2192.
- 1601 Mika, C., Holtkamp, K., Heer, M., Günther, R.W., and Herpertz-Dahlmann, B. (2007). A 2-year
1602 prospective study of bone metabolism and bone mineral density in adolescents with anorexia
1603 nervosa. *J. Neural. Transm.* 114(12), 1611-1618.
- 1604 Miljic, D., Pekic, S., Djurovic, M., Doknic, M., Milic, N., Casanueva, F.F., Ghatei, M., and Popovic,
1605 V. (2006). Ghrelin has partial or no effect on appetite, growth hormone, prolactin, and cortisol
1606 release in patients with anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91(4), 1491-1495.
- 1607 Miljic, D., Pekic, S., Djurovic, M., Doknic, M., Milic, N., Casanueva, F.F., Ghatei, M., and Popovic,
1608 V. (2006). Ghrelin has partial or no effect on appetite, growth hormone, prolactin, and cortisol
1609 release in patients with anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91:1491-5.

1610 Miller, K.K. (2011). Endocrine dysregulation in anorexia nervosa update. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
1611 96, 2939-2949.

1612 Misra, M., and Klibanski, A. (2011). The Neuroendocrine Basis of Anorexia Nervosa and Its Impact
1613 on Bone Metabolism. *Neuroendocrinology* 93, 65–73.

1614 Misra, M., Miller, K.K., Bjornson, J., Hackman, A., Aggarwal, A., Chung, J., Ott, M., Herzog, D.B.,
1615 Johnson, M.L., and Klibanski, A. (2003). Alterations in growth hormone secretory dynamics in
1616 adolescent girls with anorexia nervosa and effects on bone metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
1617 88(12), 5615-5623.

1618 Misra, M., Miller, K.K., Almazan, C., Ramaswamy, K., Aggarwal, A., Herzog, D.B., Neubauer, G.,
1619 Breu, J., and Klibanski, A. (2004a). Hormonal and body composition predictors of soluble leptin
1620 receptor, leptin, and free leptin index in adolescent girls with anorexia nervosa and controls and
1621 relation to insulin sensitivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 3486-3495.

1622 Misra, M., Miller, K.K., Almazan, C., Ramaswamy, K., Lapcharoensap, W., Worley, M., Neubauer,
1623 G., Herzog, D.B., and Klibanski, A. (2004b). Alterations in cortisol secretory dynamics in
1624 adolescent girls with anorexia nervosa and effects on bone metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
1625 89(10), 4972-4980.

1626 Misra, M., Miller, K., Herzog, D., Ramaswamy, K., Aggarwal, A., Almazan, C., Neubauer, G., Breu, J.,
1627 and Klibanski, A. (2004c). Growth hormone and ghrelin responses to an oral glucose load in
1628 adolescent girls with anorexia nervosa and controls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(4), 1605-1612.

1629 Misra, M., Miller, K.K., Kuo, K., Griffin, K., Stewart, V., Hunter, E., Herzog, D.B., and Klibanski, A.
1630 (2005a). Secretory dynamics of leptin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy
1631 adolescents. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289, E373-E381.

1632 Misra, M., Miller, K.K., Stewart, V., Hunter, E., Kuo, K., Herzog, D.B., and Klibanski, A. (2005b).
1633 Ghrelin and bone metabolism in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *J.*
1634 *Clin. Endocrinol. Metab.* 90(9), 5082-5087.

1635 Misra, M., Miller, K.K., Kuo, K., Griffin, K., Stewart, V., Hunter, E., Herzog, D.B., and Klibanski, A.
1636 (2005c) Secretory dynamics of ghrelin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy
1637 adolescents. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 289(2), E347-E356.

1638 Misra, M., Miller, K.K., Tsai, P., Gallagher, K., Lin, A., Lee, N., Herzog, D.B., and Klibanski, A.
1639 (2006). Elevated peptide YY levels in adolescent girls with anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol.*
1640 *Metab.* 91(3), 1027-1033.

1641 Misra, M., Miller, K.K., Cord, J., Prabhakaran, R., Herzog, D.B., Goldstein, M., Katzman, D.K., and
1642 Klibanski, A. (2007). Relationships between serum adipokines, insulin levels, and bone density in
1643 girls with anorexia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92(6), 2046-2052.

1644 Misra, M., Prabhakaran, R., Miller, K.K., Goldstein, M.A., Mickley, D., Clauss, L., Lockhart, P.,
1645 Cord, J., Herzog, D.B., Katzman, D.K., and Klibanski, A. (2008). Prognostic indicators of changes
1646 in bone density measures in adolescent girls with anorexia nervosa-II. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
1647 93(4), 1292-1297.

1648 Modan-Moses, D., Stein, D., Pariente, C., Yaroslavsky, A., Ram, A., Faigin, M., Loewenthal, R.,
1649 Yissachar, E., Hemi, R., and Kanety, H. (2007). Modulation of adiponectin and leptin during
1650 refeeding of female anorexia nervosa patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92(5), 1843-1847.

1651 Modirrousta, M., Mainville, L., and Jones, B.E. (2005). Orexin and MCH neurons express c-Fos
1652 differently after sleep deprivation vs. recovery and bear different adrenergic receptors. *Eur. J.*
1653 *Neurosci.* 21(10), 2807-2816.

1654 Mokrosiński, J., and Holst, B. (2010). Modulation of the constitutive activity of the ghrelin receptor by
1655 use of pharmacological tools and mutagenesis. *Methods Enzymol.* 484, 53-73.

1656 Monteleone, P., Di Lieto, A., Tortorella, A., Longobardi, N., and Maj, M. (2000). Circulating leptin in
1657 patients with anorexia nervosa, bulimia nervosa or binge-eating disorder: relationship to body
1658 weight, eating patterns, psychopathology and endocrine changes. *Psychiatry Res.* 94, 121-129.

- 1659 Monteleone, P., Luisi, M., Colurcio, B., Casarosa, E., Monteleone, P., Ioime, R., Genazzani, A.R., and
1660 Maj, M. (2001). Plasma levels of neuroactive steroids are increased in untreated women with
1661 anorexia nervosa or bulimia nervosa. *Psychosom. Med.* 63(1), 62-68.
- 1662 Monteleone, P., Fabrazzo, M., Tortorella, A., Fuschino, A., and Maj, M. (2002a). Opposite
1663 modifications in circulating leptin and soluble leptin receptor across the eating disorder spectrum.
1664 *Mol. Psychiatry* 7, 641-646.
- 1665 Monteleone, P., Martiadis, V., Colurcio, B., and Maj, M. (2002b). Leptin secretion is related to
1666 chronicity and severity of the illness in bulimia nervosa. *Psychosom. Med.* 64, 874-879.
- 1667 Monteleone, P., Tortorella, A., Martiadis, V., Serritella, C., Fuschino, A., and Maj, M. (2004).
1668 Opposite changes in the serum brain-derived neurotrophic factor in anorexia nervosa and obesity.
1669 *Psychosom. Med.* 66, 744-748.
- 1670 Monteleone, P., Fabrazzo, M., Martiadis, V., Serritella, C., Pannuto, M., and Maj, M. (2005).
1671 Circulating brain-derived neurotrophic factor is decreased in women with anorexia and bulimia
1672 nervosa but not in women with binge-eating disorder: relationships to co-morbid depression,
1673 psychopathology and hormonal variables. *Psychol. Med.* 35, 897-905.
- 1674 Morita, S., and Miyata, S. (2012). Different vascular permeability between the sensory and secretory
1675 circumventricular organs of adult mouse brain. *Cell Tissue Res.* 349(2), 589-603.
- 1676 Moriya, J., Takimoto, Y., Yoshiuchi, K., Shimosawa, T., and Akabayashi, A. (2006). Plasma agouti-
1677 related protein levels in women with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 31(9), 1057-
1678 1061.
- 1679 Muccioli, G., Lorenzi, T., Lorenzi, M., Ghè, C., Arnoletti, E., Raso, G.M., Castellucci, M., Gualillo,
1680 O., and Meli, R. (2011). Beyond the metabolic role of ghrelin: a new player in the regulation of
1681 reproductive function. *Peptides* 32(12), 2514-2521.
- 1682 Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., and Dehouck, B. (2010). Differential distribution of tight
1683 junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult
1684 mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 518(7), 943-962.
- 1685 Muñoz-Calvo, M.T., Barrios, V., García de Alvaro, M.T., Lefort, M., Méndez-Dávila, C., Argente, J.,
1686 and de la Piedra, C. (2007). Maintained malnutrition produces a progressive decrease in
1687 (OPG)/RANKL ratio and leptin levels in patients with anorexia nervosa. *Scand. J. Clin. Lab.*
1688 *Invest.* 67(4), 387-393.
- 1689 Nakahara, T., Kojima, S., Tanaka, M., Yasuhara, D., Harada, T., Sagiya, K., Muranaga, T., Nagai,
1690 N., Nakazato, M., Nozoe, S., Naruo, T., and Inui, A. (2007). Incomplete restoration of the secretion
1691 of ghrelin and PYY compared to insulin after food ingestion following weight gain in anorexia
1692 nervosa. *J. Psychiatr. Res.* 41(10), 814-820.
- 1693 Nakahara, T., Harada, T., Yasuhara, D., Shimada, N., Amitani, H., Sakoguchi, T., Kamiji, M.M.,
1694 Asakawa, A., and Inui, A. (2008). Plasma obestatin concentrations are negatively correlated with
1695 body mass index, insulin resistance index, and plasma leptin concentrations in obesity and anorexia
1696 nervosa. *Biol. Psychiatry* 64(3), 252-255.
- 1697 Nakai, Y., Hosoda, H., Nin, K., Ooya, C., Hayashi, H., Akamizu, T., and Kangawa, K. (2003). Plasma
1698 levels of active form of ghrelin during oral glucose tolerance test in patients with anorexia nervosa.
1699 *Eur. J. Endocrinol.* 149, R1-R3.
- 1700 Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., and Matsukura, S.
1701 (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409, 194-198.
- 1702 Nakazato, M., Hashimoto, K., Shimizu, E., Kumakiri, C., Koizumi, H., Okamura, N., Mitsumori, M.,
1703 Komatsu, N., and Iyo, M. (2003). Decreased levels of serum brain-derived neurotrophic factor in
1704 female patients with eating disorders. *Biol. Psychiatry* 54, 485-490.
- 1705 Nakazato, M., Hashimoto, K., Yoshimura, K., Hashimoto, T., Shimizu, E., and Iyo, M. (2006). No
1706 change between the serum brain-derived neurotrophic factor in female patients with anorexia
1707 nervosa before and after partial weight recovery. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*
1708 30, 1117-1121.

- 1709 Nakazato, M., Tchanturia, K., Schmidt, U., Campbell, I.C., Treasure, J., Collier, D.A., Hashimoto, K.,
1710 and Iyo, M. (2009). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and set-shifting in currently ill and
1711 recovered anorexia nervosa (AN) patients. *Psychol. Med.* 39, 1029-1035.
- 1712 Naleid, A.M., Grace, M.K., Cummings, D.E., and Levine, A.S. (2005). Ghrelin induces feeding in the
1713 mesolimbic reward pathway between the ventral tegmental area and the nucleus accumbens.
1714 *Peptides* 26(11), 2274-2279
- 1715 Neary, N.M., Small, C.J., Wren, A.M., Lee, J.L., Druce, M.R., Palmieri, C., Frost, G.S., Ghatei, M.A.,
1716 Coombes, R.C., and Bloom, S.R. (2004). Ghrelin increases energy intake in cancer patients with
1717 impaired appetite: acute, randomized, placebo controlled trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89,
1718 2832-2836.
- 1719 Nedvidkova, J., Papezova, H., Haluzik, M., and Schreiber, V. (2000). Interaction between serum leptin
1720 levels and hypothalamo-hypophyseal-thyroid axis in patients with anorexia nervosa. *Endocr. Res.*
1721 26, 219-230.
- 1722 Nedvidkova, J., Krykorkova, I., Bartak, V., Papezova, H., Gold, P.W., Alesci, S., and Pacak, K.
1723 (2003). Loss of meal-induced decrease in plasma ghrelin levels in patients with anorexia nervosa.
1724 *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 1678-1682.
- 1725 Nemeroff, C.B., Bissette, G., Widerlov, E., Beckmann, H., Gerner, R., Manberg, P.J., Lindstrom, L.,
1726 Prange, A.J. Jr., and Gattaz, W.F. (1989). Neurotensin-like immunoreactivity in cerebrospinal fluid
1727 of patients with schizophrenia, depression, anorexia nervosa-bulimia, and premenstrual syndrome.
1728 *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 1(1), 16-20.
- 1729 Nestler, E.J. (1996). Under siege: The brain on opiates. *Neuron* 16, 897-900.
- 1730 Nikolopoulos, D., Theocharis, S., and Kouraklis, G. (2010). Ghrelin, another factor affecting bone
1731 metabolism. *Med. Sci. Monit.* 16(7), RA147-62.
- 1732 Nilsson, I.A., Thams, S., Lindfors, C., Bergstrand, A., Cullheim, S., Hökfelt, T., and Johansen, J.E.
1733 (2011). Evidence of hypothalamic degeneration in the anorectic anx/anx mouse. *Glia.* 59(1), 45-57.
- 1734 Nobili, L., Baglietto, M.G., Beelke, M., De Carli, F., Di Comite, R., Fiocchi, I., Rizzo, P., Veneselli,
1735 E., Savoini, M., Zanutto, E., and Ferrillo, F. (2004). Impairment of the production of delta sleep in
1736 anorectic adolescents. *Sleep* 27(8), 1553-1559.
- 1737 Nogal, P., Pniewska-Siark, B., and Lewiński, A. (2008). Evaluation of selected clinical and diagnostic
1738 parameters in girls with anorexia nervosa (I). *Neuro Endocrinol. Lett.* 29(4), 421-427.
- 1739 Nogueira, J.P., Maraninchi, M., Lorec, A.M., Corroller, A.B., Nicolay, A., Gaudart, J., Portugal, H.,
1740 Barone, R., Vialettes, B., and Valéro, R. (2010). Specific adipocytokines profiles in patients with
1741 hyperactive and/or binge/purge form of anorexia nervosa. *Eur. J. Clin. Nutr.* 64(8), 840-844.
- 1742 Nova, E., and Marcos, A. (2006). Immunocompetence to assess nutritional status in eating disorders.
1743 *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2(3), 433-444.
- 1744 Ogiso, K., Asakawa, A., Amitani, H., and Inui, A. (2011). Ghrelin and anorexia nervosa: a
1745 psychosomatic perspective. *Nutrition* 27(10), 988-993.
- 1746 Ohwada, R., Hotta, M., Oikawa, S., and Takano, K. (2006). Etiology of hypercholesterolemia in
1747 patients with anorexia nervosa. *Int. J. Eat. Disord.* 39(7), 598-601.
- 1748 Ohwada, R., Hotta, M., Sato, K., Shibasaki, T., and Takano, K. (2007). The relationship between
1749 serum levels of estradiol and osteoprotegerin in patients with anorexia nervosa. *Endocr. J.* 54(6),
1750 953-959.
- 1751 Olatunji, B.O., Broman-Fulks, J.J., Ciesielski, B.G., Zawilinski, L.L., Shewmaker, S., and Wall, D.
1752 (2012). A taxometric investigation of the latent structure of eating disorders. *Psychiatry Res.* 197(1-
1753 2), 97-102.
- 1754 Olszewski, P.K., Li, D., Grace, M.K., Billington, C.J., Kotz, C.M., and Levine, A.S. (2003). Neural
1755 basis of orexigenic effects of ghrelin acting within lateral hypothalamus. *Peptides* 24(4), 597-602.

- 1756 Onur, S., Haas, V., Bosy-Westphal, A., Hauer, M., Paul, T., Nutzinger, D., Klein, H., and Müller, M.J.
1757 (2005). L-tri-iodothyronine is a major determinant of resting energy expenditure in underweight
1758 patients with anorexia nervosa and during weight gain. *Eur. J. Endocrinol.* 152(2), 179-184.
- 1759 Osterstock, G., Escobar, P., Mitutsova, V., Gouty-Colomer, L.A., Fontanaud, P., Molino, F., Fehrentz,
1760 J.A., Carmignac, D., Martinez, J., Guerineau, N.C., Robinson, I.C., Mollard, P., and Méry, P.F.
1761 (2010). Ghrelin stimulation of growth hormone-releasing hormone neurons is direct in the arcuate
1762 nucleus. *PLoS One* 5(2), e9159.
- 1763 Ostrowska, Z., Ziora, K., Kos-Kudła, B., Swietochowska, E., Oświecimska, J., Dydach, A.,
1764 Wołkowska-Pokrywa, K., and Szapska, B. (2010). Melatonin, the RANKL/RANK/OPG system,
1765 and bone metabolism in girls with anorexia nervosa. *Endokrynol. Pol.* 61(1), 117-123.
- 1766 Ostrowska, Z., Ziora, K., Oświecimska, J., Świętochowska, E., and Wołkowska-Pokrywa, K. (2012a).
1767 Dehydroepiandrosterone sulfate, osteoprotegerin and its soluble ligand sRANKL and bone
1768 metabolism in girls with anorexia nervosa. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*. 66, 655-662.
- 1769 Ostrowska, Z., Ziora, K., Oświecimska, J., Świętochowska, E., Szapska, B., Wołkowska-Pokrywa, K.,
1770 and Dydach, A. (2012b). RANKL/RANK/OPG system and bone status in females with anorexia
1771 nervosa. *Bone* 50(1), 156-160.
- 1772 Oświecimska, J., Ziora, K., Adamczyk, P., Rocznik, W., Pikiewicz-Koch, A., Stojewska, M., and
1773 Dydach, A. (2007). Effects of neuroendocrine changes on results of ambulatory blood pressure
1774 monitoring (ABPM) in adolescent girls with anorexia nervosa. *Neuro Endocrinol. Lett.* 28(4), 410-
1775 416.
- 1776 Otto, B., Cuntz, U., Fruehauf, E., Wawarta, R., Folwaczny, C., Riepl, R.L., Heiman, M.L., Lehnert, P.,
1777 Fichter, M., and Tschöp, M. (2001). Weight gain decreases elevated plasma ghrelin concentrations
1778 of patients with anorexia nervosa. *Eur. J. Endocrinol.* 145, 669-73.
- 1779 Otto, B., Cuntz, U., Otto, C., Heldwein, W., Riepl, R.L., and Tschop, M.H. (2007). Peptide YY release
1780 in anorectic patients after liquid meal. *Appetite* 48, 301-304.
- 1781 Otto, B., Tschop, M., Frühauf, E., Heldwein, W., Fichter, M., Otto, C., and Cuntz, U. (2005).
1782 Postprandial ghrelin release in anorectic patients before and after weight gain.
1783 *Psychoneuroendocrinology* 30, 577-581.
- 1784 Palyha, O.C., Feighner, S.D., Tan, C.P., McKee, K.K., Hreniuk, D.L., Gao, Y.D., Schleim, K.D.,
1785 Yang, L., Morriello, G.J., Nargund, R., Patchett, A.A., Howard, A.D., and Smith, R.G. (2000).
1786 Ligand activation domain of human orphan growth hormone (GH) secretagogue receptor (GHS-R)
1787 conserved from Pufferfish to humans. *Mol. Endocrinol.* 14(1), 160-169.
- 1788 Pannacciulli, N., Vettor, R., Milan, G., Granzotto, M., Catucci, A., and Federspil, G. (2003). Anorexia
1789 nervosa is characterized by increased adiponectin plasma levels and reduced nonoxidative glucose
1790 metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 1748-1752.
- 1791 Pardo, M., Roca-Rivada, A., Al-Massadi, O., Seoane, L.M., Camiña, J.P., and Casanueva, F.F. (2010).
1792 Peripheral leptin and ghrelin receptors are regulated in a tissue-specific manner in activity-based
1793 anorexia. *Peptides* 31(10), 1912-1919.
- 1794 Peeters, T.L. (2003). Central and peripheral mechanisms by which ghrelin regulates gut motility. *J.*
1795 *Physiol. Pharmacol.* 54 Suppl 4, 95-103.
- 1796 Peino, R., Baldelli, R., Rodriguez-Garcia, J., Rodriguez-Segade, S., Kojima, M., Kangawa, K., Arvat,
1797 E., Ghigo, E., Dieguez, C., and Casanueva, F.F. (2000). Ghrelin--induced growth hormone
1798 secretion in humans. *Eur. J. Endocrinol.* 143: R11-14.
- 1799 Pemberton, C. J. and A. M. Richards, (2007). "Biochemistry of ghrelin precursor peptides," in
1800 *Vitamins & Hormones*, vol. 77, pp. 13– 30.
- 1801 Perelló, M., and Zigman, J.M.. (2012). The role of ghrelin in reward-based eating. *Biol. Psychiatry.*
1802 72(5), 347-353.

1803 Perello, M., Sakata, I., Birnbaum, S., Chuang, J.C., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A., Woloszyn,
1804 J., Yanagisawa, M., Lutter, M., and Zigman, J.M. (2010). Ghrelin increases the rewarding value of
1805 high-fat diet in an orexin-dependent manner. *Biol. Psychiatry* 67, 880–886.

1806 Perello, M., Scott, M.M., Sakata, I., Lee, C.E., Chuang, J.C., Osborne-Lawrence, S., Rovinsky, S.A.,
1807 Elmquist, J.K., and Zigman, J.M. (2012). Functional implications of limited leptin receptor and
1808 ghrelin receptor coexpression in the brain. *J. Comp. Neurol.* 520(2), 281-294.

1809 Petersen, P.S., Woldbye, D.P., Madsen, A.N., Egerod, K.L., Jin, C., Lang, M., Rasmussen, M., Beck-
1810 Sickinger, A.G., and Holst, B. (2009). In vivo characterization of high Basal signaling from the
1811 ghrelin receptor. *Endocrinology* 150, 4920-4930.

1812 Phillipp, E., Pirke, K.M., Kellner, M.B., and Krieg, J.C. (1991). Disturbed cholecystokinin secretion in
1813 patients with eating disorders. *Life Sci.* 48, 2443-2450.

1814 Pirke, K.M., Friess, E., Kellner, M.B., Krieg, J.C., and Fichter, M.M. (1994). Somatostatin in eating
1815 disorders. *Int. J. Eat. Disord.* 15(1), 99-102.

1816 Polli, N., Scacchi, M., Pecori Giraldi, F., Sormani, M., Zappulli, D., and Cavagnini, F. (2008). Low
1817 insulin-like growth factor I and leukopenia in anorexia nervosa. *Int. J. Eat. Disord.* 41(4), 355-359.

1818 Popovic, V., Djurovic, M., Cetkovic, A., Vojvodic, D., Pekic, S., Spremovic, S., Petakov, M.,
1819 Damjanovic, S., Milic, N., Dieguez, C., and Casanueva, F.F. (2004). Inhibin B: a potential marker
1820 of gonadal activity in patients with anorexia nervosa during weight recovery. *J. Clin. Endocrinol.*
1821 *Metab.* 89(4), 1838-1843.

1822 Putignano, P., Dubini, A., Toja, P., Invitti, C., Bonfanti, S., Redaelli, G., Zappulli, D., and Cavagnini,
1823 F. (2001). Salivary cortisol measurement in normal-weight, obese and anorexic women:
1824 comparison with plasma cortisol. *Eur. J. Endocrinol.* 145(2), 165-171.

1825 Qader, S.S., Håkanson, R., Rehfeld, J.F., Lundquist, I., and Salehi, A. (2008). Proghrelin-derived
1826 peptides influence the secretion of insulin, glucagon, pancreatic polypeptide and somatostatin: a
1827 study on isolated islets from mouse and rat pancreas. *Regul. Pept.* 146(1-3), 230-237.

1828 Repaci, A., Gambineri, A., Pagotto, U., and Pasquali, R. (2011). Ghrelin and reproductive disorders.
1829 *Mol. Cell Endocrinol.* 340(1), 70-9.

1830 Rodríguez, A., Gómez-Ambrosi, J., Catalán, V., Gil, M.J., Becerril, S., Sáinz, N., Silva, C., Salvador,
1831 J., Colina, I., and Frühbeck, G. (2009). Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation
1832 in human visceral adipocytes. *Int. J. Obes. (Lond).* 33(5), 541-552.

1833 Routtenberg, A., and Kuznesof, A.W. (1967). Self-starvation of rats living in activity wheels on a
1834 restricted feeding schedule. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 64(3), 414-421.

1835 Saito, S., Watanabe, K., Hashimoto, E., and Saito, T. (2009). Low serum BDNF and food intake
1836 regulation: A possible new explanation of the pathophysiology of eating disorders. *Prog. Neuro-*
1837 *Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 33, 312-316.

1838 Samec, S., Seydoux, J., Russell, A.P., Montani, J.P., and Dulloo, A.G. (2002). Skeletal muscle
1839 heterogeneity in fasting-induced upregulation of genes encoding UCP2, UCP3, PPARgamma and
1840 key enzymes of lipid oxidation. *Pflugers Arch.* 445(1), 80-86.

1841 Sanger, G.J. (2008). Motilin, ghrelin and related neuropeptides as targets for the treatment of GI
1842 diseases. *Drug Discov. Today* 13(5-6), 234-239.

1843 Sangiao-Alvarellos, S., and Cordido, F. (2010). Effect of ghrelin on glucose-insulin homeostasis:
1844 therapeutic implications. *Int. J. Pept.* 2010. pii: 234709.

1845 Schellekens, H., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2010). Lean mean fat reducing "ghrelin" machine:
1846 hypothalamic ghrelin and ghrelin receptors as therapeutic targets in obesity. *Neuropharmacology*
1847 58(1), 2-16.

1848 Scheurink, A.J., Boersma, G.J., Nergårdh, R., and Södersten, P. (2010). Neurobiology of hyperactivity
1849 and reward: agreeable restlessness in anorexia nervosa. *Physiol. Behav.* 100(5), 490-495.

1850 Sedlackova, D., Kopeckova, J., Papezova, H., Hainer, V., Kvasnickova, H., Hill, M., and Nedvidkova,
1851 J. (2012). Comparison of a high-carbohydrate and highprotein breakfast effect on plasma ghrelin,
1852 obestatin, NPY and PYY levels in women with anorexia and bulimia nervosa. *Nutr. Metab. (Lond)*
1853 9(1), 52 in press.

1854 Shimizu, N., Oomura, Y., and Kai, Y. (1989). Stress-induced anorexia in rats mediated by
1855 serotonergic mechanisms in the hypothalamus. *Physiol. Behav.* 46(5), 835-841.

1856 Shrestha, Y.B., Wickwire, K., and Giraud, S. (2009). Effect of reducing hypothalamic ghrelin
1857 receptor gene expression on energy balance. *Peptides* 30(7), 1336-41.

1858 Siegfried, Z., Berry, E.M., Hao, S., and Avraham, Y. (2003). Animal models in the investigation of
1859 anorexia. *Physiol. Behav.* 79(1), 39-45.

1860 Skibicka, K.P., and Dickson, S.L. (2011). Ghrelin and food reward: the story of potential underlying
1861 substrates. *Peptides* 32(11), 2265-73.

1862 Skibicka, K.P., Hansson, C., Egecioglu, E., and Dickson, S.L. (2012). Role of ghrelin in food reward:
1863 impact of ghrelin on sucrose self-administration and mesolimbic dopamine and acetylcholine
1864 receptor gene expression. *Addict. Biol.* 17, 95–107.

1865 Smith, G.P. (1989). Animal models of human eating disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 575, 63-72.

1866 Soriano-Guillen, L., Barrios V., Campos-Barros, A., and Argente, J. (2004). Ghrelin levels
1867 inobesityand anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J. Pediatr.* 144, 36-42.

1868 Speranza, M., Revah-Levy, A., Giquel, L., Loas, G., Venisse, J.L., Jeammet, P., and Corcos, M.
1869 (2012). An investigation of Goodman's addictive disorder criteria in eating disorders. *Eur. Eat.*
1870 *Disord. Rev.* 20(3), 182-9.

1871 Stengel, A., Keire, D., Goebel, M., Evilevitch, L., Wiggins, B., Taché, Y., and Reeve, J.R. Jr. (2009).
1872 The RAPID method for blood processing yields new insight in plasma concentrations and
1873 molecular forms of circulating gut peptides. *Endocrinology* 150(11),5113-5118.

1874 Stock, S., Lechner, P., Wong, A.C., Ghatei, M.A., Kieffer, T.J., Bloom, S.R., and Chanoine, J.P.
1875 (2005). Ghrelin, peptide YY, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, and hunger responses
1876 to a mixed meal in anorexic, obese, and control female adolescents. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
1877 90(4), 2161-2168.

1878 Støving, R.K., Chen, J.W., Glinborg, D., Brixen, K., Flyvbjerg, A., Hørder, K., and Frystyk J. (2007).
1879 Bioactive insulin-like growth factor (IGF) I and IGF-binding protein-1 in anorexia nervosa. *J. Clin.*
1880 *Endocrinol. Metab.* 92(6), 2323-2329.

1881 Støving, R.K., Hangaard, J., Hagen, C., and Flyvbjerg, A. (2003). Low levels of the 150-kD insulin-
1882 like growth factor binding protein 3 ternary complex in patients with anorexia nervosa: effect of
1883 partial weight recovery. *Horm. Res.* 60(1), 43-48.

1884 Støving, R.K., Veldhuis, J.D., Flyvbjerg, A., Vinten, J., Hangaard, J., Koldkjaer, O.G., Kristiansen, J.,
1885 Hagen, C. (1999). Jointly amplified basal and pulsatile growth hormone (GH) secretion and
1886 increased process irregularity in women with anorexia nervosa: indirect evidence for disruption of
1887 feedback regulation within the GH-insulin-like growth factor I axis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84,
1888 2056–2063.

1889 Svensson, J., Lall, S., Dickson, S.L., Bengtsson, B.A., Rømer, J., Ahnfelt-Rønne, I., Ohlsson, C., and
1890 Jansson J.O. (2000). The GH secretagogues ipamorelin and GH-releasing peptide-6 increase bone
1891 mineral content in adult female rats. *J. Endocrinol.* 165(3), 569-577.

1892 Sun, Y., Ahmed, S., and Smith, R.G. (2003). Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite.
1893 *Mol. Cell Biol.* 23(22), 7973-81.

1894 Sun, Y., Wang, P., Zheng, H., and Smith, R.G. (2004). Ghrelin stimulation of growth hormone release
1895 and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
1896 *U.S.A.* 101(13), 4679-84.

- 1897 Sun, Y., Butte, N.F., Garcia, J.M., and Smith, R.G. (2008). Characterization of adult ghrelin and
1898 ghrelin receptor knockout mice under positive and negative energy balance. *Endocrinology* 149(2),
1899 843-850.
- 1900 Szentirmai, E., Kapás, L., Sun, Y., Smith, R.G., and Krueger, J.M. (2009). The preproghrelin gene is
1901 required for the normal integration of thermoregulation and sleep in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
1902 *USA* 106(33), 14069-14074.
- 1903 Tagami, T., Satoh, N., Usui, T., Yamada, K., Shimatsu, A., and Kuzuya, H. (2004). Adiponectin in
1904 anorexia nervosa and bulimia nervosa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(4), 1833-1837.
- 1905 Tamai, H., Takemura, J., Kobayashi, N., Matsubayashi, S., Matsukura, S., and Nakagawa, T. (1993).
1906 Changes in plasma cholecystokinin concentrations after oral glucose tolerance test in anorexia
1907 nervosa before and after therapy. *Metabolism* 42(5), 581-584.
- 1908 Tanaka, M., Tatebe, Y., Nakahara, T., Yasuhara, D., Sagiya, K., Muranaga, T., Ueno, H., Nakazato,
1909 M., Nozoe, S., and Naruo, T. (2003a). Eating pattern and the effect of oral glucose on ghrelin and
1910 insulin secretion in patients with anorexia nervosa. *Clin. Endocrinol.* 59(5), 574-549.
- 1911 Tanaka, M., Naruo, T., Yasuhara, D., Tatebe, Y., Nagai, N., Shiiya, T., Nakazato, M., Matsukura, S.,
1912 and Nozoe, S. (2003b). Fasting plasma ghrelin levels in subtypes of anorexia nervosa.
1913 *Psychoneuroendocrinology* 28(7), 829-835.
- 1914 Tanaka, M., Naruo, T., Nagai, N., Kuroki, N., Shiiya, T., Nakazato, M., Matsukura, S., and Nozoe, S.
1915 (2003c). Habitual binge/purge behavior influences circulating ghrelin levels in eating disorders. *J.*
1916 *Psychiat. Res.* 37(1), 17-22.
- 1917 Tanaka, M., Nakahara, T., Kojima, S., Nakano, T., Muranaga, T., Nagai, N., Ueno, H., Nakazato, M.,
1918 Nozoe, S., and Naruo, T. (2004). Effect of nutritional rehabilitation on circulating ghrelin and
1919 growth hormone levels in patients with anorexia nervosa. *Regul. Pept.* 122(3), 163-168.
- 1920 Taub, D.D. (2008). Novel connections between the neuroendocrine and immune systems: the ghrelin
1921 immunoregulatory network. *Vitam. Horm.* 77, 325-346.
- 1922 Tena-Sempere, M. (2008). Ghrelin as a pleiotrophic modulator of gonadal function and reproduction.
1923 *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 4(12), 666-674.
- 1924 Tepper, R., Weizman, A., Apter, A., Tyano, S., and Beyth, Y. (1992). Elevated plasma
1925 immunoreactive b-endorphin in anorexia nervosa. *Clin. Neuropharmacol.* 15(5), 387-391.
- 1926 Tesauro, M., Schinzari, F., Caramanti, M., Lauro, R., and Cardillo, C. (2010) Metabolic and
1927 cardiovascular effects of ghrelin. *Int. J. Pept. pii:* 864342.
- 1928 Thompson, N.M., Gill, D.A., Davies, R., Loveridge, N., Houston, P.A., Robinson, I.C., and Wells, T.
1929 (2004). Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism
1930 independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology* 145(1), 234-242.
- 1931 Tolle, V., Bassant, M.H., Zizzari, P., Poindessous-Jazat, F., Tomasetto, C., Epelbaum, J., and Bluet-
1932 Pajot, M.T. (2002). Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding
1933 behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 143(4), 1353-1361.
- 1934 Tolle, V., Kadem, M., Bluet-Pajot M.T., Frere, D., Foulon, C., Bossu, C., Dardennes, R., Mounier, C.,
1935 Zizzari, P., Lang, F., Epelbaum, J., and Estour, B. (2003). Balance in ghrelin and leptin plasma
1936 levels in anorexia nervosa patients and constitutionally thin women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88,
1937 109-116.
- 1938 Tomasik, P.J., Sztéfko, K., and Malek A. (2002). GLP-1 as a satiety factor in children with eating
1939 disorders. *Horm. Metab. Res.* 34(2), 77-80.
- 1940 Tomasik, P.J., Sztéfko, K., and Starzyk, J. (2004). Cholecystokinin, glucose dependent insulinotropic
1941 peptide and glucagon-like peptide 1 secretion in children with anorexia nervosa and simple obesity.
1942 *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 17(12), 1623-1631.
- 1943 Tomasik, P.J., Sztéfko, K., Starzyk, J., Rogatko, I., and Szafran, Z. (2005). Entero-insular axis in
1944 children with anorexia nervosa. *Psychoneuroendocrinology* 30(4), 364-372.

- 1945 Tomova, A., Makker, K., Kirilov, G., Agarwal, A., and Kumanov, P. (2007). Disturbances in gonadal
1946 axis in women with anorexia nervosa. *Eat. Weight Disord.* 12(4), e92-e97.
- 1947 Toshinai, K., Date, Y., Murakami, N., Shimada, M., Mondal, M.S., Shimbara, T., Guan, J.L., Wang,
1948 Q.P., Funahashi, H., Sakurai, T., Shioda, S., Matsukura, S., Kangawa, K., and Nakazato, M.
1949 (2003). Ghrelin-induced food intake is mediated via the orexin pathway. *Endocrinology* 144(4),
1950 1506-12.
- 1951 Toshinai, K., Yamaguchi, H., Sun, Y., Smith, R.G., Yamanaka, A., Sakurai, T., Date, Y., Mondal,
1952 M.S., Shimbara, T., Kawagoe, T., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., and Nakazato, M.
1953 (2006). Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism independent of the growth hormone
1954 secretagogue receptor. *Endocrinology* 147(5), 2306-2314.
- 1955 Troisi, A., Di Lorenzo, G., Lega, I., Tesouro, M., Bertoli, A., Leo, R., Intorno, M., Pecchioli, C.,
1956 Rizza, S., Turriziani, M., Lauro, R., and Siracusano, A. (2005). Plasma ghrelin in anorexia,
1957 bulimia, and binge-eating disorder: relations with eating patterns and circulating concentrations of
1958 cortisol and thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 81(4), 259-266.
- 1959 Tschöp, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*
1960 407, 908-910.
- 1961 Tschöp, M., Wawarta, R., Riepl, R.L., Friedrich, S., Bidlingmaier, M., Landgraf, R., and Folwaczny,
1962 C. (2001). Post-prandial decrease of circulating human ghrelin levels. *J. Endocrinol. Invest.* 24(6),
1963 RC19-21.
- 1964 Tsubota, Y., Owada-Makabe, K., Yukawa, K., Maeda, M. (2005). Hypotensive effect of des-acyl
1965 ghrelin at nucleus tractus solitarii of rat. *Neuroreport* 16(2), 163-6.
- 1966 Uehara, T., Omori, I., Nakamura, K., Suda, M., Hosoda, Y., Minegishi, T., Mikuni, M., and Kangawa,
1967 K. (2005). Plasma des-acyl and acyl ghrelin in patients with eating disorders. *Eat. Weight Disord.*
1968 10(4), 264-266.
- 1969 Uhe, A.M., Szmukler, G.I., Collier, G.R., Hansky, J., O'Dea, K., and Young G.P. (1992). Potential
1970 regulators of feeding behavior in anorexia nervosa. *Am. J. Clin. Nutr.* 55(1), 28-32.
- 1971 Valevski, A., Fridberg, G., Gil-Ad, I., Laron, Z., and Weizman, A. (2000). Neuroendocrinological
1972 response to standardized mixed meal in female anorectic patients during active and refeeding
1973 phases. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 13(2), 195-199.
- 1974 Van Vugt, D.A. (2010). Brain imaging studies of appetite in the context of obesity and the menstrual
1975 cycle. *Hum. Reprod. Update* 16(3), 276-92.
- 1976 Veldhuis, J.D., and Bowers, C.Y. (2010). Integrating GHS into the Ghrelin System. *Int. J. Pept. pii:*
1977 879503.
- 1978 Verhagen, L.A., Egecioglu, E., Luijendijk, M.C., Hillebrand, J.J., Adan, R.A., and Dickson, S.L.
1979 (2011). Acute and chronic suppression of the central ghrelin signaling system reveals a role in food
1980 anticipatory activity. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21(5), 384-92.
- 1981 Viapiana, O., Gatti, D., Dalle Grave, R., Todesco, T., Rossini, M., Braga, V., Idolazzi, L., Fracassi, E.,
1982 and Adami, S. (2007). Marked increases in bone mineral density and biochemical markers of bone
1983 turnover in patients with anorexia nervosa gaining weight. *Bone* 40(4), 1073-1077.
- 1984 Volkov, N.D., Wang, G.J., and Baler, R.D. (2011). Reward, dopamine and the control of food intake :
1985 implications for obesity. *Trends Cogn. Sci.* 15(1), 37-46.
- 1986 Wang, L., Saint-Pierre, D.H., and Tache, Y. (2002). Peripheral ghrelin selectively increases Fos
1987 expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus.
1988 *Neurosci. Lett.* 325 (1): 47-51.
- 1989 Wang, T., Hung, C.C, Randall, D.J. (2006). The comparative physiology of food deprivation: from
1990 feast to famine. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 223-251.

- 1991 Weinbrenner, T., Zittermann, A., Gouni-Berthold, I., Stehle, P., and Berthold, H.K. (2003). Body mass
1992 index and disease duration are predictors of disturbed bone turnover in anorexia nervosa. A case-
1993 control study. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57(10), 1262-1267.
- 1994 Wellman, P.J., Davis, K.W., and Nation, J.R. (2005). Augmentation of cocaine hyperactivity in rats by
1995 systemic ghrelin. *Regul. Pept.* 125(1-3), 151-154.
- 1996 Willner, P. (1984). The validity of animal models of depression. *Psychopharmacology* 83(1), 1-16.
- 1997 Wong, M.L., Licinio, J., Gold, P.W., Glowa, J. (1993). Activity-induced anorexia in rats does not
1998 affect hypothalamic neuropeptide gene expression chronically. *Int. J. Eat. Disord.* 13(4), 399-405
- 1999 Wortley, K.E., Anderson, K.D., Garcia, K., Murray, J.D., Malinova, L., Liu, R., Moncrieffe, M.,
2000 Thabet, K., Cox, H.J., Yancopoulos, G.D., Wiegand, S.J., and Sleeman, M.W. (2004). Genetic
2001 deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc.*
2002 *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101(21), 8227-32.
- 2003 Wortley, K.E., del Rincon, J.P., Murray, J.D., Garcia, K., Iida, K., Thorner, M.O., and Sleeman, M.W.
2004 (2005). Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J. Clin. Invest.* 115(12), 3573-8.
- 2005 Wren, A.M., Small, C.J., Ward, H.L., Murphy, K.G., Dakin, C.L., Taheri, S., Kennedy, A.R., Roberts,
2006 G.H., Morgan, D.G., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2000). The novel hypothalamic peptide
2007 ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 141(11), 4325-4328.
- 2008 Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillon, W.S., Ghatei,
2009 M.A., and Bloom, S.R. (2001a). Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J.*
2010 *Clin. Endocrinol. Metab.* 86(12), 5992.
- 2011 Wren, A.M., Small, C.J., Abbott, C.R., Dhillon, W.S., Seal, L.J., Cohen, M.A., Batterham, R.L., Taheri,
2012 S., Stanley, S.A., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2001b). Ghrelin causes hyperphagia and obesity
2013 in rats. *Diabetes* 50(11), 2540-7.
- 2014 Yang, J., Brown, M.S., Liang, G., Grishin, N.V., and Goldstein, J.L. (2008). Identification of the
2015 acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone. *Cell* 132(3),
2016 387-96.
- 2017 Yannielli, P.C., Molyneux, P.C., Harrington, M.E., Golombek, D.A. (2007). Ghrelin effects on the
2018 circadian system of mice. *J. Neurosci.* 27(11), 2890-2895.
- 2019 Yi, C.X., Heppner, K., and Tschöp, M.H. (2011). Ghrelin in eating disorders. *Mol. Cell Endocrinol.*
2020 340, 29-34.
- 2021 Zhao, C.P., Tang, M., Peeters, T.L., and Depoortere, I. (2003). In the rat ghrelin changes the
2022 excitability of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neurogastroent. Mot.*
2023 15, 571-590.
- 2024 Zhao, T.J., Liang, G., Li, R.L., Xie, X., Sleeman, M.W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M.,
2025 Yancopoulos, G.D., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2010). Ghrelin O-acyltransferase (GOAT) is
2026 essential for growth hormone-mediated survival of calorie-restricted mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
2027 *U.S.A.* 107(16), 7467-7472.
- 2028 Zhu, X., Cao, Y., Voogd, K., and Steiner, D.F. (2006). On the processing of proghrelin to ghrelin. *J.*
2029 *Biol. Chem.* 281(50), 38867-38870.
- 2030 Zigman, J.M., Jones, J.E., Lee, C.E., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (2006). Expression of ghrelin
2031 receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 494(3), 528-548.
- 2032 Ziora, K.T., Oswiecimska, J.M., Swietochowska, E., Ostrowska, Z., Stojewska, M., Gorczyca, P.,
2033 Rojewska, K., Ziora-Jakutowicz, K., Szczepanska, M., and Ziora, D. (2011). Assessment of serum
2034 levels resistin in girls with anorexia nervosa. Part II. Relationships between serum levels of resistin
2035 and thyroid, adrenal and gonadal hormones. *Neuro Endocrinol. Lett.* 32(5), 697-703.
- 2036 Zizzari, P., Halem, H., Taylor, J., Dong, J.Z., Datta, R., Culler, M.D., Epelbaum, J., and Bluett-Pajot,
2037 M.T. (2005). Endogenous ghrelin regulates episodic growth hormone (GH) secretion by amplifying

2038 GH Pulse amplitude: evidence from antagonism of the GH secretagogue-R1a receptor.
2039 *Endocrinology* 146(9), 3836-42.
2040 Zizzari, P., Hassouna, R., Longchamps, R., Epelbaum, J., and Tolle, V. (2011). Meal anticipatory rise
2041 in acylated ghrelin at dark onset is blunted after long-term fasting in rats. *J. Neuroendocrinol* 23(9),
2042 804-14.
2043

2043 **LEGENDS**

2044 **Figure 1: Principal peptide products obtained by post-translational processing of**
2045 **preproghrelin peptide.**

2046 Ghrelin and obestatin act on receptors belonging to the GPCR family. Even if the exact role
2047 of obestatin remains question of debate (see Hassouna *et al.*, 2010), ghrelin has been first
2048 described to be a GH-secretagogue. Beside an obvious role in the regulation of food intake,
2049 ghrelin is also implicated in numerous biological function (see Veldhuis and Bowers, 2010).
2050 The active form of ghrelin, acyl-ghrelin, is obtained by octanoylation of deacyl-ghrelin. Its
2051 receptor is not yet identified and its function is currently unclear even if some evidences
2052 support an antagonistic effect to ghrelin (see Delhanty *et al.*, 2012).

2053
2054 **Figure 2: Action of ghrelin in the brain.**

2055 Ghrelin acts at different levels of the brain to stimulate food intake *via* hypothalamus and
2056 meso-cortico-limbic pathway. In the hypothalamus, ghrelin activates orexigenic neurones
2057 (AgRP/NPY), which inhibit anorexigenic neurones (POMC/CART) *via* GABA projections.
2058 They are connected to second order neurones like CRH and TRH neurones located in the
2059 PVN and/or the orexin neurones found in the LHA. POMC/CART neurones activate MCH
2060 neurones. Ghrelin acts also at different levels of meso-cortico-limbic pathway: LDTg, VTA
2061 and Acc. Ghrelin acts directly on VTA to stimulate dopamine release in Acc. dopamine
2062 release is controlled by cholinergic LDTg neurones. Ghrelin could also act on NTS to
2063 stimulate the food intake *via* either vagal nerve or area postrema see Figure 4.

2064 Acc accumbens nucleus; ACh acétylcholine; AgRP agouti related peptide; ARC arcuate
2065 nucleus; CART cocaine- and amphetamine-regulated transcript; CRH corticotropin-releasing
2066 hormone; DA dopamine; DYN dynorphin; ENK enkephalin; GABA γ -aminobutyric acid;
2067 GHRH growth-hormone-releasing hormone; GLU glutamate; LDTg laterodorsal tegmental
2068 area; LHA lateral hypothalamic area; MCH melanin-concentrating hormone; NPY
2069 neuropeptide Y; NTS nucleus tractus solitarius; POMC pro-opiomelanocortin; PVN
2070 paraventricular nucleus; TRH thyrotropin releasing hormone; VMH: ventromedial nucleus;
2071 VTA: ventral tegmental area.

2072
2073 **Figure 3: Homeostatic brain vs non-homeostatic (hedonic) brain.**

2074 Schematic representation of the potential interaction of homeostatic hypothalamic and
2075 brainstem areas with non-homeostatic (hedonic) brain structures to control food intake. The
2076 hedonic brain comprises mainly the meso-cortico-limbic system, which includes the ventral
2077 tegmental area (VTA), nucleus accumbens (Ac), prefrontal cortex (PFC), hippocampus
2078 (Hippo) and amygdala (Amyg). Hormones from peripheral compartments like adipose tissue,
2079 gastro-intestinal tract or ovary reach these areas, directly or indirectly to activate pathways
2080 controlling both energy balance (homeostatic brain) and pleasure (hedonic brain) associated
2081 with eating (hunger level, palatability of the food, past experiences, mood, level of stress). In
2082 anorexia nervosa (restrictive type), a deregulation of one or more of these pathways as well as
2083 the cross-talk between periphery and brain might be considered. *Adapted from Van Vugt*
2084 *(2010).*

2085
2086

2086 **Figure 4: Access of ghrelin signal to its neuronal targets.**

2087 This schema summarizes the three hypothetical access routes of ghrelin towards its neuronal
2088 targets (cf Figure 2). First, ghrelin would be able to target neuronal networks thanks to
2089 specific transcellular transports at the level of blood–brain barrier (BBB) located on brain
2090 capillaries (purple arrows). Most ghrelin sensitive areas present blood-brain barrier
2091 vasculature and this route represent the main one described in all regions of the brain.
2092 However free-BBB regions, called the median eminence and the area postrema, are recorded
2093 in the hypothalamus and the brainstem respectively. These areas contain a rich fenestrated
2094 vasculature, which could represent a direct vascular route while allowing passive diffusion of
2095 peripheral ghrelin (red arrows). This route may be responsible of acute regulation and
2096 complete chronic feedback accomplished by uptake of circulating molecules via receptor-
2097 mediated transport across the blood-brain barrier. Finally, activation of brainstem areas by
2098 ghrelin may occur without the entrance of ghrelin in the brain, but through its binding to
2099 gastric vagal afferent neurones (orange).

2100 Acc accumbens nucleus; ACh acétylcholine; AgRP agouti related peptide; AP area postrema;
2101 ARC arcuate nucleus; CART cocaine- and amphetamine-regulated transcript; CRH
2102 corticotropin-releasing hormone; DA dopamine; DYN dynorphin; ENK enkephalin; GABA γ -
2103 aminobutyric acid; GHRH growth-hormone-releasing hormone; GLU glutamate; LDTg
2104 laterodorsal tegmental area; LHA lateral hypothalamic area; MCH melanin-concentrating
2105 hormone; ME : median eminence; NPY neuropeptide Y; NTS nucleus of the solitary tract;
2106 POMC pro-opiomelanocortin; PVN paraventricular nucleus; TRH thyrotropin releasing
2107 hormone; VMH: ventromedial nucleus; VTA: ventral tegmental area.

2108

2109 **Table 1:** Different metabolic phases occurring during food restriction and permitting
2110 distinction between fasting and starvation (see Wang *et al.*, 2006). All the metabolic changes
2111 aim to deliver sufficient amount of glucose for different organs and especially for the brain.

2112

2113 **Table 2:** Addictive disorder criteria according to Goodman (1990)

2114

2115 **Table 3:** Compared levels of neuropeptides regulating food intake in AN patients and healthy
2116 matched population

2117

2118 **Table 4:** Compared levels of hormones regulating food intake in AN patients and healthy
2119 matched population

2120

2121 **Table 5:** Compared levels of bone turnover markers in AN patients and healthy matched
2122 population

2123 **Table 6:** Compared levels of other factors altered in AN patients

Figure 1.JPEG

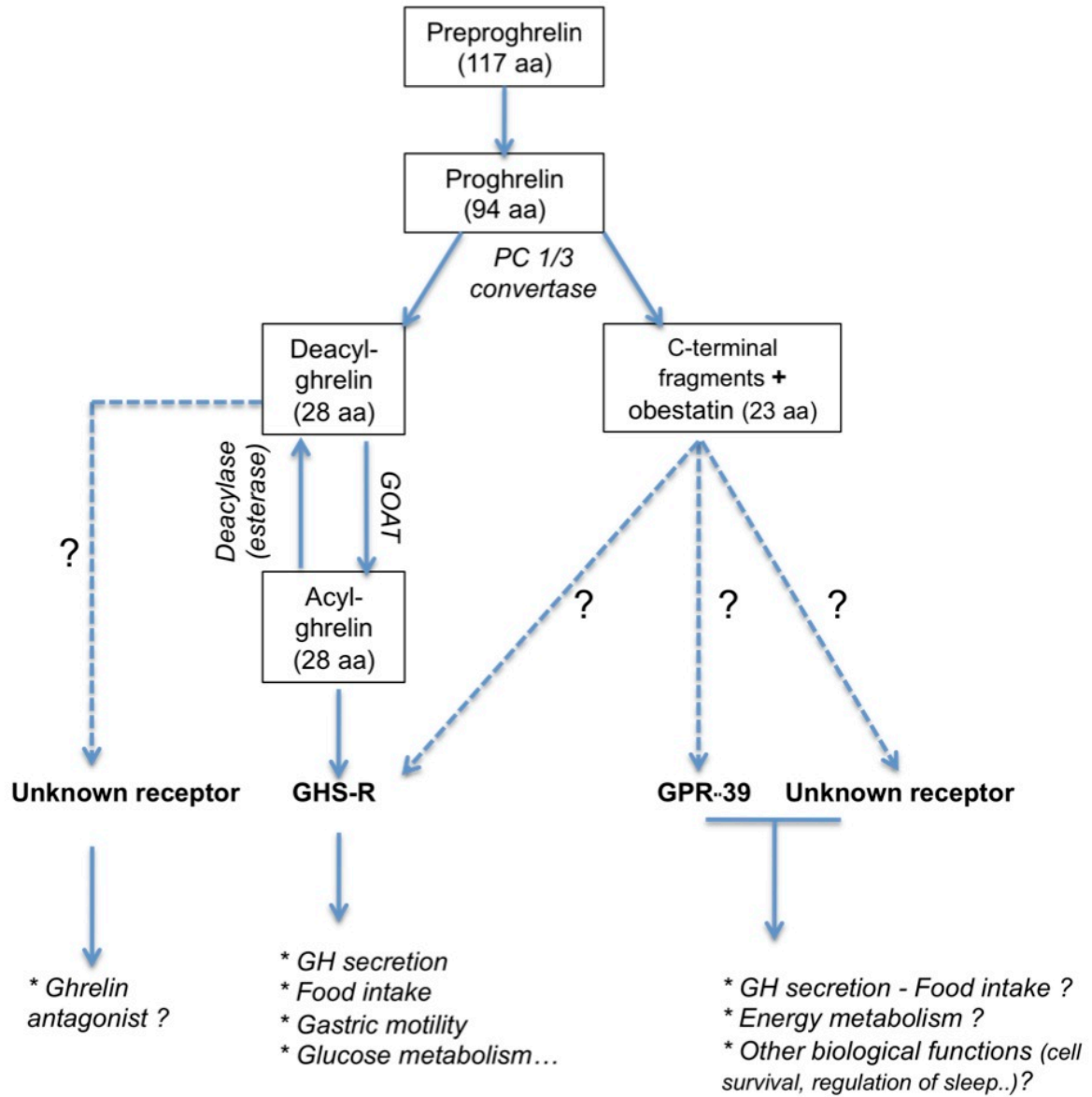


Figure 2.JPG

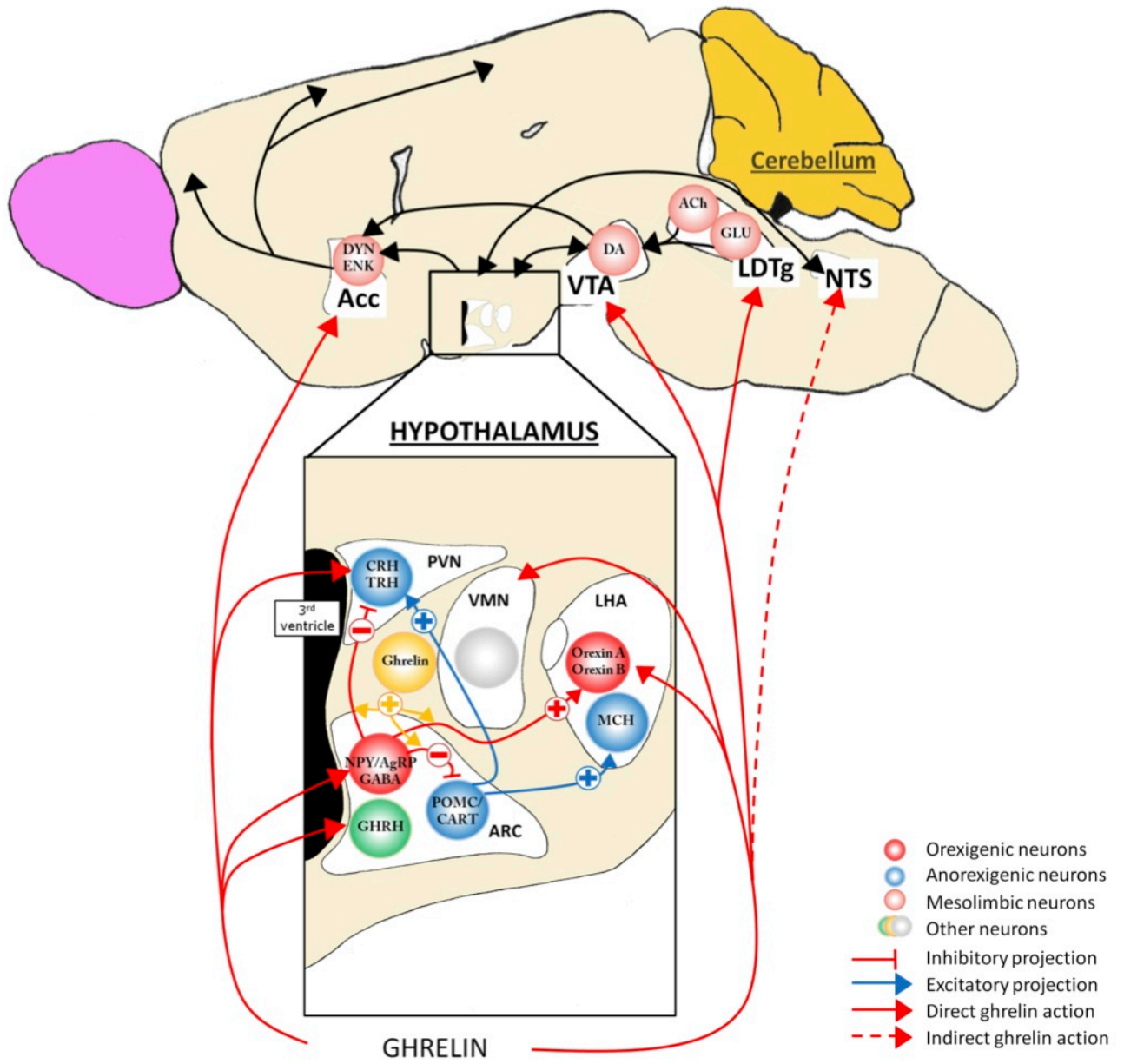


Figure 3.JPEG

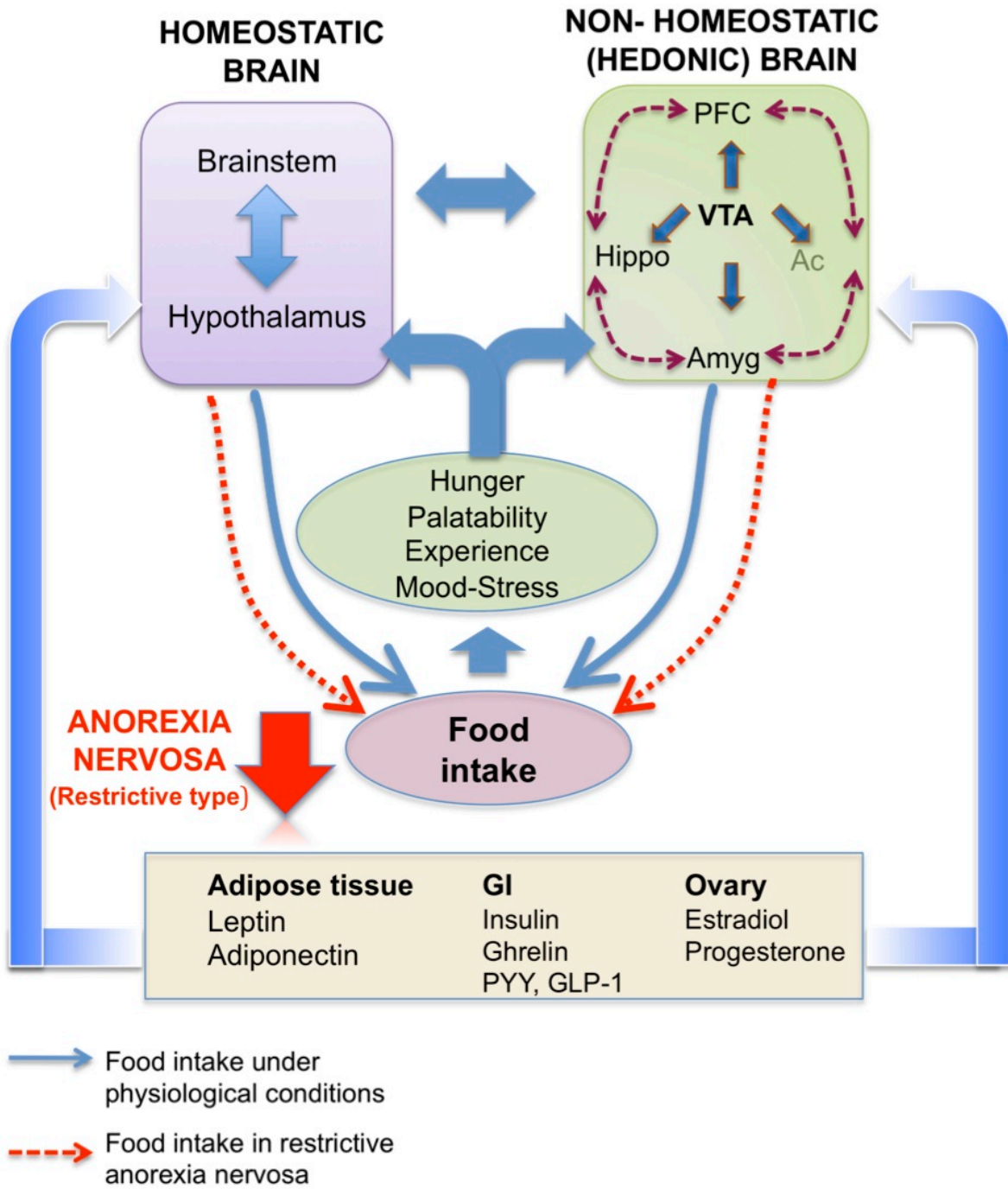
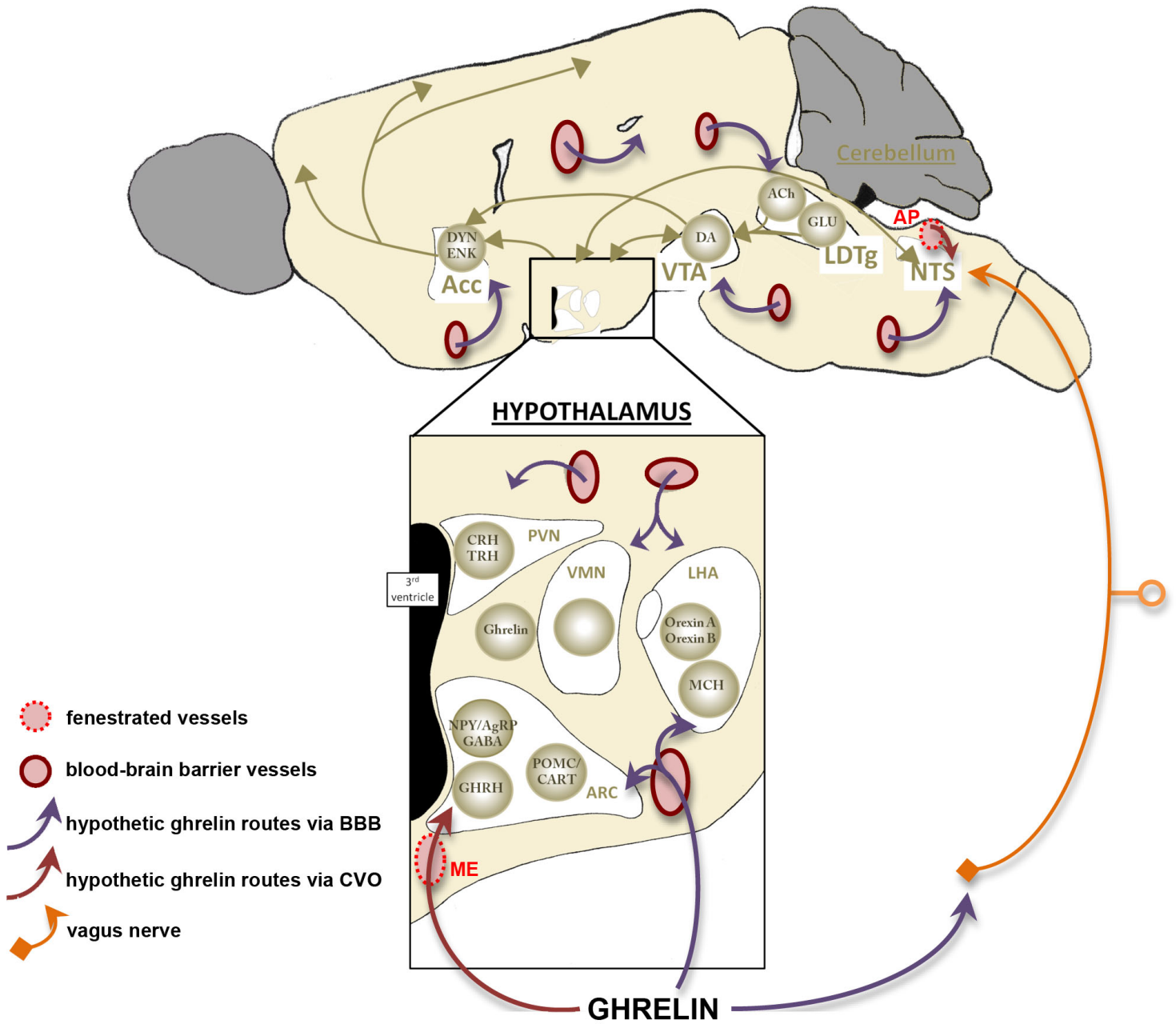


Figure 4.JPEG

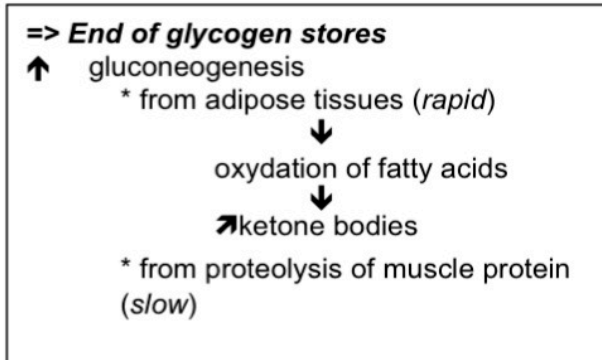


PHASE I: FASTING

= postabsorptive phase (*Hours*)

- ↑ Glycogen depletion (from liver stores)
- ↑ Fatty acids release (from adipose tissues)

PHASE II: From FASTING to STARVATION
(*Several weeks*)



PHASE III: From STARVATION to DEATH

- * Dramatic depletion of adipose stores
 - * Degradation of muscular mass
-

Table 1: Metabolic phases and food restriction. Different metabolic phases occurring during food restriction and permitting distinction between fasting and starvation (see Wang *et al.*, 2006). All the metabolic changes aim to deliver sufficient amount of glucose for different organs and especially for the brain.

Table 2: Addictive disorder criteria according to Goodman (1990)

-
- A. Recurrent failure to resist impulses to engage in a specified behaviour.
 - B. Increasing sense of tension immediately prior the initiation of behaviour.
 - C. Pleasure or relief at the time of engaging in the behaviour.
 - D. A feeling of a lack of control while engaging in the behaviour.
 - E. At least five of the following:
 - 1. Frequent preoccupation with the behaviour or preparatory activities
 - 2. Frequent engaging in the behaviour to a greater extent or over a longer period than intended
 - 3. Repeated efforts to reduce, control or stop the behaviour
 - 4. A great deal of time spent in activities necessary for the behaviour, engaging in the behaviour or recovering from its effects
 - 5. Frequent engaging in the behaviour when expected to fulfil occupational, academic, domestic or social obligations
 - 6. Important social, occupational or recreational activities given up or reduced because of the behaviour
 - 7. Continuation of the behaviour despite knowledge of having a persistent or recurrent social, financial, psychological or physical problem that is caused or exacerbated by the behaviour
 - 8. Tolerance: need to increase the intensity or frequency of the behaviour in order to achieve the desired effect or diminished effect with continued behaviour of the same intensity
 - 9. Restlessness or irritability if unable to engage in the behaviour
 - F. Some symptoms of the disturbance have persisted for at least 1 month or have occurred repeatedly over a longer period of time.
-

Note: To reach the categorical diagnosis of addictive disorder according to Goodman (1990), criteria A–D plus criterion E (five among nine symptoms) must be met for at least 1 month.

Table 3: Compared levels of neuropeptides regulating food intake in AN patients and healthy matched population

Neuropeptides regulating food intake*	AN/CT	References
Neuropeptide Y		
CSF NPY	↑↑	Kaye 1990, 1996; Baranowska 1997
Blood NPY	⇒ ↓ ↑	Nedvidkova 2000; Baranowska 2001; Sedlackova 2012
Blood agouti-related protein	↑↑	Moriya 2006; Merle 2011
Blood 26RFa	↑↑	Galusca 2012
Opioid peptides		
CSF b-endorphins	⇒ ↓	Gerner 1982a; Baranowska 1990; Kaye 1996
CSF dynorphins	⇒	Lesem 1991; Kaye 1996
Blood b-endorphins	↓ ↑	Brambilla 1991; Tepper 1992; Baranowska 1990
Galanin		
CSF or plasma galanin	⇒	Berrettini 1988; Baranowska 1997, 2001
Blood a-MSH	⇒	Moriya 2006
CSF corticotropin-releasing hormone	↑↑	Gerner 1981; Hotta 1986; Kaye 1987; Baranowska 1990
CSF Thyrotropin-releasing hormone	↓	Lesem 1994
CSF neurotensin	⇒	Nemeroff 1989
Somatostatin (SRIF)		
CSF SRIF	↓ ⇒	Gerner 1982b, Kaye 1988
Blood SRIF	↑ ↓	Pirke 1994; Valevski 2000; Baranowska 2000
CSF oxytocin	↓	Demitrack 1990
Blood oxytocin	⇒ ↓ ↑	Chiodera 1991; Lawson 2011a, 2012
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)		
Serum BDNF	↓	Nakazato 2003, 2006, 2009; Monteleone 2004, 2005; Ehrlich 2009; Saito 2009
Blood BDNF	↑	Mercader 2007

Adapted from Monteleone 2011

*Neuropeptides inhibiting food intake are on a grey background

Table 4: Compared levels of hormones regulating food intake in AN patients and healthy matched population

Hormones regulating food intake*	AN/CT	References
Ghrelin-related		
Blood total ghrelin	↑	Otto 2001, 2005; Nedvidkova 2003; Tanaka 2003a, 2003b, 2003c, 2004; Tolle 2003; Broglio 2004a; Hotta 2004; Krsek 2004; Misra 2004c, 2005b, 2007, 2008; Soriana-Guillèn 2004; Tanaka 2004; Bosy-Westphal 2005; Stock 2005; Troisi 2005; Uehara 2005; Janas-Kozik 2007; Nakahara 2007, 2008; Germain 2007, 2009, 2010; Stoving 2007; Lawson 2011b; Sedlakova 2012
Blood acyl ghrelin (active)	↑	Nakai 2003; Hotta 2004; Uehara 2005; Nakahara 2008; Germain 2009, 2010
Blood desacyl ghrelin	↑	Hotta 2004; Nakahara 2008
Blood obestatin	↑	Nakahara 2008; Germain 2009, 2010; Sedlakova 2012
Plasma insulin	(⇒) ↓ 1	Uhe 1992; Tamai 1993; Stoving 1999; Gianotti 2000; Gniuli 2001; Delporte 2003; Tanaka 2003a; Weinbrenner 2003; Misra 2004a, 2004b, 2007; Tagami 2004; Bosy-Westphal 2005; Housova 2005; Misra 2005c; Stock 2005; Tomasik 2005; Dolezalova 2007; Dostalova 2007; Kinzig 2007; Nakahara 2007; Stoving 2007; Haluzikova 2009; Brick 2010; Fazeli 2010b; Karczewska-Kupczewska 2010, 2012
Leptin		
CSF leptin	↓	Mantzoros 1997; Gendall 1999
Blood leptin	↓	Ferron 1997; Hebebrand 1997; Mantzoros 1997; Balligand 1998; Gendall 1999; Stoving 1999; Monteleone 2000, 2002a, 2002b; Nedvidkova 2000; Di Carlo 2002; Krizova 2002; Delporte 2003; Holtkamp 2003a, 2003b, 2004; Misra 2003, 2004a, 2004b, 2005a, 2005c, 2006, 2007, 2008; Pannacciulli 2003; Tolle 2003; Weinbrenner 2003; Djurovic 2004; Heer 2004; Popovic 2004; Tagami 2004; Dostalova 2005, 2007; Haas 2005; Miljic 2006; Ohwada 2006, 2007; Dolezalova 2007; Germain 2007; Mika 2007; Modan-Moses 2007; Muñoz-Calvo 2007; Nakahara 2007; Haluziková 2009; Arimura 2010; Estour 2010; Fazeli 2010b; Nogueira 2010; Lawson 2011b; Faje 2012
Total blood adiponectin	(⇒) ↓ 2	Delporte 2003; Iwahashi 2003; Pannacciulli 2003; Misra 2004a; Tagami 2004; Bosy-Westphal 2005; Housova 2005; Dolezalova 2007; Dostalova 2007; Modan-Moses 2007; Nakahara 2007; Stoving 2007; Haluziková 2009; Karczewska-Kupczewska 2010, 2012; Nogueira 2010
Cholecystokinin (CKK)		
CSF or blood CCK	⇒ ↑	Phillipp 1991; Geraciotti 1992; Tamai 1993; Fujimoto 1997; Tomasik 2004, 2005
Blood glucagon-like peptide 1	⇒ ↓	Tomasik 2002, 2004, 2005
Blood peptide YY	(⇒) ↑ 3	Stock 2005; Germain 2007; Nakahara 2007; Misra 2006, 2007, 2008; Otto 2007; Lawson 2011b; Sedlakova 2012

1 Most of the studies found decreased insulin levels

2 Only three studies found no significant differences when compared to control group, and one found a decrease, while all the other found increased adiponectin levels

3 Most of the studies found increased PYY levels

*Hormones inhibiting food intake are on grey background

Table 5: Compared levels of bone turnover markers in AN patients and healthy matched population

Bone turnover markers*	AN/CT	References
Blood OC	(\Rightarrow) \Downarrow 1	Calero 1999; Grinspoon 1999; Caillio-Augusseau 2000; Gordon 2002; Misra 2003, 2004b, 2006, 2007, 2008; Weinbrenner 2003; Galusca 2006; Legroux-gérot 2007; Ohwada 2007; Viapiana 2007; Estour 2010, Ostrowska 2010, 2012a, 2012b
Blood procollagen type I N-terminal propeptide (PINP)	\Rightarrow \Downarrow	Calero 1999; Faje 2012
Blood procollagen type I C-terminal propeptide (PICP)	\Downarrow	Misra 2003, 2004b, 2006, 2007; Heer 2004; Mika 2007
Blood bone specific alkaline phosphatase (BSAP)	(\Rightarrow) \Downarrow 2	Calero 1999; Gordon 2002; Misra 2003, 2006; Heer 2004; Bolton 2005; Galusca 2006; Legroux gérot 2007; Mika 2007; Ohwada 2007; Viapiana 2007
Blood or urinary c-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (CTX)	\Uparrow \Downarrow 3	Caillio-Augusseau 2000; Weinbrenner 2003; Galusca 2006; Mika 2007; Estour 2010; Ostrowska 2010, 2012a, 2012b; Faje 2012
Blood cross-linked N-telopeptides of type 1 collagen (NTX)	\Uparrow \Downarrow	Gordon 2002; Dominguez 2007;
Urinary NTX/creatinine	\Uparrow \Downarrow 4	Grinspoon 1999; Misra 2003, 2006, 2007, 2008; Dominguez 2007

1 All but three studies found significant or non significant decreased OC levels

2 All but three studies found significant or non significant decreased BSAP levels

3 Increased CTX found by Caillio-Augusseau 2000, Weinbrenner 2003, Galusca 2006, Ohwada 2007 and Estour 2010

4 Only Grinspoon found increased urinary NTX/creatinine levels

*Bone resorption markers are on grey background

Table 6: Compared levels of other factors altered in AN patients

Other factors	AN/CT	References
Growth factors		
Blood GH	(\Rightarrow) \uparrow 1	Gianotti 2000; Misra 2003, 2004a, 2004c, 2005c, 2006, 2007; Stoving 2003; Tolle 2003; Broglio 2004a; Tanaka 2004; Miljic 2006; Germain 2007; Polli 2008; Arimura 2010; Estour 2010
Blood IGF-1	\downarrow	Grinspoon 1999; Stoving 1999, 2003, 2007; Gianotti 2000; Nedvidkova 2000; Di Carlo 2002; Gordon 2002; Misra 2003, 2004a, 2005c, 2006, 2007, 2008; Tolle 2003; Broglio 2004a; Heer 2004; Ohwada 2006, 2007; Germain 2007; Legroux-Gérot 2007; Mika 2007; Polli 2008; Haas 2009; Arimura 2010; Brick 2010; Estour 2010; Fazeli 2010b; Faje 2012
Steroid and Sexual hormones		
Blood LH	\downarrow	Stoving 1999, 2007; Di Carlo 2002; Holtkamp 2003b; Popovic 2004; Misra 2005c; Dominguez 2007; Germain 2007; Oświecimska 2007; Tomova 2007; Nogal 2008; Arimura 2010; Estour 2010; Ziora 2011
Blood FSH	(\Rightarrow) \downarrow 2	Stoving 1999, 2007; Di Carlo 2002; Holtkamp 2003b; Popovic 2004; Dominguez 2007; Germain 2007; Oświecimska 2007; Tomova 2007; Nogal 2008; Arimura 2010; Estour 2010; Ziora 2011
Estrogens	(\Rightarrow) \downarrow 3	Grinspoon 1999; Stoving 1999, 2007; Monteleone 2000, 2001; Di Carlo 2002; Holtkamp 2003b; Misra 2003, 2004a, 2004b, 2005c, 2006, 2007, 2008; Tolle 2003; Heer 2004; Popovic 2004; Bolton 2005; Dominguez 2007; Germain 2007; Mika 2007; Ohwada 2007; Oświecimska 2007; Haas 2009; Arimura 2010; Brick 2010; Estour 2010; Buehren 2011; Ziora 2011; Faje 2012
Cortisol	(\Rightarrow) \uparrow 4	Grinspoon 1999; Stoving 1999; Monteleone 2000, 2001; Putignano 2001; Misra 2003, 2004b, 2005c, 2006, 2007, 2008; Tolle 2003; Weinbrenner 2003; Heer 2004; Troisi 2005; Miljic 2006; Germain 2007; Oświecimska 2007; Nogal 2008; Haas 2009; Arimura 2010; Estour 2010; Buehren 2011; Ziora 2011; Faje 2012
Thyroid hormones	(\Rightarrow) \downarrow 5	Nedvidkova 2000; Di Carlo 2002 ; Holtkamp 2003b ; Weinbrenner 2003; Onur 2005; Troisi 2005; Brambilla 2006; Ohwada 2006, 2007; Oświecimska 2007;Nogal 2008; Arimura 2010; Estour 2010; Buehren 2011; Ziora 2011

1 All but two studies found increased GH levels

2 All but one study found decreased FSH

3 Most of the studies found decreased estrogen levels

4 Most of the studies found increased cortisol levels

5 All but two studies found decreased T3 and/or T4 levels

Composition des nourritures utilisées dans mes études :

- Special diet service RM1
- Special diet service RM3
- Research diet low fat diet (10% fat)
- Research diet very high fat diet (60% fat)

Rat and Mouse No.1 Maintenance

Pelleted, Expanded and Expanded Ground

SUITABLE SPECIES AND APPLICATIONS

Rats and mice for long and short term maintenance.

BENEFITS

- High quality human food grade soya bean concentrate provides a less variable source of protein.
- Low protein level promotes longer life expectancy, reducing obesity and associated problems in the aged animal.
- Low nutrient levels reduce the risk of undesirable side-effects in toxicity trials being masked.

FEEDING GUIDE

Ad-lib feeding is recommended.

AVAILABLE AS

Diet	Form	Product Code
<i>Standard</i>		
RM1 (P)	9.5mm Pelleted	801151
RM1 (E)	Expanded	801002
<i>SQC</i>		
RM1 (E) SQC	Expanded	811002
RM1 (E) FG SQC	Expanded Ground	811004

- All diets are available irradiated and are available in a range of packaging.
- All Standard diets are available with full analysis on request.

INGREDIENTS

Wheat, Barley, Wheatfeed, De-hulled Extracted Toasted Soya, Soya Protein Concentrate, Macro Minerals, Soya Oil, Whey Powder, Amino Acids, Vitamins, Micro Minerals.



Calculated Analysis

NUTRIENTS		Total	Supp (9)
Proximate Analysis			
Moisture (1)	%	10.00	
Crude Oil	%	2.71	
Crude Protein	%	14.38	
Crude Fibre	%	4.65	
Ash	%	6.00	
Nitrogen Free Extract	%	61.73	
Digestibility Co-Efficients (7)			
Digestible Crude Oil	%	2.47	
Digestible Crude Protein	%	12.92	
Carbohydrates, Fibre and Non Starch Polysaccharides (NSP)			
Total Dietary Fibre	%	17.05	
Pectin	%	1.52	
Hemicellulose	%	10.17	
Cellulose	%	4.32	
Lignin	%	1.68	
Starch	%	44.97	
Sugar	%	4.05	
Energy (5)			
Gross Energy	MJ/kg	14.74	
Digestible Energy (15)	MJ/kg	11.90	
Metabolisable Energy (15)	MJ/kg	10.74	
Atwater Fuel Energy (AFE)(8)	MJ/kg	13.75	
AFE from Oil	%	7.42	
AFE from Protein	%	17.49	
AFE from Carbohydrate	%	75.09	
Fatty Acids			
Saturated Fatty Acids			
C12:0 Lauric	%	0.02	
C14:0 Myristic	%	0.14	
C16:0 Palmitic	%	0.31	
C18:0 Stearic	%	0.04	
Monounsaturated Fatty Acids			
C14:1 Myristoleic	%	0.02	
C16:1 Palmitoleic	%	0.09	
C18:1 Oleic	%	0.77	
Polyunsaturated Fatty Acids			
C18:2(ω6) Linoleic	%	0.69	
C18:3(ω3) Linolenic	%	0.06	
C20:4(ω6) Arachidonic	%	0.13	
C22:5(ω3) Clupanodonic	%		
Amino Acids			
Arginine	%	0.91	
Lysine (6)	%	0.66	0.07
Methionine	%	0.22	0.04
Cystine	%	0.24	
Tryptophan	%	0.18	
Histidine	%	0.35	
Threonine	%	0.49	
Isoleucine	%	0.54	
Leucine	%	0.98	
Phenylalanine	%	0.66	
Valine	%	0.69	
Tyrosine	%	0.49	
Taurine	%		
Glycine	%	1.11	
Aspartic Acid	%	0.67	

NUTRIENTS		Total	Supp (9)
Glutamic Acid	%	3.17	
Proline	%	1.20	
Serine	%	0.56	
Hydroxyproline	%		
Hydroxylysine	%		
Alanine	%	0.16	
Macro Minerals			
Calcium	%	0.73	0.63
Total Phosphorus	%	0.52	0.04
Phytate Phosphorus	%	0.24	
Available Phosphorus	%	0.28	0.04
Sodium	%	0.25	0.19
Chloride	%	0.38	0.32
Potassium	%	0.67	
Magnesium	%	0.23	
Micro Minerals			
Iron	mg/kg	159.30	82.50
Copper	mg/kg	11.50	1.94
Manganese	mg/kg	72.44	19.22
Zinc	mg/kg	35.75	
Cobalt	µg/kg	634.10	550.00
Iodine	µg/kg	1202.69	1085.00
Selenium	µg/kg	298.99	100.00
Fluorine	mg/kg	10.49	
Vitamins			
β-Carotene (2)	mg/kg	0.16	
Retinol (2)	µg/kg	2566.38	2400.00
Vitamin A (2)	iu/kg	8554.27	8000.00
Cholecalciferol (3)	µg/kg	15.54	15.00
Vitamin D (3)	iu/kg	621.70	600.00
α-Tocopherol (4)	mg/kg	76.45	56.82
Vitamin E (4)	iu/kg	84.10	62.50
Vitamin B ₁ (Thiamine)	mg/kg	8.58	1.96
Vitamin B ₂ (Riboflavin)	mg/kg	4.33	2.94
Vitamin B ₆ (Pyridoxine)	mg/kg	4.81	0.98
Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)	µg/kg	7.49	6.00
Vitamin C (Ascorbic Acid)	mg/kg	2.59	
Vitamin K (Menadione)	mg/kg	10.17	9.36
Folic Acid (Vitamin B ₉)	mg/kg	0.79	
Nicotinic Acid (Vitamin PP) (6)	mg/kg	61.32	2.45
Pantothenic Acid (Vitamin B _{3/5})	mg/kg	20.17	5.80
Choline (Vitamin B _{4/7})	mg/kg	1080.14	366.60
Inositol	mg/kg	2369.59	
Biotin (Vitamin H) (6)	µg/kg	277.13	

Notes

- All values are calculated using a moisture basis of 10%.
Typical moisture levels will range between 9.5 - 11.5%.
- a. Vitamin A includes Retinol and the Retinol equivalents of β-carotene
b. Retinol includes the Retinol equivalents of β-Carotene.
c. 0.48 µg Retinol = 1 µg β-carotene = 1.6 iu Vitamin A activity
d. 1 µg Retinol = 3.33* iu Vitamin A activity
e. 1 iu Vitamin A = 0.3 µg Retinol = 0.6 µg β-carotene
f. The standard analysis for Vitamin A does not detect β-carotene
- 1 µg Cholecalciferol (D₃) = 40.0 iu Vitamin D
- 1 mg all-*rac*-α-tocopherol = 1.1 iu Vitamin E activity
1 mg all-*rac*-α-tocopherol acetate = 1.0 iu Vitamin E activity
- 1 MJ = 239.23 Kcalories = 239.23 Calories = 239,230 calories
- These nutrients coming from natural raw materials such as cereals may have low availabilities due to the interactions with other compounds.
- Based on in-vitro digestibility analysis.
- AF Energy = Atwater Fuel Energy = ((CO%/100)*9000)+
((CP%/100)*4000)+((NFE%/100)*4000)/239.23
- Supplemented nutrients from manufactured and mined sources.
- Calculated.

Rat and Mouse No.3 Breeding

Pelleted

SUITABLE SPECIES AND APPLICATIONS

Rats and mice for breeding, lactation, and growth of young stock.

BENEFITS

- High nutrient levels promote excellent breeding performances and fast growth rates in young stock.

FEEDING GUIDE

Ad-lib feeding is recommended.

AVAILABLE AS

Diet	Form	Product Code
<i>Standard</i> RM3 (P)	9.5mm Pelleted	801700

- All diets are available irradiated and are available in a range of packaging.
- All Standard diets are available with full analysis on request.

INGREDIENTS

Wheat, Wheatfeed, De-hulled Extracted Toasted Soya, Barley, Macro Minerals, Yeast, Potato Protein, Hydrolysed Wheat Gluten, Full Fat Soya, Soya Oil, Maize Gluten Meal, Dextrose Monohydrate, Vitamins, Micro Minerals, Amino Acids.



Calculated Analysis

NUTRIENTS		Total	Supp (9)
Proximate Analysis			
Moisture (1)	%	10.00	
Crude Oil	%	4.20	
Crude Protein	%	22.45	
Crude Fibre	%	4.42	
Ash	%	8.05	
Nitrogen Free Extract	%	50.40	
Digestibility Co-Efficients (7)			
Digestible Crude Oil	%	3.81	
Digestible Crude Protein	%	20.18	
Carbohydrates, Fibre and Non Starch Polysaccharides (NSP)			
Total Dietary Fibre	%	16.15	
Pectin	%	1.53	
Hemicellulose	%	9.61	
Cellulose	%	4.13	
Lignin	%	1.54	
Starch	%	33.88	
Sugar	%	4.37	
Energy (5)			
Gross Energy	MJ/kg	15.11	
Digestible Energy (15)	MJ/kg	12.22	
Metabolisable Energy (15)	MJ/kg	11.18	
Atwater Fuel Energy (AFE) (8)	MJ/kg	13.76	
AFE from Oil	%	11.48	
AFE from Protein	%	27.28	
AFE from Carbohydrate	%	61.24	
Fatty Acids			
Saturated Fatty Acids			
C12:0 Lauric	%	0.05	
C14:0 Myristic	%	0.17	
C16:0 Palmitic	%	0.37	
C18:0 Stearic	%	0.11	
Monounsaturated Fatty Acids			
C14:1 Myristoleic	%	0.01	
C16:1 Palmitoleic	%	0.09	
C18:1 Oleic	%	1.01	
Polyunsaturated Fatty Acids			
C18:2(ω6) Linoleic	%	1.26	
C18:3(ω3) Linolenic	%	0.17	
C20:4(ω6) Arachidonic	%	0.12	
C22:5(ω3) Clupanodonic	%		
Amino Acids			
Arginine	%	1.42	
Lysine (6)	%	1.34	0.18
Methionine	%	0.37	0.03
Cystine	%	0.35	
Tryptophan	%	0.27	
Histidine	%	0.55	
Threonine	%	0.88	
Isoleucine	%	0.98	
Leucine	%	1.87	
Phenylalanine	%	1.23	
Valine	%	1.15	
Tyrosine	%	0.87	
Taurine	%		
Glycine	%	1.85	
Aspartic Acid	%	1.40	

NUTRIENTS		Total	Supp (9)
Glutamic Acid	%	4.39	
Proline	%	1.56	
Serine	%	1.01	
Hydroxyproline	%		
Hydroxylysine	%		
Alanine	%	0.27	
Macro Minerals			
Calcium	%	1.24	1.11
Total Phosphorus	%	0.83	0.28
Phytate Phosphorus	%	0.26	
Available Phosphorus	%	0.56	0.28
Sodium	%	0.24	0.19
Chloride	%	0.36	0.31
Potassium	%	0.81	
Magnesium	%	0.29	0.04
Micro Minerals			
Iron	mg/kg	163.44	82.50
Copper	mg/kg	20.53	8.75
Manganese	mg/kg	102.71	52.70
Zinc	mg/kg	48.67	8.64
Cobalt	µg/kg	604.44	525.00
Iodine	µg/kg	867.77	775.00
Selenium	µg/kg	388.94	200.00
Fluorine	mg/kg	8.67	
Vitamins			
β-Carotene (2)	mg/kg	1.67	
Retinol (2)	µg/kg	6670.95	5812.50
Vitamin A (2)	iu/kg	22213.06	19375.00
Cholecalciferol (3)	µg/kg	73.70	72.50
Vitamin D (3)	iu/kg	2948.01	2900.00
α-Tocopherol (4)	mg/kg	100.90	81.14
Vitamin E (4)	iu/kg	111.02	89.25
Vitamin B ₁ (Thiamine)	mg/kg	28.39	19.11
Vitamin B ₂ (Riboflavin)	mg/kg	10.28	7.60
Vitamin B ₆ (Pyridoxine)	mg/kg	18.87	14.45
Vitamin B ₁₂ (Cyanocobalamin)	µg/kg	19.23	17.75
Vitamin C (Ascorbic Acid)	mg/kg	1.33	
Vitamin K (Menadione)	mg/kg	4.14	3.72
Folic Acid (Vitamin B ₉)	mg/kg	2.99	0.49
Nicotinic Acid (Vitamin PP) (6)	mg/kg	85.74	19.11
Pantothenic Acid (Vitamin B _{3/5})	mg/kg	40.79	23.80
Choline (Vitamin B _{4/7})	mg/kg	1422.37	366.60
Inositol	mg/kg	1839.97	
Biotin (Vitamin H) (6)	µg/kg	316.66	

Notes

- All values are calculated using a moisture basis of 10%. Typical moisture levels will range between 9.5 - 11.5%.
- a. Vitamin A includes Retinol and the Retinol equivalents of β-carotene
b. Retinol includes the Retinol equivalents of β-Carotene.
c. 0.48 µg Retinol = 1 µg β-carotene = 1.6 iu Vitamin A activity
d. 1 µg Retinol = 3.33* iu Vitamin A activity
e. 1 iu Vitamin A = 0.3 µg Retinol = 0.6 µg β-carotene
f. The standard analysis for Vitamin A does not detect β-carotene
- 1 µg Cholecalciferol (D₃) = 40.0 iu Vitamin D
- 1 mg all-*rac*-α-tocopherol = 1.1 iu Vitamin E activity
1 mg all-*rac*-α-tocopherol acetate = 1.0 iu Vitamin E activity
- 1 MJ = 239.23 Kcalories = 239.23 Calories = 239,230 calories
- These nutrients coming from natural raw materials such as cereals may have low availabilities due to the interactions with other compounds.
- Based on in-vitro digestibility analysis.
- AF Energy = Atwater Fuel Energy = ((CO%/100)*9000)+((CP%/100)*4000)+((NFE%/100)*4000)/239.23
- Supplemented nutrients from manufactured and mined sources.
- Calculated.



Product Data - D12450B

Report ▶ Repeat ▶ Revise

Description

Rodent Diet with 10% kcal% fat.

Used in Research

Obesity
Diabetes

Packaging

Product is packed in 12.5 kg box.
Each box is identified with the product name, description, lot number and expiration date.

Lead Time

IN-STOCK.
Ready for next day shipment.

Gamma-Irradiation

Yes. Add 10 days to delivery time.

Form

Pellet, Powder, Liquid

Shelf Life

Most diets require storage in a cool dry environment. Stored correctly they should last 6 months.

Control Diets

Used as a control diet for D12451 and D12492

Sucrose Content

35% Sucrose
See D12450J, K, H for other options.

Formula

Product #D12450B	gm%	kcal%
Protein	19.2	20
Carbohydrate	67.3	70
Fat	4.3	10
Total kcal/gm	3.85	100
Ingredient	gm	kcal
Casein, 30 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	315	1260
Maltodextrin 10	35	140
Sucrose	350	1400
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	20	180
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Yellow Dye #5	0.05	0
Total	1055.05	4057

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

*Typical analysis of cholesterol in lard = 0.72 mg/gram.
Cholesterol (mg)/4057 kcal = 54.4
Cholesterol (mg)/kg = 51.6



Report ▶ Repeat ▶ Revise

Product Data - D12492

Description

Rodent Diet with 60% kcal% fat.

Used in Research

- Fatty Liver
- Inflammation
- Obesity
- Diabetes

Packaging

Product is packed in 12.5 kg box.
Each box is identified with the product name, description, lot number and expiration date.

Lead Time

IN-STOCK.
Ready for next day shipment.

Gamma-Irradiation

Yes. Add 10 days to delivery time.

Form

Pellet, Powder, Liquid

Shelf Life

Most diets require storage in a cool dry environment. Stored correctly they should last 6 months.
Because of the high fat content is best if kept frozen.

Control Diets

D12450B, D12450J, D12450K

Formula

Product #D12492	gm%	kcal%
Protein	26.2	20
Carbohydrate	26.3	20
Fat	34.9	60
Total kcal/gm	5.24	100

Ingredient	gm	kcal
Casein, 30 Mesh	200	800
L-Cystine	3	12
Corn Starch	0	0
Maltodextrin 10	125	500
Sucrose	68.8	275.2
Cellulose, BW200	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard*	245	2205
Mineral Mix S10026	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
FD&C Blue Dye #1	0.05	0
Total	773.85	4057

Formulated by E. A. Ulman, Ph.D., Research Diets, Inc., 8/26/98 and 3/11/99.

*Typical analysis of cholesterol in lard = 0.72 mg/gram.
Cholesterol (mg)/4057 kcal = 216.4
Cholesterol (mg)/kg = 279.6



Where NutriPhenomics Begins



