



**HAL**  
open science

# Rôle de l'acide polysialique (PSA) dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire et du poids corporel

Xavier Brenachot

► **To cite this version:**

Xavier Brenachot. Rôle de l'acide polysialique (PSA) dans le contrôle hypothalamique de la prise alimentaire et du poids corporel. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS096 . tel-01698812

**HAL Id: tel-01698812**

**<https://theses.hal.science/tel-01698812v1>**

Submitted on 1 Feb 2018

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

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

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bourgogne**

Discipline : Sciences de la vie (Physiologie et Neurosciences)

Par

**Xavier BRENACHOT**

Le vendredi 20 décembre 2013

**ROLE DE L'ACIDE POLYSIALIQUE (PSA) DANS LE CONTROLE  
HYPOTHALAMIQUE DE LA PRISE ALIMENTAIRE ET DU POIDS CORPOREL**

Directeur de Thèse : **Dr. Corinne Leloup**

Co directeur de Thèse : **Dr. Luc Pénicaud**

Encadrant : **Dr. Alexandre Benani**

**Jury**

<b>Pr Pascal Degrace</b>	Professeur des Universités, Université de Bourgogne	<b>Président</b>
<b>Pr. Christophe Magnan</b>	Professeur des Universités, Université Paris Diderot - Paris VII	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr. Vincent Prévot</b>	Directeur de Recherche, INSERM, Lille	<b>Rapporteur</b>
<b>Dr. Patricia Parnet</b>	Directeur de Recherches, INRA, Nantes	<b>Examineur</b>
<b>Dr. Sophie Layé</b>	Directeur de Recherche, INRA, Bordeaux	<b>Examineur</b>
<b>Dr. Luc Pénicaud</b>	Directeur de Recherche, CNRS, Dijon	<b>Directeur de Thèse</b>
<b>Dr. Alexandre Benani</b>	Chargé de Recherche, CNRS, Dijon	<b>Co-directeur de Thèse</b>

## Remerciements

L'aboutissement de cette thèse est le fruit d'un travail collectif, avant toute chose. En ce sens, je tiens à remercier toutes les personnes m'ayant aidé, de près ou de loin, à la réalisation de cette tâche. Je remercie :

La région Bourgogne d'avoir financé ce Doctorat.

Les membres du jury d'avoir accepté de lire et d'évaluer ces travaux. Merci de votre disponibilité.

Le Dr. Luc Pénicaud, directeur du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, chef de notre équipe de m'avoir accepté au sein de son laboratoire et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser mon Doctorat.

Le Dr. Alexandre Benani qui encadra l'ensemble de mes travaux, quotidiennement et sans relâche. La réussite de ce Doctorat n'aurait pas été possible sans l'investissement sans faille dont tu as fait preuve. Merci de m'avoir dirigé vers une réflexion scientifique rigoureuse et pertinente. Ce que j'ai acquis au sein de ces années te revient entièrement, « on ne lâche rien, jamais ».

Le Dr. Emmanuelle Nedelec et le Dr. Caroline Rigault pour leur aide, leurs conseils et leur bienveillance sur mes travaux. Merci de m'avoir fait part de votre expérience et de votre savoir, où aucune de mes questions n'est restée sans réponse.

Le Pr. Corinne Leloup et le Dr. Xavier Fioramonti pour les nombreux échanges et réflexions scientifiques effectués. Votre porte a toujours été ouverte et vos connaissances en physiologie m'ont été extrêmement précieuses.

Le Dr. Laurent Lagrost, le Dr. Thomas Gautier et le Dr. Valérie Deckert pour leur aide scientifique et technique sur les aspects du cholestérol. Nous ne sommes pas un laboratoire centré sur les lipoparticules et votre expertise a été salvatrice.

Le Dr. Pierre Fafournoux, le Dr. Anne Catherine Maurin et Laurent Parry avec qui j'ai pu collaborer à Clermont Ferrand. Je remercie également le Pr. Claude Knauf, sans qui, mon intégration au monde de la recherche n'aurait pas été possible : je ne l'oublierai pas.

Je remercie l'ensemble de notre équipe « Cerveau, Métabolisme et Sensorialité ». Je remercie également le Dr. Xavier Grosmaître, chef de l'équipe « Plasticité fonctionnelle des neurones olfactifs », pour m'avoir apporté une vision plus cognitive des neurosciences, avec des questions toujours très pertinentes lors des séminaires.

Des acteurs discrets, mais Ô combien importants dans un laboratoire, je remercie sincèrement les personnes du service technique Cedric Serrano et Michel Tavan, les membres de l'équipe administrative, Olivier Lalouette, Véronique Buet, Christine Chabert, Sabine Duchesne, Daniella Genet et Patricia Laurent, notre animalière Anne Lefranc pour son travail exceptionnel et irréprochable.

Enfin, ce Doctorat aura été avant tout une très belle aventure humaine. J'y ai rencontré des personnes formidables parmi les autres Doctorants, Post-Doctorants et Ingénieurs, où beaucoup sont devenus des amis proches. Merci du fond du cœur à ces personnes, pour avoir partagé mes peines et mes joies : Camille Allard, Imad Aoudé, Lionel Carneiro, Chloé Chrétien, Brandon Cline, Lucie Desmoulins, Nicolas Dollion, Alexandra Gouazé, Christophe Guillerault, Adrien Molinas, Amélie Pécourt, Sébastien Rivière et Bassim Tazir.

A vous tous et bien d'autres, merci.

## Résumé

L'hypothalamus joue un rôle clef dans la régulation de l'homéostasie énergétique grâce à la présence de circuits neuronaux contrôlant la prise alimentaire. Ces circuits peuvent être remodelés dans le cerveau. Nous avons émis l'hypothèse que la plasticité de ces circuits intervient en conditions physiologiques. Nous avons démontré que les synapses des neurones à pro-opiomélanocortine sont modifiées en fonction de l'alimentation. Ce processus de plasticité est indispensable pour ajuster la prise alimentaire et nécessite la présence d'un polymère glucidique appelé PSA (acide polysialique), se fixant sur les protéines d'adhésion cellulaire NCAM et limitant les contacts synaptiques. Nous avons évalué le lien entre la plasticité cérébrale et la vulnérabilité à développer une obésité chez des souris placées en régime gras pendant 3 mois. La réponse comportementale au régime gras était variable, et prédictive de la prise de poids à terme, et était liée aux taux de PSA hypothalamique. La déplétion chronique de PSA dans l'hypothalamus a accéléré la prise de poids et l'adiposité des animaux. Ces résultats suggèrent qu'une capacité réduite de plasticité synaptique est un facteur de risque de l'obésité. En parallèle, nous nous sommes intéressés à l'homéostasie du cholestérol circulant contrôlée par le système à mélanocortine. Il existe un mécanisme de régulation du cholestérol circulant dépendant de PSA dans l'hypothalamus. Une dérégulation de ce mécanisme a provoqué l'accumulation de dépôts graisseux dans les vaisseaux sanguins. L'ensemble de ces travaux a permis de mettre en évidence le rôle de la plasticité synaptique hypothalamique dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

Mots clefs : hypothalamus, plasticité synaptique, homéostasie énergétique, prise alimentaire

## Abstract

Hypothalamus plays a major role in the regulation of energy homeostasis by the presence of neural circuits controlling food intake. These circuits are plastic and can be rewired during adulthood. We hypothesized that synaptic plasticity can occur during physiological conditions. We have shown that synaptic contact on hypothalamic anorexigen POMC neurons are rewired in mouse upon high fat diet (HFD). This synaptic process is mandatory to adjust energy intake and requires the glycan PSA (polysialic acid). PSA promotes synaptic plasticity in the brain by the weakening of cell-to-cell interaction by addition on NCAM (neural cell adhesion molecule). We hypothesized that a defect in brain synaptic plasticity capacity could be a risk factor in the etiology of metabolic diseases. We show that homeostatic feeding response to HFD ingestion was predictive to weight gain observed three months after HFD introduction. The feeding response to HFD was correlated with the hypothalamus PSA level. We show that chronic depletion of hypothalamic PSA accelerate the onset of diet induced obesity. These results indicate that a low hypothalamic PSA level prone to diet induced obesity. In parallel, we focus on the hypothalamic regulation of circulating cholesterol. Melanocortin system control level of circulating cholesterol. Using our model of diet induced synaptic plasticity; we show that there is a link between hypothalamic PSA and circulating cholesterol. A long term reduction of hypothalamic PSA level, lead to an accumulation of fat deposit in blood vessels. This whole work allows us to underscore the role of diet induced synaptic plasticity in the regulation of energy homeostasis.

Keywords: hypothalamus, synaptic plasticity, energy homeostasis, food intake

# Table des matières

Remerciements .....	2
Résumé .....	3
Abstract .....	4
Table des matières.....	5
Liste des figures .....	8
Liste des abréviations .....	10
Préambule .....	13
1. Homéostasie énergétique.....	13
2. Contrôle de la prise alimentaire .....	14
Introduction .....	16
Régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique .....	17
1. Le système nerveux central : centre d'intégration .....	17
2. L'hypothalamus .....	19
A. Localisation et structure .....	19
B. Noyaux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire.....	19
C. Intra et interconnexions des noyaux hypothalamiques .....	22
D. Système à mélanocortine .....	24
Définition et rôle.....	24
Anatomie du système à mélanocortine .....	29
Régulation hormonale de l'activité du système à mélanocortine.....	30
Interconnexions des neurones AgRP/NPY et POMC/CART .....	31
3. Plasticité hypothalamique et régulation de l'homéostasie énergétique.....	34
A. Définition.....	34
B. Mise en évidence de la plasticité des circuits neuronaux de la prise alimentaire dans des modèles expérimentaux.....	34
C. Plasticité des circuits neuronaux de la prise alimentaire dépendant de l'état énergétique	38
4. Rôle de PSA-NCAM dans la plasticité synaptique hypothalamique.....	45

A. Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) .....	45
B. L'acide polysialique (PSA) et PSA-NCAM .....	46
C. Plasticité synaptique PSA dépendante .....	48
<b>Problématique .....</b>	<b>53</b>
<b>Objectifs .....</b>	<b>54</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>56</b>
<b>Objectif 1 : évaluer l'implication de la plasticité hypothalamique dans le contrôle de la prise alimentaire .....</b>	<b>57</b>
1. Caractérisation du modèle.....	57
2. Adaptation comportementale et métabolique en réponse au HFD .....	58
A. Adaptation comportementale .....	58
B. Adaptation métabolique.....	58
3. Signature moléculaire de plasticité hypothalamique synaptique induite par le régime HFD....	60
4. La nouveauté n'est pas suffisante pour induire PSA dans l'hypothalamus .....	63
5. L'exposition au régime HFD pendant 3 jours induit des reconnections synaptiques des neurones POMC.....	65
6. PSA est requis pour les reconnections synaptiques des POMC .....	67
7. PSA est requis pour établir la réponse homéostatique face au HFD .....	67
8. Discussion.....	71
9. Article 1 .....	74
<b>Objectif 2 : évaluer les effets d'un défaut de plasticité hypothalamique dans un modèle d'obésité.....</b>	<b>85</b>
1. Différences interindividuelles de réponse homéostatique au HFD.....	86
2. Les différentes réponses comportementales sont liées au taux hypothalamique de PSA .....	92
3. La suppression de PSA dans l'hypothalamus accélère le développement de l'obésité.....	93
4. Une réduction partielle de la polysialylation de l'hypothalamus accélère le développement de l'obésité.....	95
5. Discussion.....	97
6. Article 2 .....	100
<b>Objectif 3 : évaluer les effets d'une déficience innée de plasticité synaptique dans un modèle d'obésité.....</b>	<b>106</b>

1. Effet du régime HFD sur les animaux PST-1 KO .....	107
2. Discussion .....	109
<b>Objectif 4 : évaluer les effets d'un défaut de plasticité hypothalamique dans un modèle d'athérosclérose.....</b>	<b>110</b>
1. Régulation homéostatique du cholestérol circulant .....	112
2. Rôle de PSA hypothalamus dans l'homéostasie du cholestérol circulant.....	114
3. Implication de PSA dans la production des VLDL circulantes .....	116
4. Implication de PSA dans le développement de l'athérosclérose .....	118
5. Discussion.....	119
<b>Conclusion.....</b>	<b>121</b>
<b>Perspectives .....</b>	<b>123</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>125</b>
1. Matériels et méthodes .....	126
A. Séparation des lipoparticules, dosage du cholestérol et des triglycérides .....	126
B. Coloration des aortes et quantification des dépôts .....	126
2. Participation à des travaux .....	127
<b>Références .....</b>	<b>129</b>



## Liste des figures

Figure 1 : Balance énergétique équilibrée.....	13
Figure 2 : Balance énergétique excédentaire.....	15
Figure 3 : Balance énergétique déficitaire.....	15
Figure 4 : Le cerveau participe au maintien de l'homéostasie énergétique.....	18
Figure 5 : Schéma d'un cerveau de rongeur montrant les principales régions hypothalamiques impliquées dans la régulation nerveuse du métabolisme énergétique .....	20
Figure 6 : Vue tridimensionnelle de l'hypothalamus de rongeur .....	21
Figure 7 : Schéma des connexions neuronales intra et interhypothalamiques impliquées dans l'homéostasie énergétique .....	23
Figure 8 : Schéma des circuits neuronaux du système à mélanocortine.....	29
Figure 9 : Schéma du système à mélanocortine dans le noyau arqué.....	32
Figure 10 : Synthèse du rôle du système à mélanocortine dans la régulation de l'homéostasie énergétique.....	33
Figure 11 : Expérience de Pinto .....	35
Figure 12 : Variation du taux d'hormones (et de glucose) impliqués dans le métabolisme en fonction du temps .....	37
Figure 13 : Nouvelle population neuronale glutamatergique activant les neurones AgRP.....	40
Figure 14 : Contrôle du tonus excitateur sur les neurones AgRP/NPY.....	41
Figure 15 : Nouveau modèle du système à mélanocortine.....	43
Figure 16 : NCAM et ses trois isoformes .....	45
Figure 17 : Synthèse de PSA-NCAM .....	46
Figure 18 : Mécanisme de répulsion/adhésion cellulaire de PSA-NCAM.....	47
Figure 19 : Résumé des différents rôles de PSA dans le système nerveux .....	48
Figure 20 : Génération de nouvelles synapses par la LTP .....	49
Figure 21 : Schéma montrant l'implication des pieds astrocytaires dans la transmission synaptique .....	51
Figure 22 : Effet du régime HFD à court terme .....	59
Figure 23 : L'hypothalamus des souris nourries en HFD présente des signes de plasticité moléculaires .....	62
Figure 24 La nouveauté n'est pas suffisante pour augmenter le niveau de PSA dans l'hypothalamus.....	64
Figure 25 : Les neurones POMC du noyau arqué des souris nourries en HFD sont reconnectés 3 jours après le début de l'exposition .....	66
Figure 26 : Le retrait de PSA dans l'hypothalamus altère le contrôle homéostatique de la prise énergétique après l'introduction de HFD.....	69
Figure 27 : Une déficience de l'enzyme PST-1 altère le contrôle homéostatique de la prise énergétique après l'introduction du régime HFD.....	70

Figure 28 : Normalisation de la prise alimentaire après introduction de HFD.....	86
Figure 29 : Prise énergétique individuelle après l'introduction du régime.....	87
Figure 30 : Création des groupes « intolérant » et « tolérant » .....	87
Figure 31 : Différences interindividuelles de réponses comportementales au régime HFD révélant une sensibilité à l'obésité nutritionnelle.....	89
Figure 32 : Consommation calorique journalière des souris tolérantes et intolérantes sur 3 mois de régime HFD.....	90
Figure 33 : Calories consommées pendant 3 mois de régime HFD .....	90
Figure 34 : Corrélations entre la réponse comportementale et certains paramètres métaboliques .....	91
Figure 35 : Quantité de PSA dans les biopsies hypothalamiques des souris tolérantes et intolérantes.....	92
Figure 36 : La suppression de PSA dans l'hypothalamus accélère le développement de l'obésité .....	94
Figure 37 La réduction de PSA dans l'hypothalamus augmente le gain de poids sous HFD .....	96
Figure 38 : Les souris PST-1 KO sont vulnérables à l'obésité.....	108
Figure 39 : Régulation homéostatique du cholestérol circulant .....	113
Figure 40 : Régulation central du cholestérol circulant par PSA.....	115
Figure 41 : Production de VLDL circulantes .....	117
Figure 42 Modèle proposé.....	122

## Liste des abréviations

3V : 3ème ventricule

aCSF : artificial cerebrospinal fluid

ACTH : Hormone adrenocorticotropique

ARC : Noyau Arqué

AgRP : Agouti Related Peptide

AMPA :  $\alpha$  alpha-amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate

AMPK : 5' AMP-activated protein kinase

AUC : Area under curve

BDNF : Brain-derived neurotrophic factor

BST : Noyau des stria terminalis

BW : Bodyweight

CAMKK : calmodulin dependent protein kinase kinase

CART : Cocaine and Amphetamine regulated transcript

CC : Corps calleux

CCK : Cholecystokinine

CCX : Cortex cérébral

CEA : Noyau centrale de l'amygdale

CTRL : contrôle

DMH : Hypothalamus dorosmédian

DMN : Noyau dorsomédian

DMV : Noyau dorsomoteur du nerf vague

EM : Eminence médiane

EndoN : Endoneuraminidase N

Fn : Fibronectine

FX : Fornix

GABA : Acide  $\gamma$ -aminobutyrique

GFP : Green Fluorescent Protein

GHSR : Growth hormone secretagogue receptor

GIIS : Glucose induced insulin secretion

GLP-1 : Glucagon like peptide 1

GNE : UDP-N-acétylglucosamine 2-épimerase/N- acétylmannosamine-kinase

GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone

GPI : glycosylphosphatidylinositol

HDL : High density lipoprotein

HFD : High Fat Diet

Ig : Immunoglobuline

IMC : Indice de masse corporelle  
KO : Knocked Out  
LCR : Liquide céphalorachidien  
LDL : Low density lipoprotein  
LDLR : Low density lipoprotein receptor  
LEPR : Récepteur à la leptine  
LH : Hypothalamus latéral  
LPB : Noyau latéral parabrachial  
LTP : Long term potentiation  
MBH : Hypothalamus mediobasal  
MCH : Melanin concentrating hormone  
MCR : Récepteur à la mélanocortine (1 – 5)  
ME : Eminence médiane  
mEPSC : courant excitateur miniature postsynaptique  
MSH : Melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )  
MTII : melanocortin agonist melanotan-II  
NA : Noyau arqué  
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule  
NeuNAc :  $\alpha$ 2-8-acide N-acétylneuraminique  
NMDA : N-méthyl-D-aspartate  
NPY : Neuropeptide Y  
NTS : Noyau du tractus solitaire  
OC : Chiasma optique  
OMS : Organisation mondiale de la santé  
OR : Récepteur aux opioïdes  
PA : Prise alimentaire  
pf : pair fed  
POMC : Pro-opiomélanocortine  
PSA : Polysialic acid  
PST : Polysialyl Transferase  
PVN : Noyau paraventriculaire  
PVH : Hypothalamus paraventriculaire  
RET : Noyau réticulaire  
RyR : Ryanodin receptor  
sEPSC : courant excitateur spontané post-synaptique  
sIPSC : courant inhibiteur spontané post-synaptique  
SF1 : Steroidogenic factor 1  
SNC : Système nerveux central

SNA : Système nerveux autonome  
SS : Sylvester Stallone  
STD : Standard Diet  
STX : Sialyltransférase X  
TRH : Thyrotropin releasing hormone  
TTX : Tetrodotoxin  
UCP : Uncoupling Protein  
veh : vehicule  
VMH : Hypothalamus ventromédian  
VMN : Noyau ventromédian  
VLDL : very low density lipoprotein  
VTA : Aire tegmentale ventrale  
WT : Wild type  
YR : Récepteur au neuropeptide Y (1, 2, 4, 5, 6)

# Préambule

## 1. Homéostasie énergétique

A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, Claude Bernard et Walter Cannon développent le concept d'homéostasie. L'homéostasie est la capacité de tout système biologique à maintenir une stabilité relative de son milieu interne, malgré les fluctuations environnementales. Il s'agit là d'un équilibre dynamique qui doit être contrôlé pour être maintenu. Selon ce concept, bon nombre de fonctions physiologiques sont contrôlées chez les mammifères : la fréquence des battements cardiaques, la pression sanguine, les fonctions respiratoires ou encore la glycémie. L'ensemble de ces contrôles a pour but de maintenir l'intégrité d'un individu.

Un apport énergétique permanent est nécessaire pour assurer le bon fonctionnement de l'organisme. Pour cela, l'énergie apportée par les nutriments ingérés est assimilée puis utilisée immédiatement ou stockée pour une utilisation future. L'ensemble de ces processus définit l'homéostasie énergétique. On représente souvent l'homéostasie énergétique sous forme de balance équilibrée entre les apports et les dépenses énergétiques. Les apports trouvent principalement leurs origines dans l'alimentation, tandis que les dépenses résultent principalement du métabolisme basal et de l'activité physique (**Figure 1**). Le maintien du poids corporel est le reflet de l'homéostasie énergétique. Un individu adulte sain conserve donc un poids stable malgré des apports et des dépenses variables. Il s'agit de la notion de pondérostasie. De ce fait, l'homéostasie énergétique est contrôlée pour maintenir cette constante. Le contrôle de l'homéostasie énergétique est le fruit d'une régulation fine et primordiale à l'échelle de tout l'organisme : organes, tissus, cellules.



**Figure 1 : Balance énergétique équilibrée**

*Les apports énergétiques sont équivalents aux dépenses : la balance est équilibrée*

## 2. Contrôle de la prise alimentaire

Malgré des apports variables en quantité et en qualité, et discontinus, l'homéostasie énergétique est conservée au cours de la journée. Cela se traduit par un contrôle de la prise alimentaire précis qui s'exerce lors du commencement de celle-ci, de sa fin et de sa prochaine apparition. Le contrôle de la prise alimentaire agit donc à la fois sur les sensations de faim, de rassasiement et de satiété.

La faim désigne l'ensemble des sensations qui pousse un être vivant à rechercher de la nourriture et que l'ingestion fait disparaître. Il s'agit de la manifestation directe d'un déficit énergétique présent dans l'organisme (période pré-prandiale, jeûne). Pour rétablir l'homéostasie, la prise alimentaire est stimulée et les réserves de substrats énergétiques sont mobilisées. A l'opposé, les dépenses énergétiques (thermogenèse, utilisation du glucose et des acides gras) et le stockage énergétique (stockage du glucose et des acides gras) sont freinés.

Le rassasiement met un terme au repas. Il s'agit d'un ensemble de signaux perçus par l'individu, d'ordre sensoriel (visuel, olfactif, gustatif et tactile), viscéral (comme un estomac plein ou une vidange gastrique qui ralentit) ou encore hédonique. Ces signaux l'informent qu'il n'a plus faim.

La satiété est à distinguer du rassasiement. Il s'agit d'un intervalle de temps qui existe entre deux repas, durant lequel s'effectuent plusieurs réactions chimiques au sein de l'organisme. L'objectif est de lui fournir régulièrement de l'énergie – principalement du glucose dans la journée, et des acides gras durant la nuit ou lorsque l'intervalle de temps entre deux repas est long, autour de 7 à 8 heures.

Si les processus de faim, de satiété ou de rassasiement sont altérés, la prise alimentaire n'est plus contrôlée. Ainsi, certains troubles du comportement alimentaire, d'ordre psycho-affectifs notamment, conduisent à manger sans relation avec les besoins de l'organisme. On peut s'empêcher de manger, alors que l'organisme le nécessite, pour des raisons ou des impératifs socio-culturels. A l'inverse, on peut se suralimenter par plaisir et non nécessité. Bien que leur impact semble être prépondérant, les mécanismes hédoniques intervenant dans le contrôle de la prise alimentaire chez l'homme sont encore actuellement largement méconnus. Dans le cas de la suralimentation, une balance énergétique excédentaire peut s'installer conduisant à un surpoids, car l'organisme est particulièrement doué pour mettre en réserve les excès d'énergie dans le tissu adipeux (**Figure 2**). Dans ce contexte, l'obésité est caractérisée par une accumulation de masse grasse excessive et qui peut nuire à la santé. A l'opposé, un déficit énergétique oblige l'organisme à puiser dans ses réserves pour maintenir l'homéostasie. Lorsqu'il persiste une perte du poids corporel apparaît (**Figure 3**).



**Figure 2 : Balance énergétique excédentaire**

Quand la balance énergétique est excédentaire de manière chronique (apports énergétiques plus importants que les dépenses), le poids corporel augmente et l'obésité peut apparaître



**Figure 3 : Balance énergétique déficitaire**

Quand la balance énergétique est déficitaire de manière chronique (apports énergétiques plus faible que les dépenses), le poids corporel diminue.



# Introduction

# Régulation nerveuse de l'homéostasie énergétique

## 1. Le système nerveux central : centre d'intégration

Le système nerveux central (SNC) joue un rôle fondamental dans la régulation de l'homéostasie énergétique. C'est un centre intégrateur qui coordonne l'activité de nombreux organes périphériques en fonction des conditions métaboliques. Il est informé en permanence des besoins énergétiques et des réserves du corps par trois grands types de signaux :

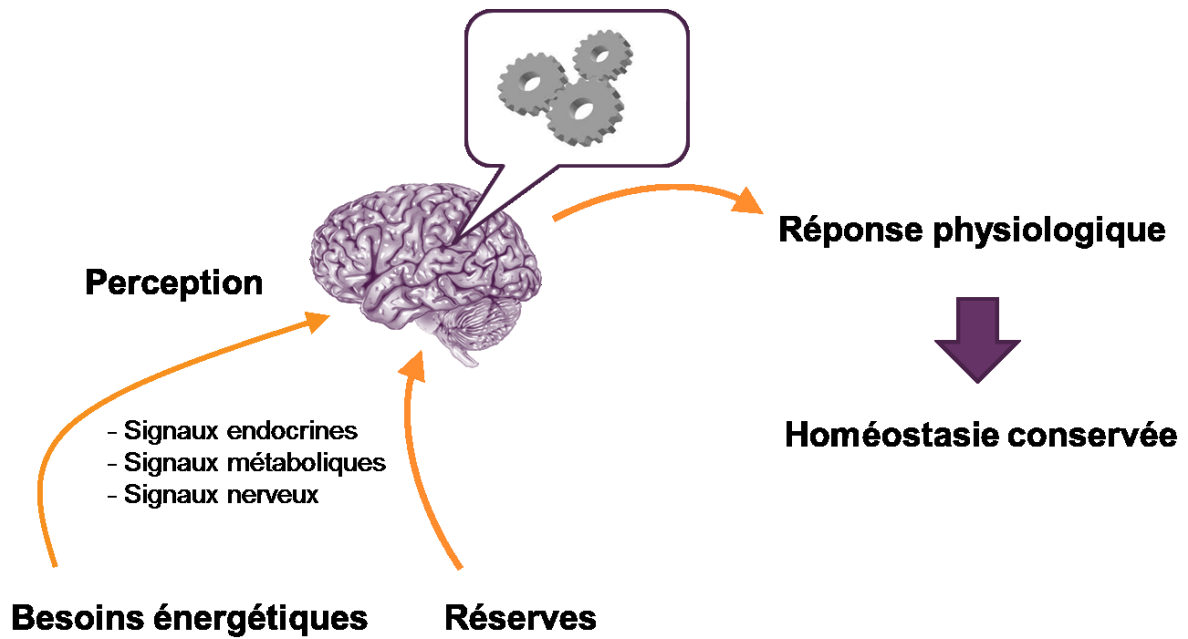
- métaboliques (les nutriments)
- endocriniens (les hormones)
- nerveux (les influx afférents)

Le SNC intègre ces signaux et déclenche en retour des réponses centrales et périphériques adaptées, de type :

- comportemental (adaptation de la prise alimentaire),
- endocrinien (contrôle de la sécrétion d'insuline)
- végétatif (modification de l'activité de certains organes par l'intermédiaire du système nerveux autonome – SNA - afin d'orienter les flux métaboliques).

L'ensemble de ces réponses physiologiques a pour but de restaurer l'homéostasie énergétique (**Figure 4**).

L'intégration des phénomènes psychologiques, cognitifs et sociétaux, nombreux chez l'Homme, difficilement quantifiables, et indépendants des signaux métaboliques, se fait également au sein du SNC <sup>1</sup>.



**Figure 4 : Le cerveau participe au maintien de l'homéostasie énergétique**

*Des signaux endocriniens, métaboliques et nerveux atteignent le cerveau pour l'informer des besoins et des réserves énergétiques de l'organisme (mécanismes de perception). Le cerveau intègre ces signaux et déclenche un ensemble de réponses physiologiques pour rétablir l'homéostasie.*

## 2. L'hypothalamus

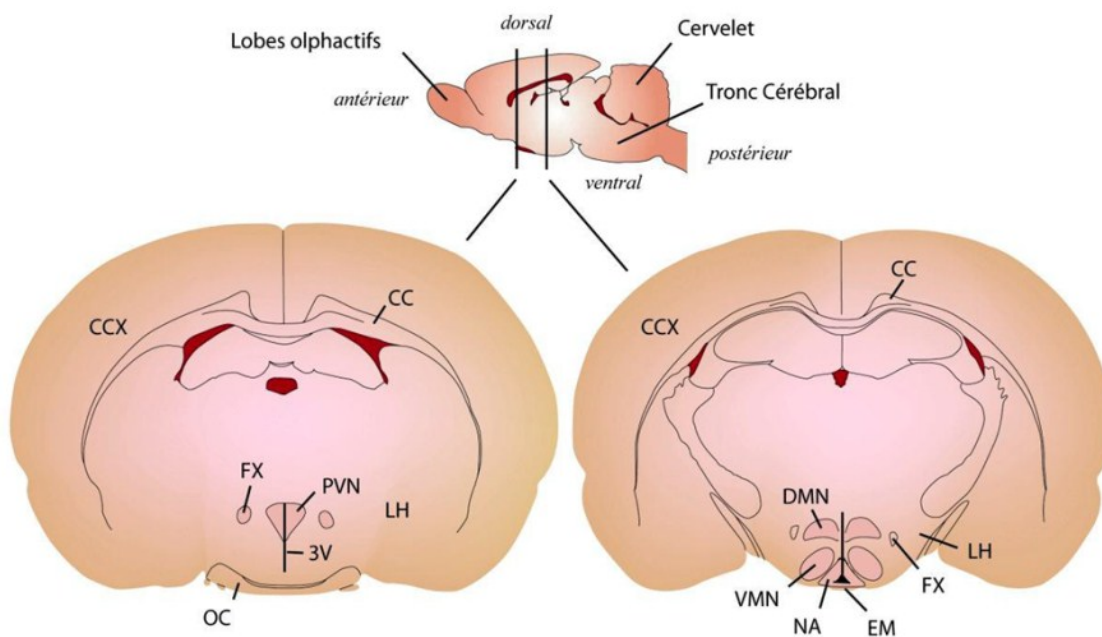
### A. Localisation et structure

Parmi les structures du SNC impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique, l'hypothalamus occupe une place primordiale. Il intègre les informations circulantes (hormones et nutriments). Dans le cadre du contrôle de la prise alimentaire, l'hypothalamus est le centre intégrateur le plus étudié et le mieux documenté <sup>2</sup>. Pendant son développement, l'hypothalamus établit des connexions afférentes et efférentes avec de nombreuses régions cérébrales du télencéphale jusqu'au myélocéphale incluant la rétine, le cortex cérébral, l'hippocampe, et l'amygdale, ainsi que le tronc cérébral <sup>3 4</sup>. Chez le rongeur, il est situé dans la position ventromédiane dans l'encéphale. L'hypothalamus est composé d'une quarantaine de noyaux (correspondant à des regroupements spécifiques de populations neuronales) parmi lesquels on peut citer les noyaux arqué (NA), ventromédian (VMN), dorsomédian (DMN), paraventriculaire (PVN) et l'hypothalamus latéral (LH) qui sont impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire (**Figure 5**). Ces noyaux contiennent des cellules sensibles aux variations du statut énergétique de l'organisme. L'activité de ces cellules est à l'origine des réponses physiologiques déclenchées par l'hypothalamus qui visent à maintenir l'homéostasie énergétique. L'hypothalamus est enfin traversé par un ventricule cérébral et par des capillaires sanguins fenestrés, favorisant les échanges de molécules entre la périphérie et le SNC. De par ces propriétés, l'hypothalamus est une zone privilégiée dans le contrôle du comportement alimentaire.

### B. Noyaux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire

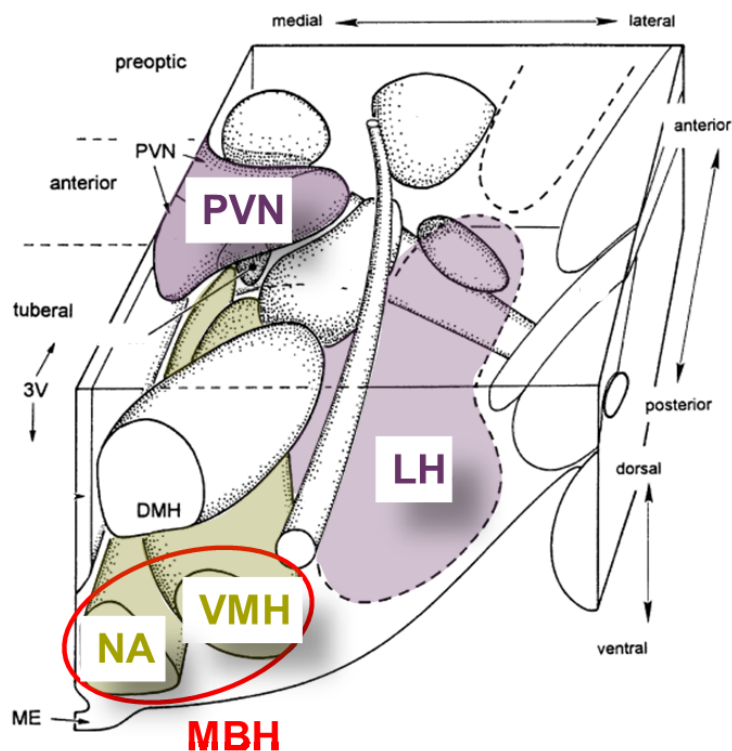
L'implication de l'hypothalamus dans le contrôle nerveux du métabolisme et de la prise alimentaire a été initialement mise en évidence, à partir des années 1940, par des expériences de lésion et de stimulation électrique. Une lésion bilatérale du VMH (NA + VMN) induit une hyperphagie qui conduit au développement d'une obésité <sup>5</sup>. La lésion du LH provoque l'effet inverse, c'est à dire, une diminution de la prise alimentaire alors que la stimulation de cette aire entraîne le développement d'une obésité. Ces travaux ont amené les scientifiques à définir le VMH comme centre de la satiété et le LH comme centre de la faim <sup>6</sup>.

Dans la partie périventriculaire, on trouve des noyaux impliqués dans la détection des signaux circulants (en provenance du sang ou du liquide céphalo-rachidien, LCR), avec notamment les noyaux arqué (NA) et paraventriculaire (PVN). Dans la partie médiane, les noyaux ventromédian (VMN) et dorsomédian (DMN) reçoivent de nombreuses afférences sensorielles et forment de multiples connexions avec d'autres régions de l'hypothalamus. A ceux-là, s'ajoute l'hypothalamus latéral (LH) qui est constitué d'un ensemble plus diffus de neurones qui ne forme pas un véritable noyau. Les neurones du LH projettent vers de nombreuses aires intra- et extra-hypothalamiques, et constituent une interface entre l'hypothalamus et les régions limbiques et corticales <sup>7</sup> (Figure 6).



**Figure 5 : Schéma d'un cerveau de rongeur montrant les principales régions hypothalamiques impliquées dans la régulation nerveuse du métabolisme énergétique**

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



**Figure 6 : Vue tridimensionnelle de l'hypothalamus de rongeur**

Vue des principaux noyaux hypothalamiques dans l'hypothalamus droit de rat. En position ventrale, on distingue le noyau arqué (NA sur le schéma) à proximité de l'éminence médiane (ME) et l'hypothalamus ventro-médian (VMH). Le (NA) et le (VMH) définissent l'hypothalamus médio-basal (MBH). En bordure du 3ème ventricule (3V), se situe le noyau para-ventriculaire (PVN) dans la partie antérieure dorsale, et le noyau dorso-médian (DMH) plus postérieur. L'hypothalamus latéral (LHA sur le schéma) est délimité par des pointillés sur le côté latéral de l'hypothalamus. Modifié d'après Berthoud, 2002 <sup>7</sup>

## C. Intra et interconnexions des noyaux hypothalamiques

Les différents noyaux hypothalamiques sont connectés entre eux par des fibres nerveuses. Celles-ci étant composées d'axones de neurones, sont identifiées par des neurotransmetteurs et neuropeptides spécifiques. Dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, la neuro-circuiterie du système à mélanocortine (décrite dans la partie D) est la plus détaillée. Ce système se compose principalement de deux types de neurones aux rôles antagonistes sur la prise alimentaire, et dont les corps cellulaires sont situés dans le noyau arqué. Il s'agit des neurones anorexigènes POMC/CART et des neurones orexigènes AgRP/NPY. Ces neurones projettent dans le VMN, le PVH et le LH, au niveau des neurones secondaires dont l'activité est influencée par l'activation ou l'inhibition des récepteurs à mélanocortine (MCR).

Dans le PVN, des neurones à ocytocine sont présents. Les neurones à ocytocine sont activés lors d'un repas <sup>8</sup>. Ils innervent notamment le noyau du tractus solitaire (NTS). Le NTS intègre donc des signaux dérivés du tractus digestif (comme la cholecystokinine) et des afférences ocytocinergiques du PVN pour freiner la prise alimentaire lors d'un repas <sup>9 10</sup>.

Le VMN reçoit des projections du noyau arqué mais peut aussi projeter dans le PVN, le LH ou dans des régions extrahypothalamiques <sup>11 12 13</sup>. Le steroidogenic factor 1 (SF1) est exprimé spécifiquement au niveau du VMN. Les neurones SF1 peuvent sécréter du BDNF, freinant la prise alimentaire <sup>14 15 16</sup>. Ces neurones exprimant le récepteur à mélanocortine 4 (MC4R), leur activité peut être modulée par les neurones du système à mélanocortine.

Le LH reçoit et intègre un grand nombre d'afférences sensorielles issues de différentes aires cérébrales : du rhombencéphale (composé du cervelet, du pont de Varole et du bulbe rachidien), du cortex, du système limbique, du thalamus, et de la moelle épinière. Cela fait de cette aire un centre relais pour réguler un grand nombre de fonctions autonomes et comportementales <sup>7</sup>. Plus particulièrement deux populations neuronales de cette zone contrôlent l'homéostasie énergétique : les neurones à « melanin concentrating hormone » (MCH) et les neurones à orexines <sup>17</sup>. Les neurones à orexines du LH activent les neurones AgRP/NPY du noyau arqué et inhibent les neurones POMC/CART : la prise alimentaire est stimulée <sup>18 19 20</sup>. Pour les neurones à MCH, leur action est similaire. L'injection de MCH dans le noyau arqué augmente la libération d'AgRP orexigène et diminue la sécrétion d' $\alpha$ -MSH anorexigène <sup>21</sup>. L'injection dans le PVN produit le même effet <sup>22 23</sup>. D'autres expériences montrent que les neurones MCH du LH projettent vers le tronc cérébral pour réguler les dépenses énergétiques, notamment en diminuant la thermogénèse <sup>24</sup>.

L'ensemble de ces connexions est illustré sous forme de schéma (Figure 7). Bien évidemment, il ne s'agit là que d'une infime revue des connexions intra- et interhypothalamiques impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire, montrant ainsi la complexité de cette structure. De plus, l'hypothalamus étant impliqué dans d'autres fonctions comme la reproduction ou la lactation, des connexions spécifiques supplémentaires existent.

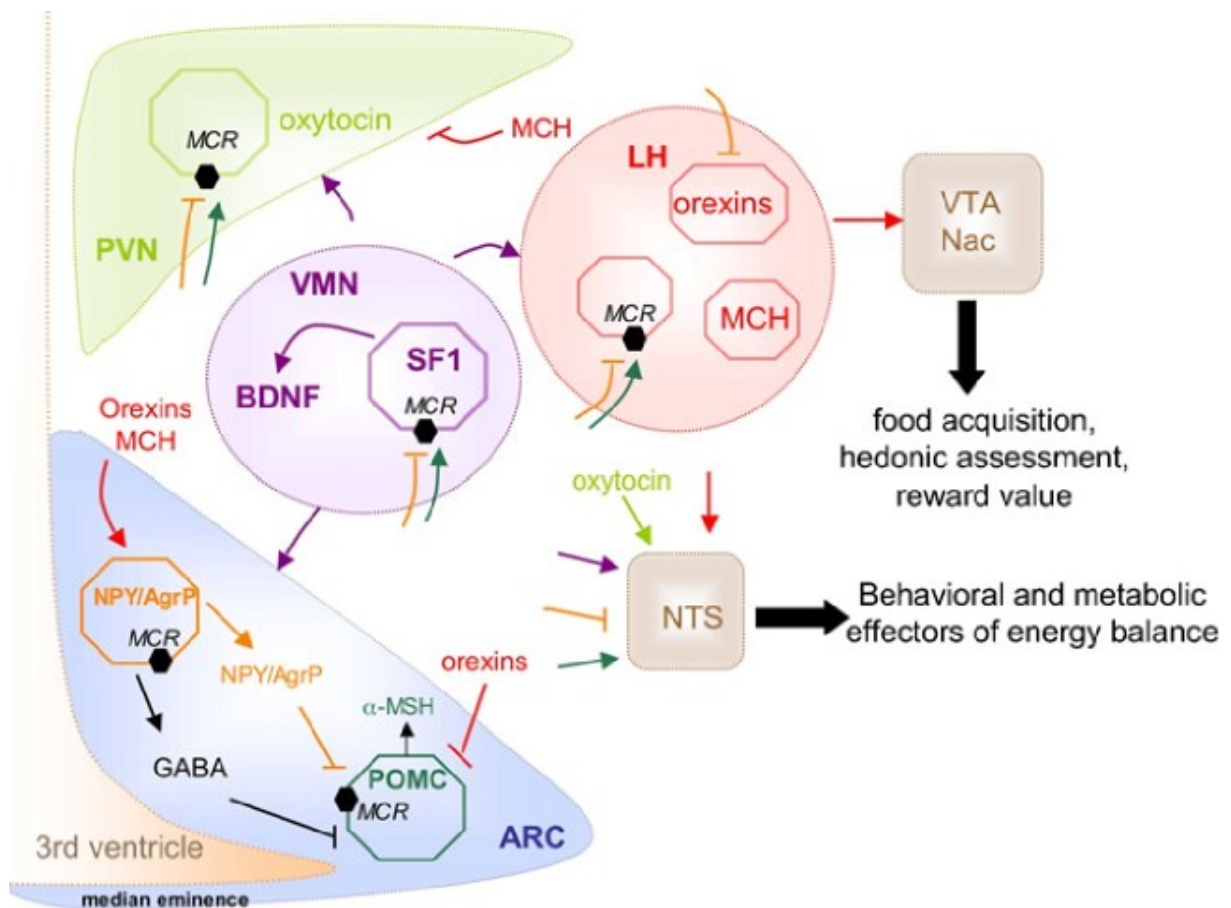


Figure 7 : Schéma des connexions neuronales intra et interhypothalamiques impliquées dans l'homéostasie énergétique

D'après Blouet et Schwartz, 2010 <sup>25</sup>



## D. Système à mélanocortine

### *Définition et rôle*

Les noyaux hypothalamiques sont composés d'un regroupement de différentes populations neuronales. Ces neurones peuvent être classés selon leurs fonctions, leur sensibilité aux hormones et nutriments ou selon l'expression de neuropeptides spécifiques. Parmi ceux-ci on distingue le système neuronal à mélanocortine.

Le système à mélanocortine sert de senseur métabolique pour réguler la balance énergétique et le métabolisme périphérique. Ses actions principales résident dans le contrôle de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques via les récepteurs à la mélanocortine (MCR). Il s'agit de récepteurs couplés à une protéine G. Cinq isoformes existent, nommées de MC1R à MC5R <sup>26</sup>. Le **Tableau 1** récapitule les 5 récepteurs, leur ligand, leur localisation et leur fonction.

Dans le cerveau des mammifères, le système à mélanocortine comporte :

-un ensemble de neurones du noyau arqué incluant les neurones exprimant la pro-opiomélanocortine, dont certains coexpriment le neuropeptide cocaine- and amphetamine-related transcript (POMC/CART) ainsi que des neurones exprimant le neuropeptide Y hypothalamique et l'agouti gene-related protein (NPY/AgRP). L'expression des neuropeptides POMC et NPY est retrouvée dans d'autres aires cérébrales (comme l'amygdale ou le tronc cérébral), mais la colocalisation POMC/CART et NPY/AgRP est spécifique de l'hypothalamus ventromédian <sup>6</sup>.

-et des cibles neuronales effectrices exprimant MC3R ou MC4R. Dans l'hypothalamus de souris, on retrouve une forte expression de MC3R et MC4R au niveau du noyau arqué et du VMH. Au sein du PVN, des neurones cholinergiques exprimant MC4R ont été montré comme régulant les dépenses énergétiques <sup>27 28</sup>. On retrouve aussi des neurones à TRH (thyrotropin releasing hormone) au sein du PVN exprimant MC4R <sup>29</sup>.

Le gène encodant la POMC produit deux différents peptides : la mélanocortine et la  $\beta$ -endorphine. La mélanocortine peut être clivée en sous peptides incluant l'adrénocorticotropine, l' $\alpha$ -, la  $\beta$  et la  $\gamma$ -melanocyte-stimulating hormone (MSH). Dans l'hypothalamus l' $\alpha$ -MSH active les récepteurs MC3R et MC4R. L'activation de MC4R par l'agoniste MTII inhibe la prise alimentaire chez des souris hyperphagiques et augmente leurs dépenses énergétiques <sup>30</sup>. Chez les rongeurs une délétion de MC4R hypothalamique, ou une mutation invalidant MC4R chez l'Homme, conduit à une hyperphagie chronique et un développement sévère de l'obésité <sup>31</sup>. Le rôle de MC3R reste encore débattu dans l'étiologie de l'obésité <sup>32</sup>. Sa délétion résulte en une accumulation légère de tissu adipeux aussi bien chez la souris que chez l'homme, bien qu'elle entraîne une hyperphagie uniquement chez les souris <sup>33 34 35</sup>. Finalement, en activant les récepteurs MC4R principalement, les neurones à POMC sont anorexigènes et stimulent les dépenses énergétiques. La présence

des neurones POMC est majoritairement restreinte aux neurones du noyau arqué, mais peut être aussi trouvée dans d'autres aires cérébrales comme le NTS. Une partie des neurones à POMC coexprime aussi CART <sup>6</sup>, toutefois le rôle de CART dans la régulation de la prise alimentaire n'est pas clair <sup>36</sup> : une injection icv de CART inhibe la prise alimentaire <sup>37</sup>, alors qu'une injection dans le VMN ou l'ARC chez des rats à jeun augmente la prise alimentaire <sup>38</sup>. Récemment, deux sous populations de neurones POMC glutamatergique et GABAergique («  $\gamma$ -aminobutyric acid » ) ont été mises en évidence dans le noyau arqué <sup>39 40</sup>, cependant la fonction de ces neurones GABAergiques reste à définir <sup>41</sup>.

L'antagoniste naturel de MC4R est l'AgRP. Il bloque la voie de signalisation de l' $\alpha$ -MSH et par conséquent, stimule la prise alimentaire <sup>26 42 43</sup>. Sa découverte découle de l'étude d'un modèle de souris obèses hyperphagiques (Ay) surexprimant la protéine Agouti de manière ubiquitaire <sup>30 42</sup>. L'injection centrale d'AgRP provoque une hyperphagie prolongée <sup>44</sup>. Dans le système nerveux central, AgRP est exclusivement exprimé dans un groupe de neurones du noyau arqué de l'hypothalamus médiobasal. Ces neurones coexpriment le neuropeptide Y et le neurotransmetteur GABA <sup>45 46</sup>. Le NPY agit via sa fixation sur des récepteurs Y dont cinq sous-types ont été clonés et caractérisés (Y1, Y2, Y4, Y5 et Y6) <sup>47</sup>. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. L'injection de NPY dans le PVN, ou dans le 3<sup>ème</sup> ventricule, chez les rats augmente la prise alimentaire <sup>48</sup> tout en inhibant les dépenses énergétiques et en facilitant le stockage d'énergie dans le tissu adipeux. Lorsqu'il est infusé chroniquement dans le 3<sup>ème</sup> ventricule, il déclenche un syndrome d'obésité <sup>49</sup>. Une étude récente suggère que les effets de NPY sur la prise alimentaire seraient relayés à la fois par les récepteurs Y1 et Y5 <sup>50</sup>. Il est à noter que le NPY n'est pas simplement impliqué dans l'homéostasie énergétique mais aussi dans d'autres processus tels que l'anxiété et la douleur, les fonctions cardiovasculaires <sup>51</sup>, la reproduction et la croissance <sup>52 53</sup>. Ceci n'est pas surprenant étant donné que le NPY est largement exprimé dans le cerveau mais aussi au niveau périphérique.

La génération de modèles KO des acteurs principaux du système à mélanocortine a permis de mieux comprendre leur rôle. Le **Tableau 2** décrit comment évolue l'homéostasie énergétique dans ces modèles. On remarque qu'il se dégage un tonus orexigène fort du signaling AgRP et anorexigène de POMC, MC3R et MC4R.

**Tableau 1 : Récapitulatif des ligands endogènes des récepteurs à mélanocortine, localisations et fonctions.**

D'après Adan & de Krom <sup>54</sup>

(ACTH) Hormone adrenocorticotropique, (AgRP) Agouti-related protein, (MSH) Melanocyte-stimulating hormone

Isoformes du récepteur	Ligand endogène (affinité décroissante)	Antagoniste endogène	Localisation centrale	Localisation périphérique	Fonction centrale	Fonction périphérique
MC1R	$\alpha$ MSH = $\beta$ MSH = ACTH > $\gamma$ MSH	Agouti	Substance grise Periaqueductal	Mélanocyte, glande pituitaire, placenta, testicules, corps lutéiques, lymphocytes, astrocytes, fibroblastes		Pigmentation, Processus anti-inflammatoires
MC2R	ACTH	Agouti		Cellules adrénales adipocytes murins, peau, lymphocytes		Production de glucocorticoides, lipolyse induite par le stress
MC3R	$\gamma$ MSH = $\alpha$ MSH = $\beta$ MSH = ACTH	AgRP	Tronc cérébral, hypothalamus, thalamus, septum	Placenta, estomac, cœur, thymus, macrophages murins, lymphocytes	<b>Homéostasie énergétique,</b> Processus anti-inflammatoire	Libération de cytokines pro-inflammatoires
MC4R	$\alpha$ MSH = $\beta$ MSH = ACTH > $\gamma$ MSH	AgRP, Agouti	Tronc cérébral, hypothalamus, thalamus, striatum, septum, cortex, hippocampe, système limbique, moelle épinière		<b>Régulation du poids corporel,</b> processus de douleurs, comportement sexuel	Erection pénienne
MC5R	$\alpha$ MSH > $\beta$ MSH = ACTH > $\gamma$ MSH	Agouti	Cortex, Cervelet, striatum, mésencéphale, pont de Varole, medulla, bulbe olfactif	Adipocytes, muscles lisses et squelettiques, moelle osseuse, thymus, gonades, rate, ganglions lymphatiques, poumons, foie...		Natriurèse (excrétion sodium par les reins), sécrétion de sébum
Références	55 56	43 57	58 59 60 61 62	63 64 65 66	67 68 33 34 69	70 71 72 73 74 75 76

## Tableau 2 : Souris mutantes pour le système à mélanocortine et phénotype métabolique

D'après Garfield & Heisler <sup>77</sup>

Abréviations : BAT, tissu adipeux brun ; UCP-1, uncoupling protein 1 ; VO<sub>2</sub>, consommation d'O<sub>2</sub> volumétrique

Mutant	Mutations	Effets sur la composition du corps	Effet sur la prise alimentaire	Effets sur les dépenses énergétiques	Références
MC3R <sup>-/-</sup>	Délétion de la région codante <sup>34</sup> ; délétion partielle de la région codante <sup>78 79</sup>	Poids normal mais augmentation de la masse grasse et diminution de la masse maigre	Hypophagique <sup>34</sup> ; normophagique <sup>78</sup> ; hyperphagique sous HFD en phase diurne <sup>79</sup>	Hypoactive mais pas d'effet thermogénique	<sup>34 78 79</sup>
MC4R <sup>-/-</sup>	Délétion de la région codante	Adiposité, masse maigre, poids et taille augmentés	Hyperphagique en standard, effet exacerbé en HFD car impossibilité d'ajuster la prise alimentaire	Hypolocomotive ; Thermogenèse et activité physique réduite, VO <sub>2</sub> réduite	<sup>80 33 81 82 79</sup>
MC4R <sup>loxTB</sup>	Réexpression Cre-dépendante conditionnelle dans le PVN et l'amygdale	60% de réduction du poids corporel comparé à MC4R <sup>-/-</sup> ; taille normale, adiposité et masse maigre augmentées	Les mutants transgéniques redeviennent normophagiques	VO <sub>2</sub> réduite	<sup>27</sup>
MC3R <sup>-/-</sup> /MC4R <sup>-/-</sup>	Croisement MC3R <sup>+/-</sup> /MC4R <sup>-/-</sup>	Poids plus important de tous les mutants	Non étudié	Non étudié	<sup>78</sup>
POMC <sup>-/-</sup>	Délétion de l'exon 3 ; délétion partielle de la région codante et intégration du rapporteur LacZ	Poids, adiposité et masse maigre augmentés	Hyperphagique en standard, effet exacerbé en HFD car impossibilité d'ajuster la prise alimentaire ; préférence pour le gras	VO <sub>2</sub> réduite	<sup>83 84 85</sup>
POMC <sup>-/-</sup> /Tg <sup>+</sup>	Réactivation de l'expression de POMC dans la glande pituitaire	Poids, adiposité et taille augmentée par rapport à POMC <sup>-/-</sup>	Plus hyperphagique en standard que POMC <sup>-/-</sup> ; le pair fed normalise le poids au POMC <sup>-/-</sup>	VO <sub>2</sub> réduite, quotient respiratoire augmenté	<sup>86</sup>
POMC <sup>Tg</sup>	Surexpression neuronale spécifique	Poids normal	Pas d'effet en consommation basale ; atténuation de l'hyperphagie induite par mise à jeun	VO <sub>2</sub> réduite	<sup>87</sup>
POMC <sup>Tg</sup> NTS	Surexpression par adénovirus dans le NTS	Adiposité et poids réduit	Consommation basale réduite en standard	Augmentation de l'expression de UCP-1 dans le BAT ; pas d'effet sur la consommation d'O <sub>2</sub>	<sup>88</sup>

NH <sub>2</sub> -POMC <sup>Tg</sup>	Surexpression constitutive de la portion POMC N-terminale	Masse maigre et taille réduites chez les mâles	Normophagique	Réponse thermogénique normale face à un stress au froid	89
AgRP <sup>-/-</sup>	Délétion de la région codante	Poids normal	Normophagique	Pas d'effet sur l'activité locomotrice et la température corporelle	90
AgRP <sup>-/-</sup>	Délétion de la région codante et intégration du rapporteur <i>LacZ</i>	Perte de poids et d'adiposité à long terme	Pas d'effet sur la consommation basale en standard	Mutants 6 mois > VO <sub>2</sub> , activité locomotrice, et température corporelle augmentées	91
AgRP <sup>ATA</sup>	Ablation postnatale par transgène cytotoxique spécifique des cellules AgRP	Masse grasse et poids réduits	Les animaux traités sont sévèrement hypophagiques	Augmentation de l'expression de UCP-1 dans le BAT	92
AgRP <sup>DTR</sup>	Ablation postnatale par récepteur à toxine spécifique des cellules AgRP	Masse grasse et poids réduits	Aphagie quasi-totale chez les animaux traités	Non recherché	93
AgRP <sup>DTR</sup>	Ablation postnatale par récepteur à toxine spécifique des cellules AgRP	Masse grasse et poids réduits	Les animaux traités sont sévèrement hypophagiques	Non recherché	94
AgRP <sup>Tg</sup>	Expression ectopique constitutive	Poids augmenté ; taille augmentée (femelle)	Non recherché	Non recherché	95
Agouti <sup>Tg</sup>	Expression ectopique constitutive	Poids augmenté	Non recherché	Non recherché	96



### Régulation hormonale de l'activité du système à mélanocortine

Le système à mélanocortine détecte les hormones métaboliques via des récepteurs adéquats. Il est ainsi informé de l'état énergétique de l'individu. Le **Tableau 3** décrit la nature et le rôle des hormones détectées par le système à mélanocortine.

**Tableau 3 : Actions des principales hormones de l'homéostasie énergétique sur le système à mélanocortine**

Hormone (Sites de production – Stimulation de la production)	Cibles	Effets
<b>Insuline</b>  -produite par la cellule $\beta$ pancréatique  -sécrétion stimulée par l'hyperglycémie principalement	Hypothalamus	Anorexigène <sup>99 100</sup>
	Neurones AgRP/NPY	Diminue l'expression et la libération de NPY <sup>101 102</sup>
	Neurones POMC/CART	Augmente l'expression et la libération de POMC <sup>103</sup>
<b>Leptine</b>  -produite par les adipocytes du tissu adipeux <sup>104</sup>  -production stimulée avec l'augmentation de la masse grasse	Hypothalamus	Anorexigène <sup>105 106 107 108</sup>
	Neurones AgRP/NPY	Diminue l'expression et la libération de NPY/AgRP <sup>109 110</sup>
	Neurones POMC/CART	Augmente l'expression et la libération des peptides anorexigènes <sup>46 111 112</sup>
<b>Ghréline</b>  - Cellules oxyntiques de l'estomac et duodénum <sup>113 114</sup>  - Production augmentée avant le repas <sup>115</sup>	Hypothalamus	Orexigène <sup>116 117 118</sup>
	Neurones AgRP/NPY	Augmente la libération de NPY <sup>119</sup>
	Neurones POMC/CART	Non défini

### *Interconnexions des neurones AgRP/NPY et POMC/CART*

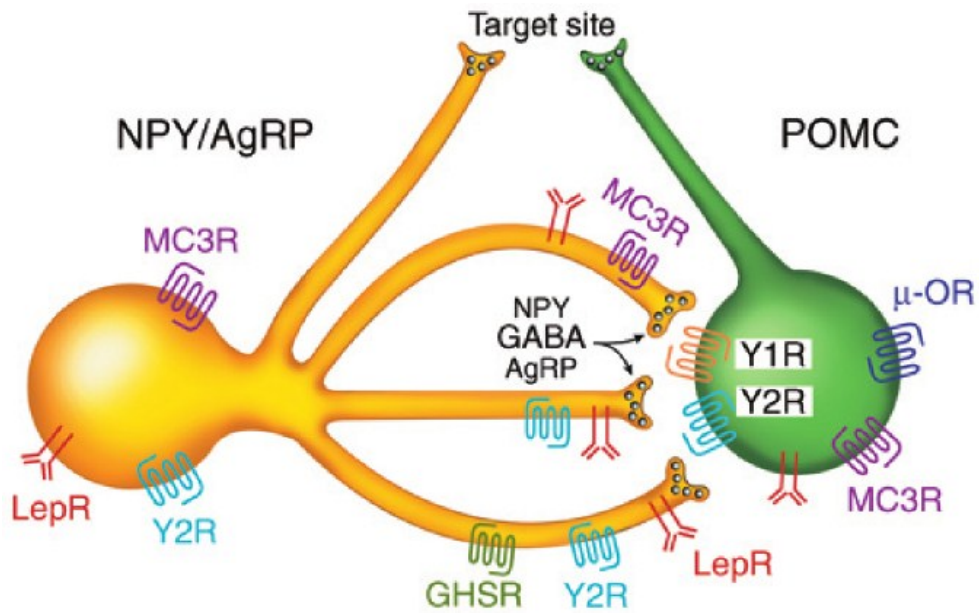
Des expériences de microscopie électronique couplées à de l'immunohistochimie ont mis en évidence que les corps cellulaires des neurones POMC étaient en contact avec des terminaux axoniques de neurones NPY/AgRP (**Figure 9**). Ces neurones NPY, notamment activés par la ghréline, libèrent du GABA inhibant ainsi les neurones POMC <sup>119</sup>. L'inhibition indirecte des neurones POMC par la ghréline, peut être abrogée par l'ajout d'antagoniste aux récepteurs à NPY, indiquant une voie de signalisation dépendante du NPY dans le contrôle de la prise alimentaire par la ghréline <sup>120</sup>.

On remarque la présence de MC3R autant sur les neurones POMC que sur les neurones NPY/AgRP. Dans ce contexte, MC3R a été envisagé comme un auto-récepteur inhibiteur des neurones POMC <sup>46</sup>. Cependant, le rôle de MC3R n'est pas encore clairement établi, puisque des expériences d'enregistrement électrophysiologiques des neurones POMC montrent à l'inverse que l'activation de MC3R active les neurones POMC par dépolarisation <sup>121</sup>.

Le peptide YY libéré par les cellules endocrines de l'iléum et du colon en phase postprandiale est très affiné pour les récepteurs Y1R et Y2R (avec une affinité 1 000 fois plus importante pour le récepteur Y2R). Il augmente l'expression du proto-oncogène c-Fos (marqueur d'activation neuronale) dans les neurones POMC, indiquant une activation de ces neurones, et il diminue la prise alimentaire <sup>122</sup>. Mais ces résultats sont à réévaluer car l'ajout icv de peptide mimétique YY n'inhibe pas la prise alimentaire dans un modèle KO pour MC4R <sup>123</sup>, mais à l'inverse l'inhibe dans un modèle KO pour POMC <sup>83</sup>.

L'ensemble de ces données concernant le rôle du système à mélanocortine sur l'homéostasie énergétique a été résumé dans la **Figure 10**.





**Figure 9 : Schéma du système à mélanocortine dans le noyau arqué**

Les neurones NPY/AgRP et POMC du noyau arqué forment un réseau coordonné, notamment grâce aux projections des NPY/AgRP sur les POMC. Des récepteurs aux hormones et neuropeptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique sont indiqués. LepR, récepteur de la leptine;  $\mu$ -OR, récepteur opioïde  $\mu$ ; Y2R, récepteur au NPY de type 2. D'après Cone, 2005 <sup>26</sup>.

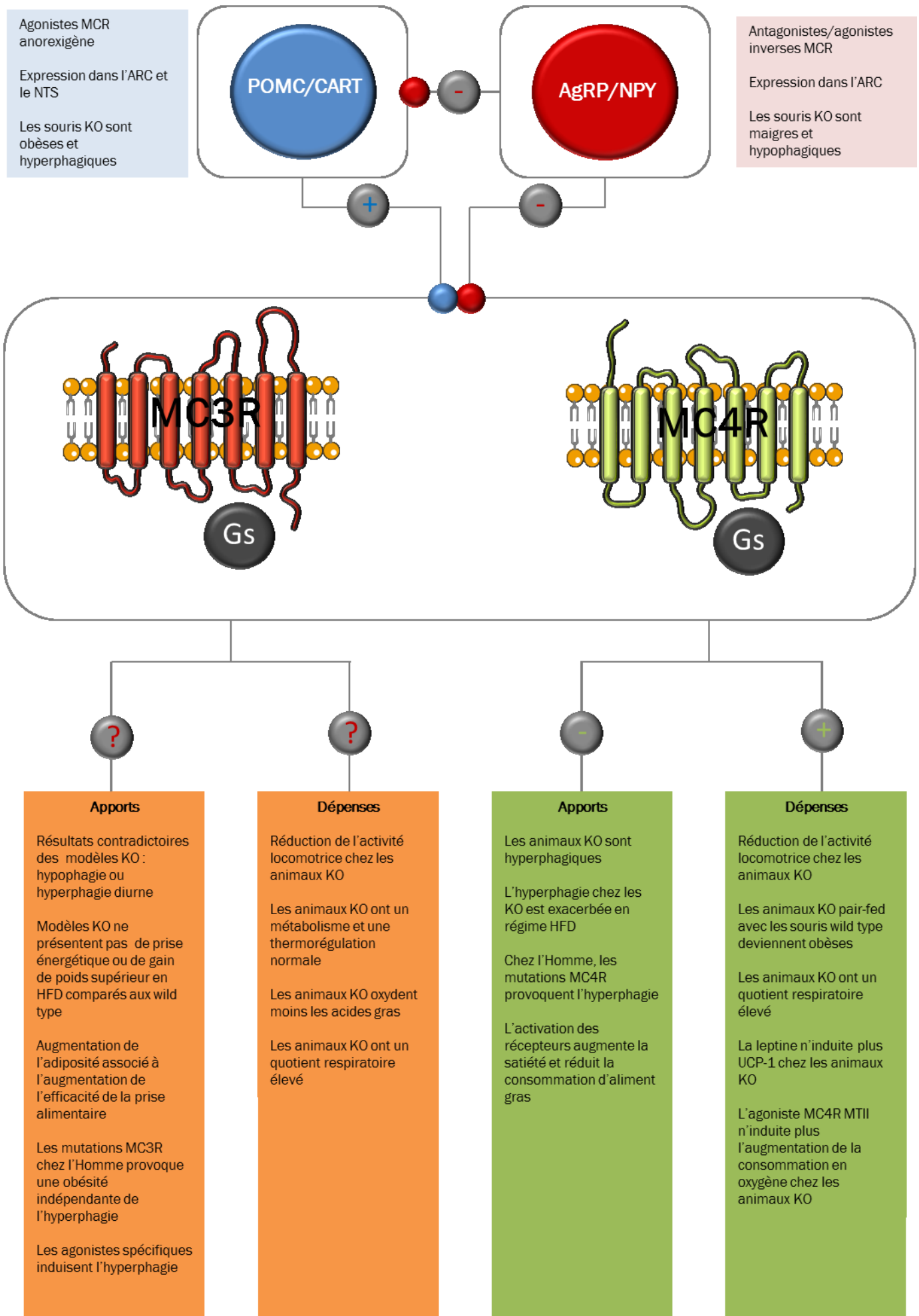


Figure 10 : Synthèse du rôle du système à mélanocortine dans la régulation de l'homéostasie énergétique

### 3. Plasticité hypothalamique et régulation de l'homéostasie énergétique

#### A. Définition

Deux propriétés importantes du système nerveux sont la spécificité et la plasticité <sup>124</sup>. En effet, le tissu nerveux est un vaste ensemble de cellules spécialisées. En dépit de son hétérogénéité, ce tissu est hautement structuré et relativement invariable <sup>125</sup>. De plus, les milliards de connexions cellulaires, réparties dans ce tissu, permettent des communications cellulaires très spécifiques, grâce notamment à la libération de neurotransmetteurs <sup>125</sup>. En parallèle, le terme plasticité cérébrale relatif à toute modification du système (tissulaire ou cellulaire, d'ordre morphologique et/ou fonctionnel) doit être considéré comme un autre attribut majeur du système nerveux central, complémentaire à la spécificité <sup>124</sup>.

On distingue différentes formes de plasticité cérébrale :

- La plasticité développementale (pré- et post-natale) aboutissant au développement du système nerveux, elle permet l'organisation du tissu nerveux ;
- La plasticité « réparatrice », induite par des lésions lors de traumatismes nerveux, elle permet la régénération du tissu nerveux ;
- Et la plasticité adaptatrice (liée à l'apprentissage, la mémorisation, et l'adaptation aux conditions environnementales ou internes), elle permet la réorganisation du tissu nerveux mature.

Dans ce manuscrit, nous abordons uniquement la plasticité adaptatrice.

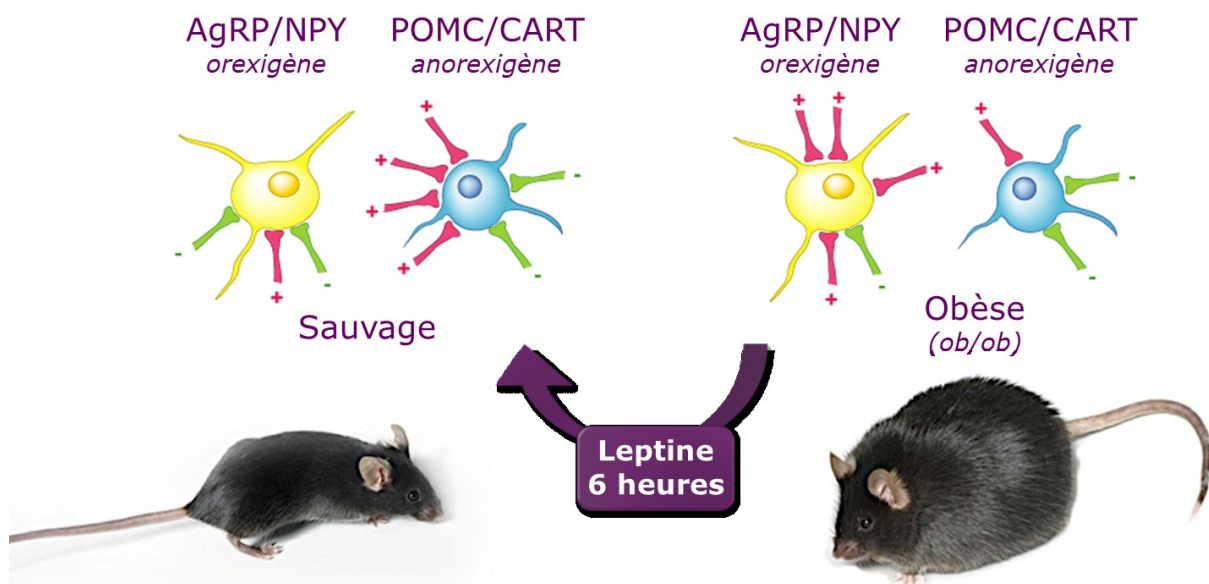
#### B. Mise en évidence de la plasticité des circuits neuronaux de la prise alimentaire dans des modèles expérimentaux

Les circuits neuronaux hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire sont hautement structurés (Partie 2.C et 2.D). Ils forment un vaste réseau connectant les différents noyaux entre eux, afin de contrôler l'homéostasie énergétique. Pourtant, ces réseaux peuvent subir des réarrangements synaptiques pendant leur vie adulte, révélant leur capacité de plasticité.

La première expérience démontrant la plasticité du système à mélanocortine a été publiée dans Science en 2004 par l'équipe de Horvath <sup>126</sup>. Les chercheurs de cette équipe pensaient que des hormones métaboliques pouvaient modifier l'organisation synaptique des circuits de la prise alimentaire. Pour démontrer cette propriété fondamentale, une stratégie ingénieuse a été développée. D'abord, l'équipe a utilisé des souris dont le gène de la leptine a été invalidé. Chez ces souris, dites ob/ob, il n'y a pas de leptine. La leptine étant une hormone anorexigène, les individus ob/ob sont hyperphagiques et développent une obésité morbide. Afin de visualiser les neurones d'intérêt, en l'occurrence POMC et NPY, des souris exprimant la « green fluorescent protein » (GFP) au sein de ces neurones, ont été générées. Désormais, les chercheurs

pouvaient enregistrer l'activité électrique de ces neurones devenus visibles, ou du moins repérables, dans un contexte avec ou sans leptine endogène.

Les enregistrements électrophysiologiques (et en particulier la mesure de la fréquence des courants miniatures, proportionnelle au nombre d'afférences) et les analyses en microscopie électronique ont révélé que le nombre et le type de synapses sur les neurones POMC et NPY sont différents entre la souris *ob/ob* et la souris sauvage. Il y a davantage d'afférences excitatrices sur les neurones AgRP/NPY chez la souris *ob/ob* comparé à la sauvage. A l'opposé, il y a moins d'afférences excitatrices sur les neurones POMC/CART chez la souris *ob/ob* comparé à la sauvage. Ces résultats indiquent que l'organisation synaptique du système à mélanocortine est dépendante de la leptine, et que l'hyperphagie des souris déficientes en leptine pourrait être liée à une organisation synaptique aberrante de ce système générant un tonus orexigène trop important. Cette dépendance vis-à-vis de la leptine s'exerce d'ailleurs dès le développement, car le déficit en leptine provoque une malformation des projections innervant le PVN <sup>127 128</sup>. Mais ce qui est particulièrement remarquable est le fait que l'apport de leptine chez la souris *ob/ob* adulte provoque une reconnexion synaptique du système à mélanocortine. En six heures seulement, la leptine exogène réorganise la distribution des afférences sur les neurones POMC et NPY, et la ramène à la situation observée chez la souris sauvage (**Figure 11**).



**Figure 11 : Expérience de Pinto**

*L'ajout de leptine exogène par voie intrapéritonéale provoque une réorganisation synaptique du système à mélanocortine chez les souris *ob/ob* aboutissant à une situation semblable à celle des souris sauvages*

Par la suite, d'autres travaux ont été réalisés confirmant les capacités de plasticité du système à mélanocortine chez la souris adulte.

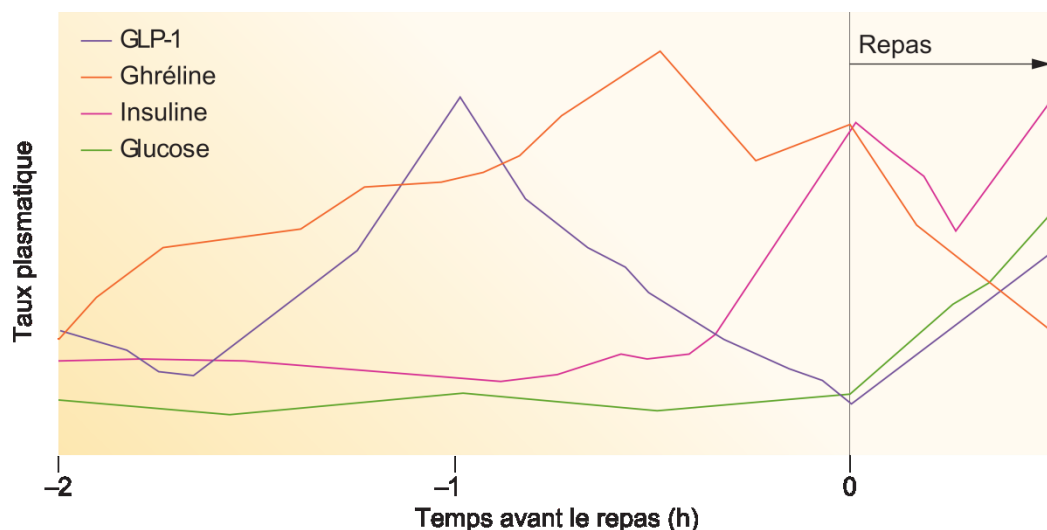
En 2007, une étude démontre que l'oestradiol E2, connu pour réduire l'appétit et l'adiposité <sup>129 130</sup>, provoque une augmentation du nombre de synapses excitatrices sur les neurones POMC/CART dans le noyau arqué de souris et de rats. Pour démontrer ce phénomène, les chercheurs ont ovariectomisé des rats femelles pour s'affranchir des fluctuations hormonales selon le cycle ovarien et pour déléter totalement les niveaux d'oestradiol circulant. Certains de ces animaux ont reçu une supplémentation en oestradiol E2 pendant 3 jours, par voie sous cutanée à l'aide de minipompes osmotiques alors que d'autres ont reçu une solution saline. Par la suite, le nombre de synapses excitatrices et inhibitrices ont été comptés sur les neurones POMC repérés par immunomarquage contre la  $\beta$ -endorphine. Les analyses en microscopie électronique ont révélé une augmentation du nombre de synapses symétriques (synapses inhibitrices) sur les neurones POMC chez les femelles ovariectomisées. Des analyses par immunohistochimie ont confirmé qu'il s'agissait de synapses GABAergiques. A l'inverse, la supplémentation avec l'oestradiol E2 augmente le nombre de synapses asymétriques (synapses excitatrices) sur les neurones POMC, et des analyses par immunohistochimie ont confirmé qu'il s'agissait de synapses glutamatergiques. De plus, des analyses de co-marquage avec le marqueur *cfos* ont indiqué que les neurones POMC étaient activés par l'oestradiol E2. L'ensemble de ces données montre que l'oestradiol E2 déclenche une augmentation du nombre de synapses excitatrices sur les neurones POMC. Dans cette étude, des expériences similaires ont été menées chez la souris *ob/ob* (déficiente en leptine) et *db/db* (déficiente en récepteur à la leptine), et on a retrouvé le même remodelage sur les neurones POMC après supplémentation à l'oestradiol E2. Ces expériences supplémentaires indiquent donc que les effets synaptiques de l'oestradiol E2 sont indépendants de la voie de signalisation de la leptine <sup>131</sup>.

La ghréline active les neurones NPY/AgRP du noyau arqué qui en retour inhibent les neurones POMC selon signalisation GABAergique, ce qui stimule la prise alimentaire <sup>46 119 132</sup>. En 2008, une étude a révélé l'implication de la ghréline dans des phénomènes de plasticité synaptique du noyau arqué. Les chercheurs ont enregistré les courants excitateurs miniatures post synaptiques (mPESCs) générés dans les neurones POMC. La quantification de la fréquence des mPESCs donne une estimation indirecte du nombre de synapses sur le neurone postsynaptique. Ceux-ci étaient augmentés après l'ajout de ghréline dans le milieu d'enregistrement. Une analyse par microscopie électronique post-enregistrement électrophysiologique, a montré que le nombre de synapses asymétriques (inhibitrices) sur les neurones POMC est augmenté par traitement à la ghréline. Ceci suggère fortement que la ghréline induit des événements de plasticité synaptique *in vivo* au sein du système à mélanocortine : en l'occurrence, une augmentation du nombre de synapses inhibitrices des neurones AgRP/NPY sur les neurones POMC/CART <sup>133</sup>. Ces mécanismes sont dépendants de

l'activation de l'AMPK puis de CPT1 (transporteur d'acides gras mitochondrial) et de l'oxydation des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie <sup>133</sup>.

Enfin, la corticostérone, hormone de stress à effet orexigène est également capable de générer des processus de plasticité synaptique au sein du système à mélanocortine. Chez des souris surrénalectomisées, situation qui conduit à l'absence totale de glucocorticoïdes circulants par ablation des glandes surrénales, on observe une baisse du nombre de synapses inhibitrices sur les neurones POMC/CART, et du nombre de synapses excitatrices sur les neurones AgRP/NPY, ce qui conjointement inhibe la prise alimentaire. Une supplémentation en corticostérone exogène restaure le phénotype <sup>134</sup>.

L'ensemble de ces expériences montre l'existence d'une plasticité hormono-dépendante des circuits neuronaux hypothalamiques contrôlant la prise alimentaire. Toutefois, cette plasticité n'est que la conséquence de manipulations pharmacologiques, génétiques, ou chirurgicales, et leur pertinence physiologique ainsi que leurs effets directs sur le comportement alimentaire n'étaient pas clair. Finalement nous avons vu que certaines hormones du métabolisme peuvent déclencher des événements de plasticité synaptique. Or, en condition physiologique, les taux d'hormones plasmatiques varient selon l'état métabolique. Ainsi chez l'Homme, 30 min avant un repas le taux de ghréline augmente <sup>135</sup>. Une augmentation du taux d'insuline plasmatique chez l'Homme et le rongeur permet de préparer un repas et de gérer préalablement la future charge de glucose arrivant <sup>136 137</sup>. Ces variations sont représentées dans la **Figure 12**. Il est donc logique de penser qu'étant sensibles aux hormones métaboliques, les circuits neuronaux contrôlant la prise alimentaire, puissent se réorganiser selon l'état métabolique afin de mieux gérer les ressources énergétiques.



**Figure 12 : Variation du taux d'hormones (et de glucose) impliqués dans le métabolisme en fonction du temps**

*Adapté de Begg et & Woods <sup>138</sup>*

### C. Plasticité des circuits neuronaux de la prise alimentaire dépendant de l'état énergétique

Depuis peu, la neuroanatomie du système à mélanocortine a été complétée par la mise en évidence d'un troisième partenaire cellulaire reliant les neurones POMC/CART aux neurones AgRP/NPY. Cela a été guidé par une observation simple. Si la cible de la leptine est le système à mélanocortine avec comme seuls acteurs les neurones AgRP/NPY – POMC/CART, une délétion du récepteur à la leptine dans ce système devrait avoir des conséquences dramatiques sur la régulation du poids corporel (obésité massive). Pourtant, la délétion de ce récepteur sur les neurones POMC ou AgRP n'aboutit qu'à un faible développement de l'obésité <sup>139 140</sup> (augmentation d'environ 5 g du poids corporel chez des souris de 2 à 3 mois). Cela suggère que d'autres neurones exprimant le récepteur à la leptine interviennent dans ce circuit.

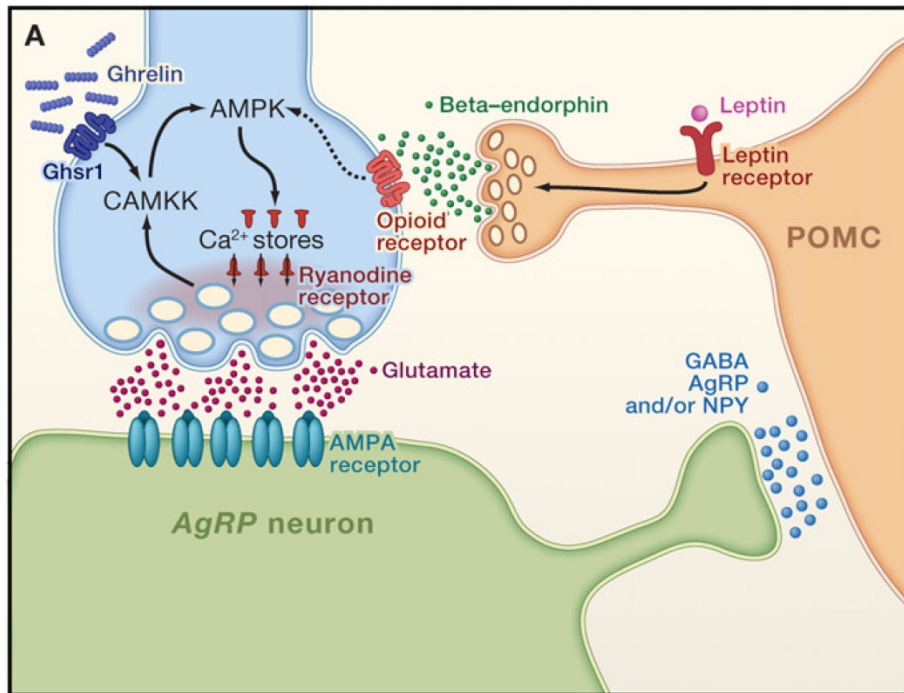
Ainsi, l'étude récente de Vong & Lowell <sup>41</sup> s'est focalisée sur les neurones glutamatergiques et GABAergiques exprimant le récepteur à la leptine dans le noyau arqué. Les auteurs ont pour cela utilisé des souris exprimant la recombinaison *Cre* soit dans les neurones glutamatergiques (souris *Vglut2-ires-Cre knockin*) soit dans les neurones GABAergiques (souris *Vgat-ires-Cre knockin*). En croisant ces animaux avec des souris ayant le récepteur à la leptine encadré par des séquences *Lox* (*Lep<sup>lox/lox</sup>*), les auteurs ont généré par recombinaison homologe spécifique, des souris dépourvues du récepteur à la leptine dans les neurones d'intérêt. Tout d'abord, il a été remarqué que seuls les animaux dépourvus du récepteur à la leptine dans les neurones GABAergiques développaient un surpoids, ce qui démontre l'importance des neurones GABAergiques sensibles à la leptine dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Quelle est l'identité de ces neurones GABAergiques ? Comme cela a été indiqué précédemment, les neurones AgRP, sensibles à la leptine, inhibent les neurones POMC par libération de GABA <sup>141</sup> et participent ainsi au maintien de l'homéostasie énergétique. En utilisant des souris dont les neurones AgRP sont incapables de libérer du GABA (souris *Agrp-ires-Cre, Vgat<sup>lox/lox</sup>*), Vong & Lowell ont observé que la leptine est toujours capable de réduire le nombre d'afférences inhibitrices GABAergiques sur les POMC, suggérant ainsi l'existence d'une population neuronale GABAergiques autres que les neurones AgRP innervant les neurones POMC.

Ces travaux ont été complétés par les études de Yang & Sternson <sup>142</sup> en 2011 et de Liu & Lowell en 2012 <sup>143</sup> ; toutes deux faisant intervenir une autre population neuronale, glutamatergique cette fois, dans le système à mélanocortine et ayant également son activité modulée par l'état métabolique.

Yang & Sternson <sup>142</sup> ont été les premiers à décrire une augmentation de la fréquence des courants miniatures excitateurs post-synaptiques dans les neurones AgRP de souris mises à jeun, comparé à la situation des souris nourries. Ceci correspond à une augmentation du nombre de synapses sur les neurones AgRP. Ces courants ont été identifiés comme étant glutamatergiques et dépendant d'une action de la ghréline. La nature de ces neurones présynaptiques projetant sur les neurones AgRP n'a pas été identifiée, toutefois Yang & Sternson ont décrit les mécanismes aboutissant à une activation glutamatergiques des neurones AgRP comme étant dépendant d'une signalisation calcique intracellulaire et de l'AMPK (**Figure 13**).

Dans l'étude de Liu & Lowell <sup>143</sup>, les auteurs ont générés des souris dépourvues de la sous-unité NR1 (gène codant : *Grin1*) des récepteurs au glutamate NMDAR soit dans les neurones AgRP (souris *Agrp-ires-Cre, Grin1<sup>lox/lox</sup>*) ou soit dans les neurones POMC (souris *Pomc-Cre Grin1<sup>lox/lox</sup>*). Les souris *Pomc-Cre Grin1<sup>lox/lox</sup>* ne développent pas de troubles métaboliques particuliers. En revanche, les souris *Agrp-ires-Cre, Grin1<sup>lox/lox</sup>* sont hypophagiques et présentent une diminution de la masse maigre et grasse comparé à leurs homologues *Grin1<sup>lox/lox</sup>*. Une analyse par microscopie confocale montre la présence abondante et naturelle d'épines dendritiques sur les neurones AgRP contrairement aux neurones POMC qui en sont largement dépourvus. La suppression des récepteurs NMDA des neurones AgRP provoque une chute de 50% du nombre d'épines dendritiques ainsi qu'une diminution de leur taille. De plus, la mise à jeun déclenche la genèse d'épines dendritiques sur les neurones AgRP ainsi que l'expression du marqueur d'activation c-Fos. Ces événements ne sont pas retrouvés sur les neurones AgRP dépourvus des récepteurs au NMDA. De manière similaire à ce qui a été observé par Yang & Sternson <sup>142</sup>, la mise à jeun des animaux provoque une augmentation de la fréquence des mEPSCs dans les neurones AgRP, suggérant fortement une augmentation du nombre de synapses sur les neurones AgRP. Ces phénomènes ne sont pas retrouvés sur les neurones AgRP dépourvus de récepteurs NMDA.





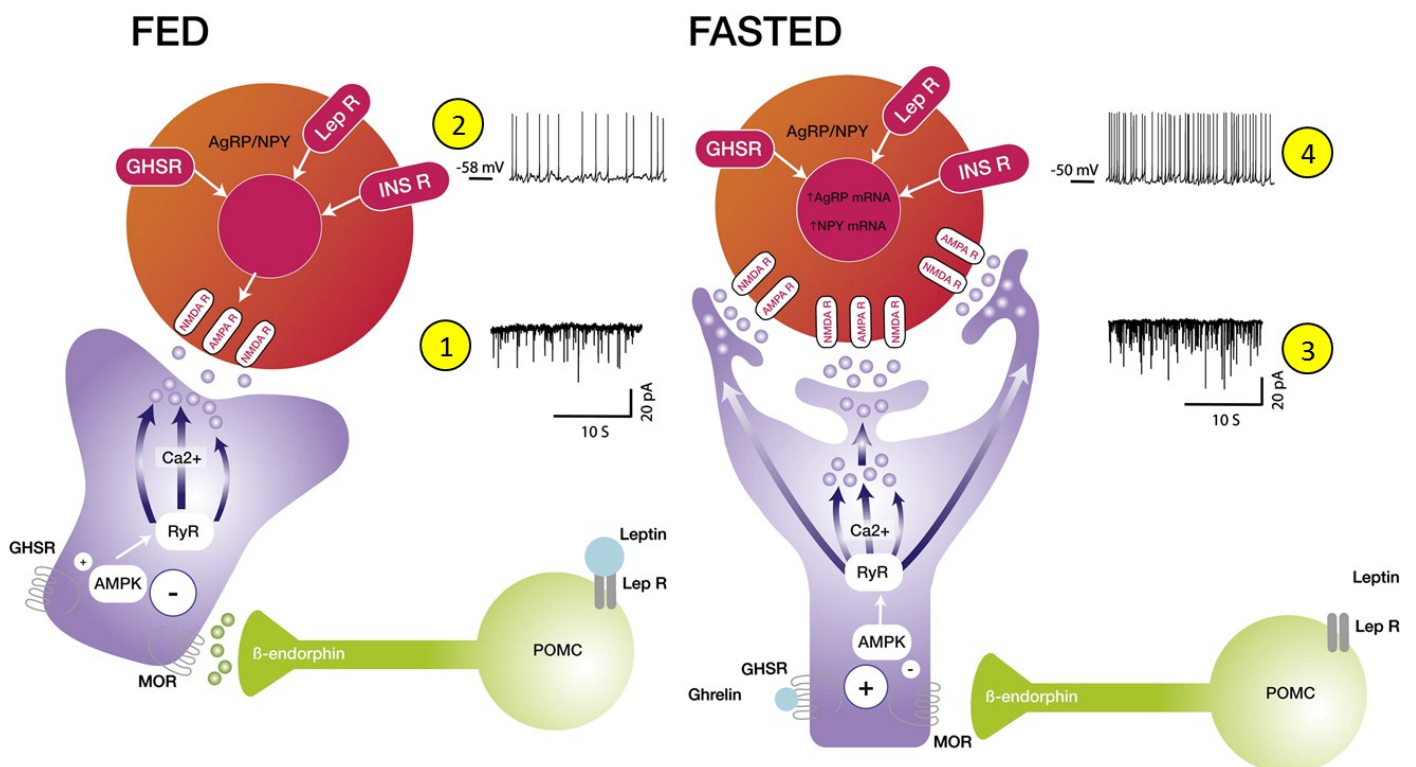
**Figure 13 : Nouvelle population neuronale glutamatergique activant les neurones AgRP**

A jeun, le taux de ghréline augmente et active une population neuronale glutamatergique via le récepteur *Ghsr1*. Une signalisation calcique intracellulaire déclenche l'activation de la calmodulin dependent protein kinase kinase (CAMKK), activant à son tour l'AMPK. L'ensemble de ces processus de signalisation calcique va aboutir à l'activation des récepteurs à ryanodine et à la libération présynaptique de glutamate, activant les neurones AgRP par les récepteurs AMPA post synaptiques. Ce processus est inhibé (dans la situation « nourrie ») par la libération de  $\beta$  endorphine des neurones POMC, sous la dépendance de la leptine, inhibant les neurones glutamatergiques via les récepteurs aux opioïdes. D'après Dietrich & Horvath <sup>144</sup>

Ainsi, on peut résumer les études de Yang & Sternson et de Liu & Lowell à travers la **Figure 14**. Les neurones AgRP/NPY reçoivent des stimulations glutamatergiques via des récepteurs NMDA ou non NMDA (AMPA) (**étape 1**). A l'état nourri, les niveaux de leptine élevés activent les neurones POMC/CART. Cela provoque la libération de  $\beta$ -endorphine au niveau de contacts axo-axoniques et active des récepteurs MOR situés sur des neurones glutamatergiques. Ceci inhibe la libération de glutamate sur les neurones post synaptiques AgRP/NPY. Ils sont alors hyperpolarisés et la fréquence des potentiels d'action est basse (**étape 2**).

A l'état à jeun, le faible niveau de leptine ne permet pas l'activation des neurones POMC/CART et donc le relargage de  $\beta$  endorphine qui inhibe les neurones glutamatergiques. En revanche, les niveaux de ghréline élevés stimulent les neurones glutamatergiques qui libèrent alors le glutamate sur les neurones AgRP/NPY (**étape 3**) post synaptiques, aboutissant à leur dépolarisation et leur activation (**étape 4**). Ces changements présynaptiques dans les neurones glutamatergiques sont coordonnés par la voie de signalisation de l'AMPK et le récepteur ryanodine (RyR), dépendant des stocks intracellulaires de calcium.

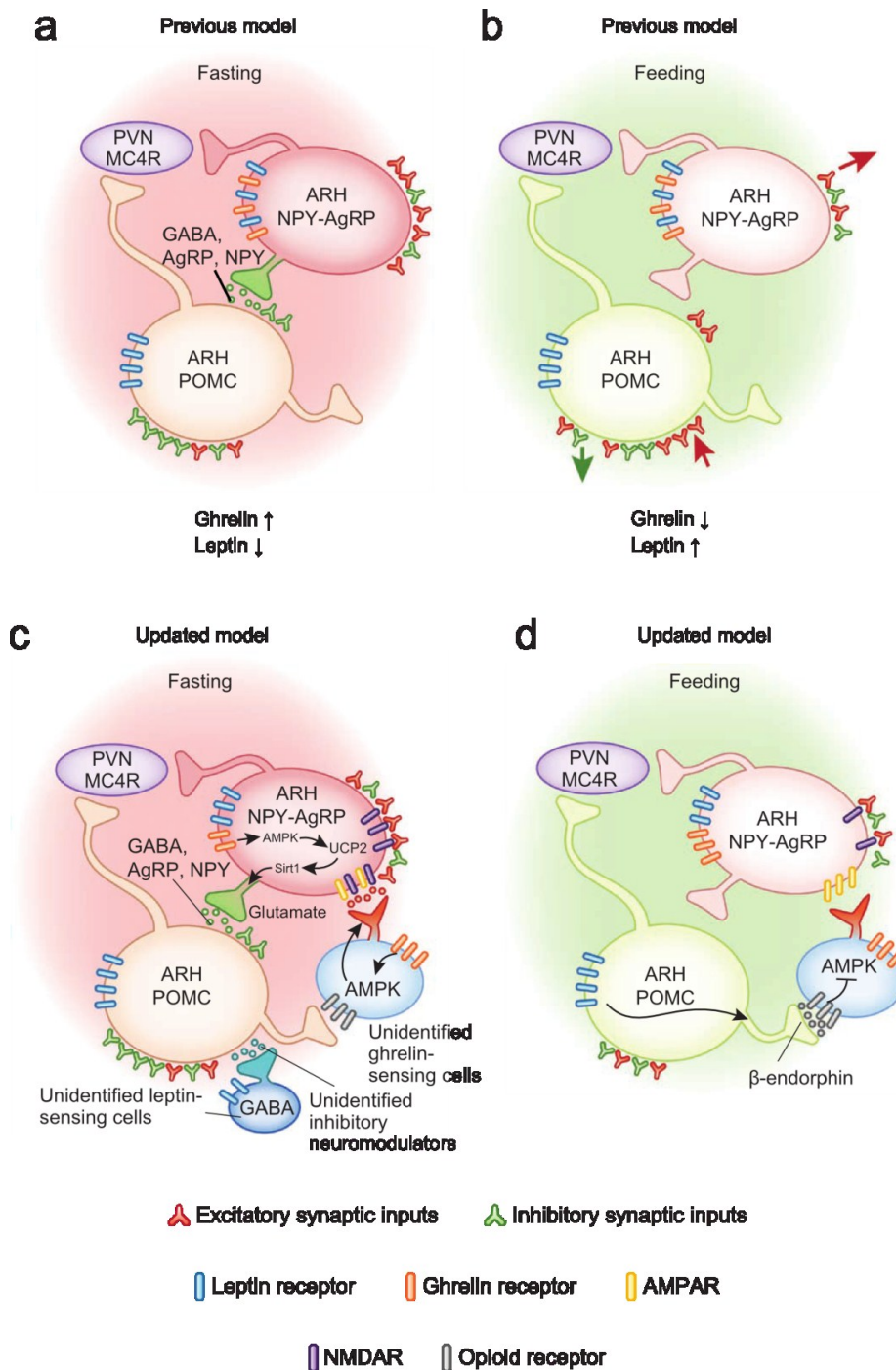
La signalisation calcique en amont et l'augmentation des stimulations glutamatergiques en aval aboutissent à une augmentation du nombre de synapses et d'épines dendritiques entre les neurones glutamatergiques et les neurones AgRP/NPY.



**Figure 14 : Contrôle du tonus exciteur sur les neurones AgRP/NPY**

Adapté de Spanswick & Cowley, 2012 <sup>145</sup>

Ces travaux montrent également que les deux populations neuronales POMC/CART et AgRP/NPY, caractérisées jusqu'alors comme étant des neurones dits de premier ordre au vu de la détection initiale des signaux hormonaux qu'ils permettent, ne sont pas forcément les premiers senseurs cellulaires de ces hormones au sein du système à mélanocortine. Ces expériences ont mis en évidence la présence de neurones glutamatergiques et GABAergiques sensibles à la ghréline et à la leptine qui se placent en amont des neurones NPY et POMC respectivement. Pour le moment, ces nouvelles populations neuronales ne sont pas encore caractérisées en termes d'expression de neuropeptide. Cependant, on peut donc mettre à jour le modèle du système à mélanocortine en incorporant ces neurones modulateurs, comme cela est décrit dans la **Figure 15**.



**Figure 15 : Nouveau modèle du système à mélanocortine**

Schéma du nouveau modèle à mélanocortine, intégrant deux autres populations neuronales glutamatergiques et GABAergiques non identifiées. (a,b) Modèles initiaux de plasticité synaptique du système à mélanocortine dans le noyau arqué. (a) A l'état à jeun, associé avec un fort taux de ghréline et un faible taux de leptine, les afférences excitatrices sur les neurones AgRP/NPY sont augmentées, les afférences inhibitrices diminuées. À l'inverse, l'activité neuronale excitatrice efférente des POMC est diminuée. (b) A l'état nourri, le modèle est décrit comme inversé, augmentant le tonus anorexigène de la voie MC4R. (c,d) Nouveau modèle ajoutant un intermédiaire neuronal glutamatergique. (c) A l'état à jeun, des neurones GABAergiques sensibles à la leptine forment un tonus inhibiteur sur les neurones POMC en plus de l'action GABAergique classique des neurones AgRP/NPY sur les neurones POMC. (d) A l'état nourri, la leptine active les neurones POMC, libérant ainsi de la  $\beta$  endorphine inhibitrice sur les neurones glutamatergiques. L'ensemble de ces actions inhibent les neurones AgRP/NPY. D'après Zeltser & Tschöp, 2012 <sup>146</sup>

L'ensemble de ces données montre que le réseau neuronal du système à mélanocortine n'est pas figé chez la souris adulte. Selon les fluctuations internes (état nourri vs état à jeûn), les neurones POMC/CART et AgRP/NPY subissent des réarrangements synaptiques importants. Ce sont les hormones impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique comme la ghréline ou la leptine qui en plus de leur action princeps sur l'activation ou l'inactivation du système à mélanocortine, provoquent ces processus de plasticité synaptique. L'activité de ce système pourrait donc être ajustée « en permanence » grâce aux hormones circulantes pour contrôler au mieux, c'est-à-dire en fonction de l'état nutritionnel, l'homéostasie énergétique. Toutefois ces études ont comparé deux stratégies extrêmes : état nourri vs état à jeun depuis 24h chez la souris, ce qui provoque des variations massives de la leptine et de la ghréline circulante. Il reste à démontrer si ces processus sont déclenchés à l'échelle des repas, en situations plus physiologiques dans lesquelles les fluctuations d'hormones sont plus modérées.

## 4. Rôle de PSA-NCAM dans la plasticité synaptique hypothalamique

La plasticité synaptique cérébrale dans sa composante morphologique est définie comme une modification du nombre de synapses présentes sur un neurone. Pour que cela soit possible, les cellules doivent « bouger », et modifier leurs contacts avec l'environnement extracellulaire immédiat, ce qui implique notamment une modification des jonctions cellulaires. NCAM (neural cell adhesion molecule) et sa forme sialylée PSA-NCAM (polysialic acid – NCAM), régulent les contacts entre cellules, et jouent un rôle primordial dans certains modèles de plasticité synaptique cérébral.

### A. Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)

Parmi toutes les CAMs (cell adhesion molecules), NCAM est la plus présente et la plus étudiée dans le système nerveux. Elle est présente à la surface des cellules. NCAM fait partie de la superfamille des molécules d'immunoglobulines d'adhésion et est codée par un gène de 26 exons <sup>147</sup>. Trois isoformes de 180, 140 et 120 kDa peuvent être générées par épissage alternatif. Ces 3 trois polypeptides diffèrent par leur domaine cytoplasmique (NCAM 180 et 140) ou par leur attache à la membrane (NCAM 120). Cette dernière n'ayant pas de segment cytoplasmique, elle est liée à la membrane par un intermédiaire glycosylphosphatidylinositol (GPI) <sup>148</sup>. La région extracellulaire de NCAM comprend 5 différentes immunoglobulines (Ig1 – 5) et deux domaines fibronectine de type III (Fn1-2) (Figure 16).

Des jonction homophiliques NCAM-NCAM intercellulaires peuvent se former grâce à la dimérisation des Ig1 et Ig2 d'une molécule de NCAM avec une autre. Ces jonctions sont fortes et permettent une adhésion cellulaire stable <sup>149</sup>.

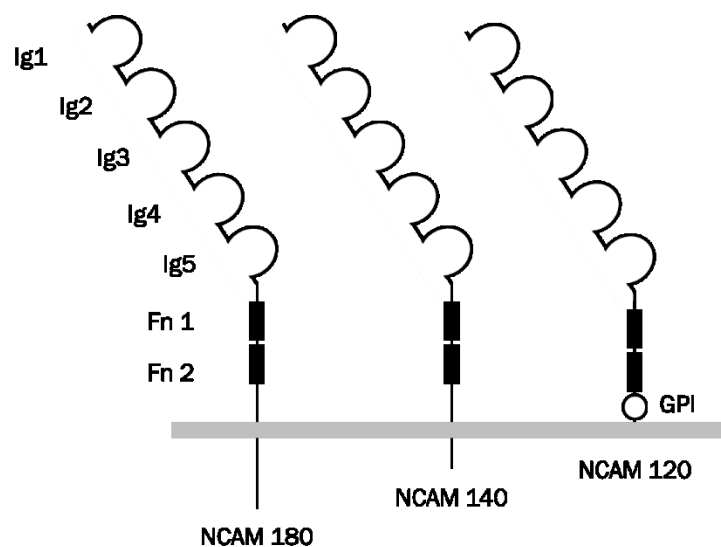
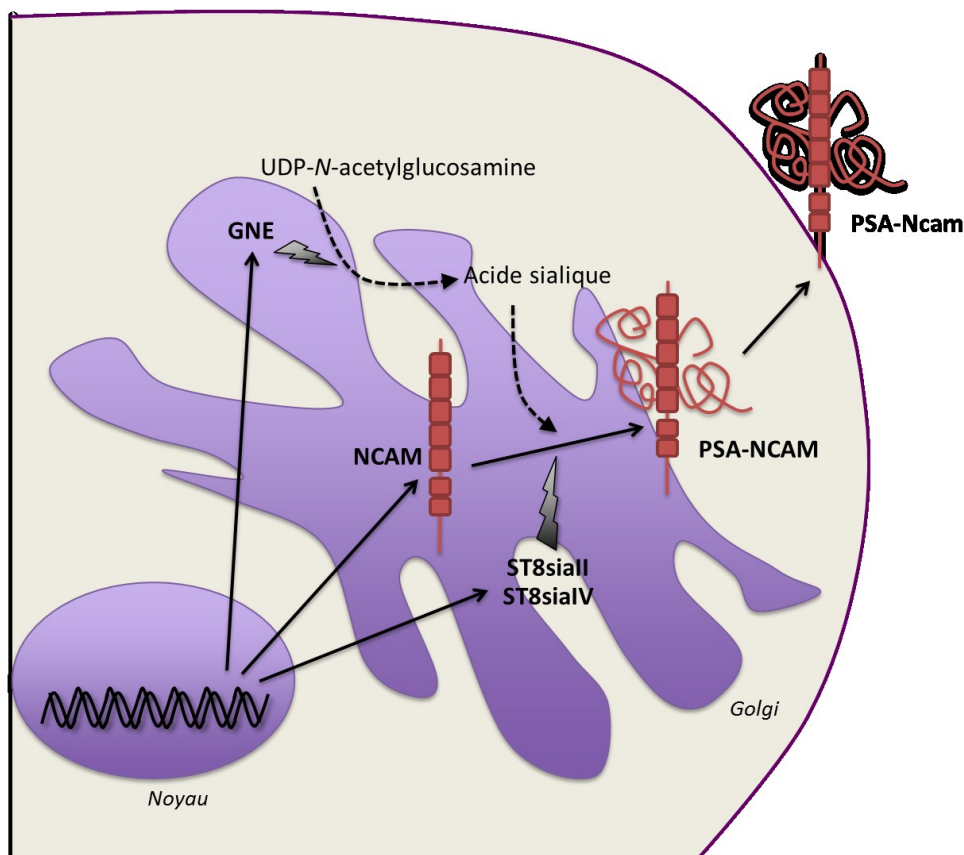


Figure 16 : NCAM et ses trois isoformes

## B. L'acide polysialique (PSA) et PSA-NCAM

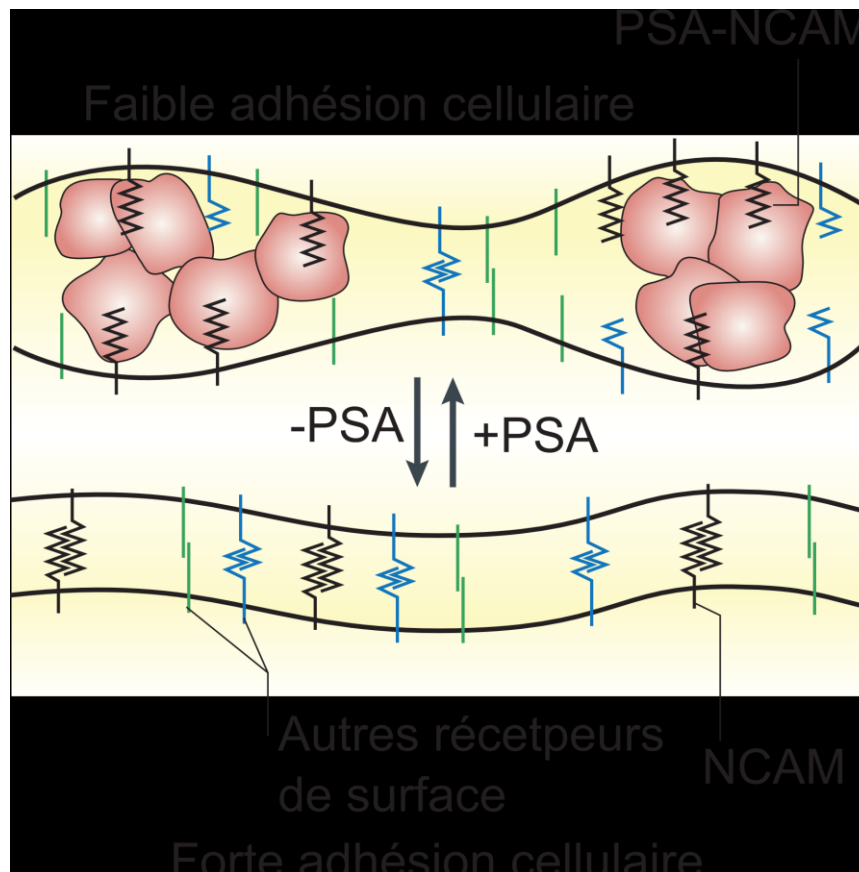
PSA est un homopolymère linéaire « d'acide sialique »  $\alpha$ 2-8-acide N-acétylneuraminique (NeuNAc). L'acide sialique est synthétisé dans le cytosol à partir de l'UDP-N-acetylglucosamine par l'UDP-N-acetylglucosamine 2-épimérase/N- acétylmannosamine-kinase (GNE). PSA peut être attaché aux sous-unités Ig5 de NCAM pour former un complexe « PSA-NCAM ». Au niveau sub-cellulaire, cette réaction se fait dans l'appareil de Golgi et est catalysée par deux sialyl transférases : la sialyltransférase-X (STX ou, ou PST-2, ou St8SialI) et la polysialyltransférase (PST-1 ou St8SialIV) <sup>150 151 152 153</sup>. Ces deux enzymes sont très fortement exprimées pendant la période embryonnaire afin de mettre en place les réseaux neuronaux. Après la naissance, leur expression diminue ; STX ne s'exprime plus, PST-1 reste exprimé constitutivement <sup>154 155</sup>. PSA peut être dégradé par une sialidase neurale, trouvée dans des fractions enrichies en synaptosomes <sup>156</sup>. Pendant la période postnatale, la synthèse de PSA diminue conjointement avec l'augmentation de l'activité des sialidases neurales <sup>156 157</sup>, ce qui permet d'éliminer efficacement la présence de PSA dans le tissu nerveux. La voie de synthèse de PSA-NCAM est illustrée dans la **Figure 17**.



**Figure 17 : Synthèse de PSA-NCAM**

*La synthèse de PSA-NCAM se fait dans l'appareil de Golgi. Le complexe est ensuite exporté à la membrane.*

Les liaisons homophiliques NCAMs participent à l'adhésion cellulaire. PSA a la particularité d'être chargé négativement et par conséquent d'être hydratée. Ainsi, la forme PSA-NCAM, riche en eau, repousse les membranes cellulaires riches en lipides. De plus, l'encombrement stérique important de PSA sur NCAM forme une barrière physique à l'adhésion cellulaire et empêche les interactions NCAM-NCAM <sup>158 159 160</sup>. La **Figure 18** représente les mécanismes de répulsion et d'adhésion cellulaire régulée par sialylation de NCAM.



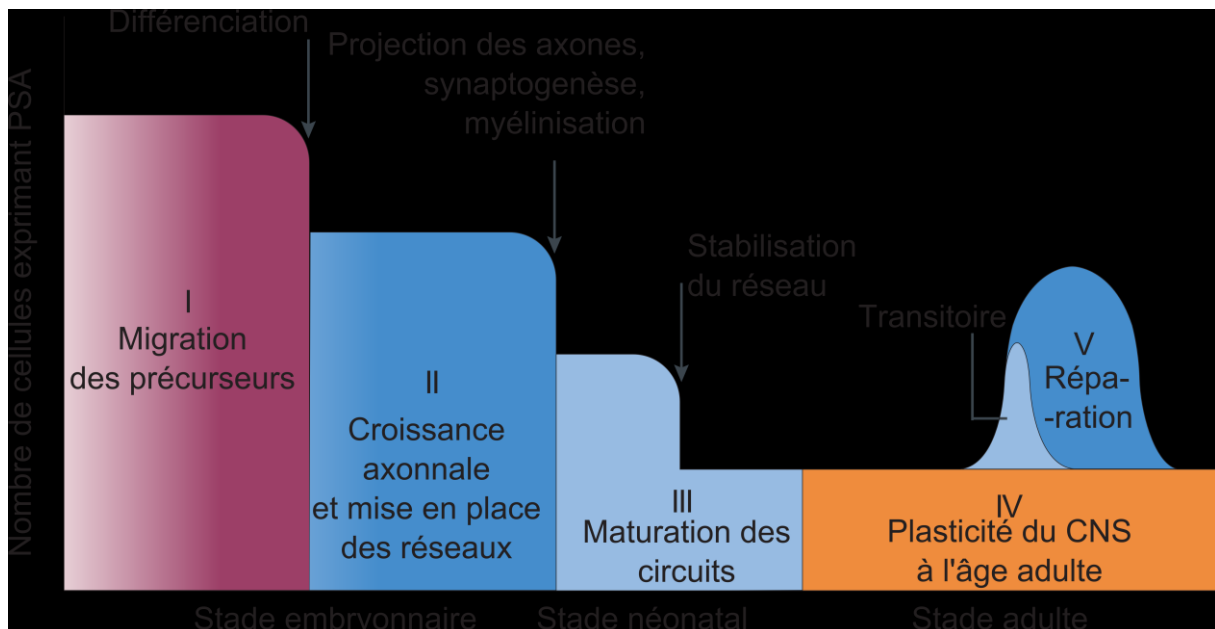
**Figure 18 : Mécanisme de répulsion/adhésion cellulaire de PSA-NCAM**

*D'après Rutishauser, 2008 <sup>161</sup>*



### C. Plasticité synaptique PSA dépendante

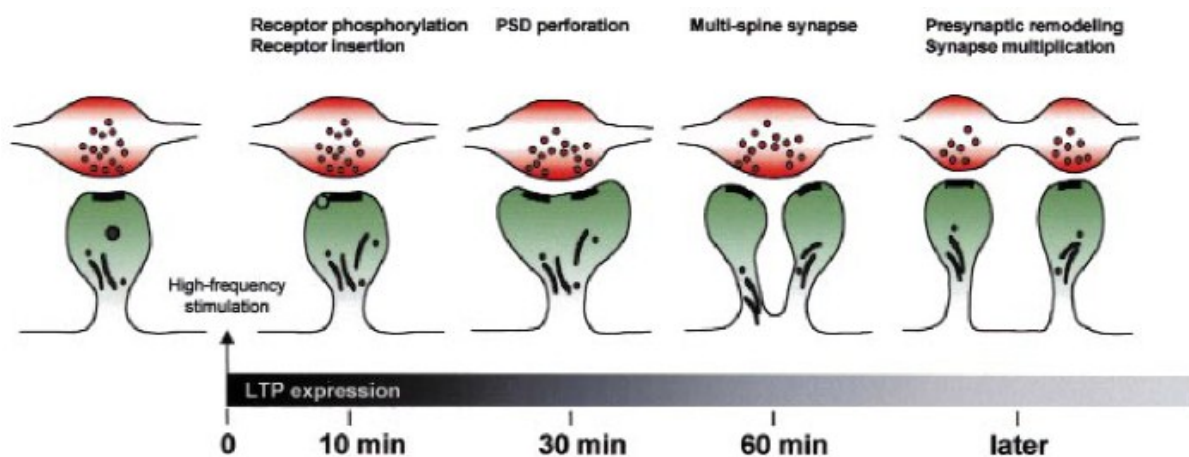
Pendant le développement PSA-NCAM est fortement exprimé dans tout le cerveau, contribuant à la migration cellulaire, la mise en place des réseaux neuronaux et la croissance des axones <sup>162 163 164</sup>. A l'âge adulte, les réseaux neuronaux étant en place l'expression de PSA-NCAM diminue, excepté dans certaines zones dites « plastiques ». Ce sont en particulier les zones subissant continuellement des réarrangements neuronaux et les zones neurogéniques. Il s'agit par exemple du flux migratoire rostral se dirigeant vers le bulbe olfactif <sup>165</sup>, du gyrus denté au niveau de l'hippocampe <sup>165</sup>, de l'amygdale <sup>166</sup>, du cortex préfrontal <sup>167</sup>, du cortex piriforme <sup>168 169</sup>, de l'hypothalamus <sup>170</sup> et du tronc cérébral <sup>171</sup>. A l'échelle cellulaire, PSA peut être exprimé à la fois sur les membranes pré ou post-synaptiques <sup>172 173</sup>. La **Figure 19** montre l'évolution du taux de PSA dans le système nerveux central en fonction du stade de développement.



**Figure 19 : Résumé des différents rôles de PSA dans le système nerveux**

Le graphique montre quatre étapes différentes (I à IV), plus une étape de réparation ou de réponse adaptative (V). Il représente les différentes étapes d'expression de l'acide polysialique selon le stade développemental. Les flèches verticales représentent un événement clef associé avec une baisse du taux de PSA. D'après Rutishauser, 2008 <sup>161</sup>

En tant que molécule « anti adhésive », PSA-NCAM est associée à de nombreux processus adaptatifs aboutissant à des remaniements cellulaires et structuraux des réseaux neuronaux <sup>174</sup>. Un des processus adaptatifs neurologiques les plus étudiés est la mémoire. Des observations simples ont montré que la manipulation expérimentale de l'expression de PSA-NCAM dans les zones cérébrales impliquées dans les processus de mémoire (bulbe olfactif, lobe temporal, hippocampe) altère le processus d'apprentissage <sup>175</sup>. Inversement, le processus d'apprentissage lui-même augmente l'expression de PSA-NCAM <sup>176</sup>. Au niveau cellulaire, le phénomène de LTP (potentialisation à long terme) des synapses semble être un des mécanismes à la base des processus de mémoire et d'apprentissage. La LTP consiste en un processus de renforcement synaptique, correspondant à une augmentation d'amplitude de la réponse post-synaptique à la suite d'une intense activation pré-synaptique. <sup>177</sup>. Ainsi, le seuil d'activation du neurone post synaptique est plus bas et sa réponse plus longue. Il a été montré que la LTP est accompagnée de changements structuraux comme des remodelages du cytosquelette à la synapse du neurone post-synaptique <sup>178 179</sup>, la genèse d'épines dendritiques <sup>180</sup> et l'apparition de nouveaux boutons synaptiques <sup>181</sup>. L'ensemble de ces processus de plasticité synaptique est illustré dans la Figure 20.



**Figure 20 : Génération de nouvelles synapses par la LTP**

En 10 minutes suivant la LTP, dans le neurone post synaptique, des voies de signalisation dépendantes du calcium sont activées et provoquent la phosphorylation des récepteurs AMPA et une augmentation de leur conductance. De plus, la taille de l'épine post synaptique et le nombre de récepteurs AMPA délivrés par exocytose augmentent. Ceci aboutit à une augmentation de la densité post synaptique (PSD) et une séparation de la synapse mère en deux sœurs (perforation synaptique) selon des mécanismes encore inconnus, sur le même bouton synaptique. Après, la synapse se divise totalement pour aboutir à la génération de deux synapses distinctes. D'après Lüscher & Muller, 2000 <sup>178</sup>

Dans ce contexte, si l'on enlève PSA de NCAM à l'aide d'un agent pharmacologique, la LTP ne peut plus s'effectuer dans la région CA1 de l'hippocampe <sup>175</sup>. Des souris adultes

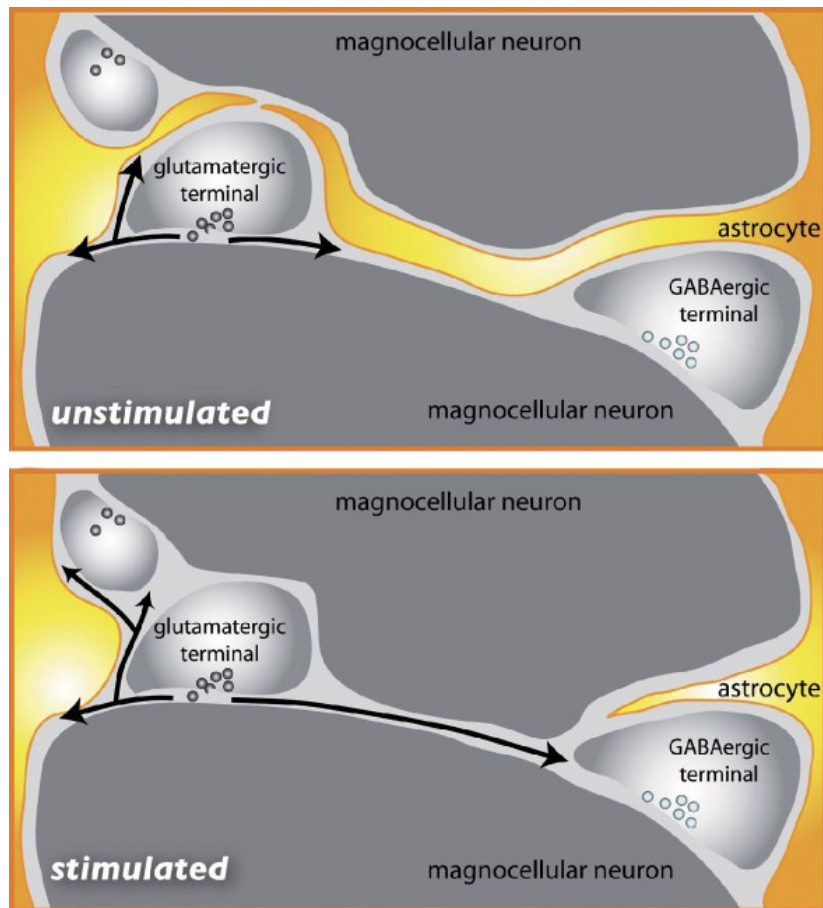
déficientes pour la sialyltransférase PST-1 montrent des capacités réduites dans l'induction de la LTP. Il est intéressant de noter que les souris déficientes pour STX, non exprimée à l'âge adulte, ne développent pas ces troubles de la LTP <sup>182</sup>. De plus, la LTP elle-même induit une augmentation de l'isoforme NCAM-180 <sup>183</sup>. Ceci suggère que chez l'adulte PST-1 exerce un rôle clef dans la sialylation des NCAM dans la genèse des processus de LTP.

Dans un autre modèle adaptatif neurologique, celui de douleur chronique, la plasticité synaptique PSA-NCAM dépendante a aussi été mise en évidence au niveau de la substance gélatineuse de Rolando de la moelle épinière. Afin de ne pas surcharger le système nerveux central lors de l'excitation massive des fibres sensorielles (cas de l'hyperalgésie neuropathique), PSA-NCAM permet aux synapses de se défaire au niveau de la moelle épinière. Ce processus semble interrompre le transfert de l'information nociceptive depuis la zone lésée vers les centres intégratifs supérieurs <sup>184</sup>.

Pendant la lactation, le système magnocellulaire hypothalamo-neurohypophysaire (PVN et neurohypophyse) subit de profonds remaniements structuraux. L'activité électrique des neurones à ocytocine, responsables de la lactation, est modifiée afin d'augmenter le nombre de potentiels d'action pour maintenir la sécrétion de lait <sup>185 186</sup>. Pour maintenir l'intégrité des synapses, les adhérences cellulaires doivent être fortes ; on observe ainsi une diminution du taux de PSA-NCAM pendant la lactation dans ce système. Au sevrage, lorsque la lactation s'arrête, le niveau de PSA-NCAM augmente dans cette zone afin de rétablir la neuro-circuiterie <sup>187</sup>.

Dans ce même système, les astrocytes peuvent jouer un rôle dans les phénomènes de plasticité synaptique. Ainsi, il a été montré que pendant la lactation, il y a un retrait de la couverture astrocytaire au niveau des somas des neurones à ocytocine grâce à la surexpression de PSA-NCAM par les astrocytes <sup>188</sup>. De plus les pieds astrocytaires peuvent s'intégrer dans la fente synaptique et perturber la transmission neuronale, de manière PSA-NCAM dépendante <sup>189</sup>. Ces processus sont illustrés dans la **Figure 21**.

On observe des phénomènes similaires sur les neurones à GnRH dans le noyau arqué pendant le cycle ovarien. Une première observation a montré que le nombre de synapses axo-somatique évolue en fonction du cycle ovarien dans le noyau arqué <sup>190</sup>. Une autre étude a montré que l'ovariectomie annule ces phénomènes de plasticité au niveau de neurones GABAergiques. Un traitement avec du  $17\beta$  oestradiol chez les rates ovariectomisées restaure les phénomènes de plasticité. Il est important de noter que dans cette étude un traitement pharmacologique clivant PSA de NCAM, ou un traitement avec des anticorps dirigés contre PSA, injectés directement dans le noyau arqué inhibe ces phénomènes de plasticité synaptique qui s'accompagnent d'une surexpression de PSA-NCAM <sup>191</sup>.



**Figure 21 : Schéma montrant l'implication des pieds astrocytaires dans la transmission synaptique**

*Unstimulated, correspond à des femelles en période post lactation (sevrage), stimulated correspond à des femelles en lactation. En condition stimulée, la rétractation des pieds astrocytaires favorise les processus de libération du glutamate (flèches noires) dans la fente synaptique et permet l'excitation des neurones post synaptiques. D'après Theodosis & Oliet, 2008 <sup>192</sup>*

L'ensemble de ces données montre que les propriétés anti-adhésives de PSA-NCAM à l'échelle cellulaire participent aux événements de plasticité synaptique. De nombreuses études, citées plus haut, montrent que l'inhibition de PSA-NCAM à l'aide d'agents pharmacologiques ou d'anticorps, bloque les événements de plasticité PSA-NCAM dépendant. Bien évidemment, la surexpression de PSA-NCAM n'est pas le seul mécanisme moléculaire permettant aux cellules de subir des réarrangements structuraux. Toutefois, chaque condition expérimentale (stimulation électrique) ou physiologique (lactation, cycle ovarien) aboutissant à une surexpression de PSA-NCAM est associée à des événements de plasticité synaptique. De ce fait, PSA-NCAM, lorsqu'il est surexprimé, devient un marqueur de plasticité synaptique.

## Problématique

L'obésité, selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), est définie comme « une accumulation anormale ou excessive de graisse qui peut nuire à la santé ». L'indice de masse corporelle (IMC), permet par un calcul simple, de déterminer et de classer le surpoids et l'obésité chez l'adulte. Il est calculé en divisant le poids en kilogrammes par le carré de la taille en mètres (il s'exprime en  $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Un individu sain présente un IMC entre 18,5 et 24,9. Au-delà de 25 les individus sont dits en surpoids, obèses au-delà de 30. L'OMS enregistrait en 2008 plus d'1,4 milliard d'adultes en surpoids et plus de 500 millions obèses. Cette maladie métabolique entraîne des conséquences pathologiques : troubles cardiovasculaires, diabète, arthrose, cancers... Chaque année, plus de 2,8 millions de personnes meurent des conséquences du surpoids ou de l'obésité. Comme pour les maladies infectieuses, on parle « d'épidémie » de maladies métaboliques. En plus des enjeux sanitaires importants, des enjeux économiques sont à prendre en compte, notamment concernant la prise en charge médicale des personnes touchées <sup>193</sup>.

L'origine fondamentale de l'obésité est simple : une dérégulation de la balance énergétique aboutissant à des excédents énergétiques. Les causes, elles, sont complexes car dépendent de plusieurs facteurs : style de vie, environnement, patrimoine génétique, état psychologique et physiologique. On parle de pathologie multifactorielle. Le système nerveux central, et en particulier l'hypothalamus, contrôle l'homéostasie énergétique. Il est maintenant certain que des défauts de commande centrale peuvent être à l'origine de troubles métaboliques.

Il est donc important de mieux comprendre les mécanismes régulateurs centraux pour identifier de nouvelles pistes d'intérêt thérapeutique dans la lutte contre l'obésité. Nous avons fait cela à travers une recherche fondamentale focalisée sur le rôle de la plasticité hypothalamique dans le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel. L'étude a consisté à rechercher dans un modèle expérimental murin si des mécanismes moléculaires relatifs au remodelage synaptique étaient activés dans l'hypothalamus lors d'un déséquilibre alimentaire généré par un régime obésogène. Nous avons recherché le lien entre les mécanismes identifiés et l'adaptation métabolique et comportementale qui se produit naturellement suite à l'introduction de ce régime. Puis, nous avons évalué si un défaut de plasticité dans l'hypothalamus pouvait accélérer le développement de pathologies métaboliques dites de surcharge telles que l'obésité et l'athérosclérose.

## Objectifs

Avant de commencer ce travail, on savait que les circuits de la prise alimentaire étaient « plastiques » et que cette plasticité faisait défaut dans un modèle d'obésité génétique, lié à une déficience en leptine. De plus, plusieurs études avaient démontré que les hormones telles que la leptine, la ghréline, la corticostérone pouvaient stimuler rapidement une plasticité synaptique au sein du système à mélanocortine qui gouverne la prise alimentaire et plus largement l'homéostasie énergétique. Toutefois, l'influence directe de ces processus de plasticité hormono-dépendante sur le comportement alimentaire n'avait jamais été établi.

Dans un premier temps, mon travail de thèse a consisté à démontrer l'existence de ce lien pressenti entre plasticité hypothalamique et comportement alimentaire. Cela a été fait dans un modèle expérimental murin en condition physiologique. Puis, nous avons évalué s'il pouvait exister une relation causale entre un défaut de plasticité hypothalamique et la vulnérabilité à l'obésité nutritionnelle. Enfin, nous avons recherché si un défaut de plasticité pouvait également être un facteur accélérant le développement de l'athérosclérose, autre maladie liée à une surcharge nutritionnelle.

Ainsi, cette thèse a comporté 4 grands objectifs.

**Objectif 1** : évaluer l'implication de la plasticité hypothalamique dans le contrôle de la prise alimentaire. Nous nous sommes intéressés à l'influence d'une exposition courte (1 semaine) à un régime obésogène (hypercalorique et hyperlipidique) sur le comportement alimentaire des souris. En effet, ce paradigme expérimental permet d'observer une réponse homéostatique de la prise alimentaire de manière très reproductible. Or, il est connu que la plasticité cérébrale a comme finalité une adaptation de l'organisme face à un environnement changeant. Ce modèle basé sur un changement de condition nutritionnelle persistant et présentant un comportement adaptatif semblait donc idéal pour rechercher un mécanisme de plasticité au sein des circuits neuronaux de la prise alimentaire.

**Objectif 2** : évaluer les effets d'un défaut de plasticité hypothalamique dans un modèle d'obésité. Une exposition longue (3 mois) à un régime obésogène provoque une obésité chez les rongeurs. Pourtant certains individus « résistent » à la diète et ne développent qu'un léger surpoids alors que d'autres développent une obésité massive. Nous avons émis l'hypothèse que la variabilité interindividuelle concernant le tableau clinique terminal pouvait être liée à des capacités de plasticité différentes. Est-ce que l'altération des capacités de plasticité synaptique hypothalamique, chez des animaux sauvages, peut entraîner une vulnérabilité à l'obésité ?

**Objectif 3** : évaluer les effets d'une déficience innée de plasticité synaptique dans un modèle d'obésité. Pour cela, nous avons réalisé une étude à travers un modèle KO pour la sialyltransférase 1 (Pst1) lors d'une exposition chronique à un régime obésogène. Des individus ayant de faibles capacités de plasticité synaptique hypothalamique seraient-ils plus vulnérables face à la pression calorique ? Développent-ils une obésité plus rapidement lors d'une exposition chronique à un régime hypercalorique ?

**Objectif 4** : évaluer les effets d'un défaut de plasticité hypothalamique dans un modèle d'athérosclérose. En plus de la prise alimentaire, le système à mélanocortine contrôle d'autres fonctions telles que le métabolisme périphérique du cholestérol. Nous avons voulu savoir si les événements de plasticité hypothalamique avaient une implication dans la régulation périphérique du cholestérol. Il s'agissait également de déterminer si un défaut de plasticité cérébrale au niveau de l'hypothalamus provoquait une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol circulant, favorisant ainsi une hypercholestérolémie et le dépôt des plaques d'athérome en cas de régime pro-athérogène.



# Résultats

# Objectif 1 : évaluer l'implication de la plasticité hypothalamique dans le contrôle de la prise alimentaire

## 1. Caractérisation du modèle

L'objectif de ce travail était de déterminer si un changement d'alimentation peut déclencher des événements de plasticité hypothalamique. Pour cela nous avons utilisé des souris mâles adultes de 8 semaines C57BL/6. Elles étaient nourries avec un régime standard (STD) contrôle ou avec un régime hypercalorique et hyperlipidique (HFD, High fat diet) pendant une semaine. Le **Tableau 4** récapitule les caractéristiques du régime contrôle (Standard, STD) et du régime HFD.

**Tableau 4 : Caractéristiques et composition des régimes standard et HFD**

	Composition Centésimale (%)			Apports énergétiques (%)	
	STD	HFD		STD	HFD
Protéines	16	20	Densité calorique (kcal/g)	2,9	4,4
Huile	3,1	21,8	Calories provenant des glucides	60,9	42,5
Fibres	3,9	3	Calories provenant des lipides	22,4	42,5
Amidon	45,8	28	Calories provenant des protéines	16,7	15
Sucres	3	19			
Minéraux et Vitamines	5,5	8			

## 2. Adaptation comportementale et métabolique en réponse au HFD

### A. Adaptation comportementale

Les souris ont été nourries *ad libitum* avec le régime STD. L'alimentation des souris a été changée par un HFD. Leur prise alimentaire a été mesurée quotidiennement. Après une journée, la prise énergétique des souris nourries en HFD a augmenté rapidement :  $0,85 \pm 0,06$  kcal/j/g poids corporel contre  $0,52 \pm 0,05$  kcal/j/g poids corporel chez les souris nourries en régime STD. Cependant, cet effet était transitoire et est revenu à un niveau équivalent à celui du STD en une semaine, alors que le régime HFD était maintenu (**Figure 22A**).

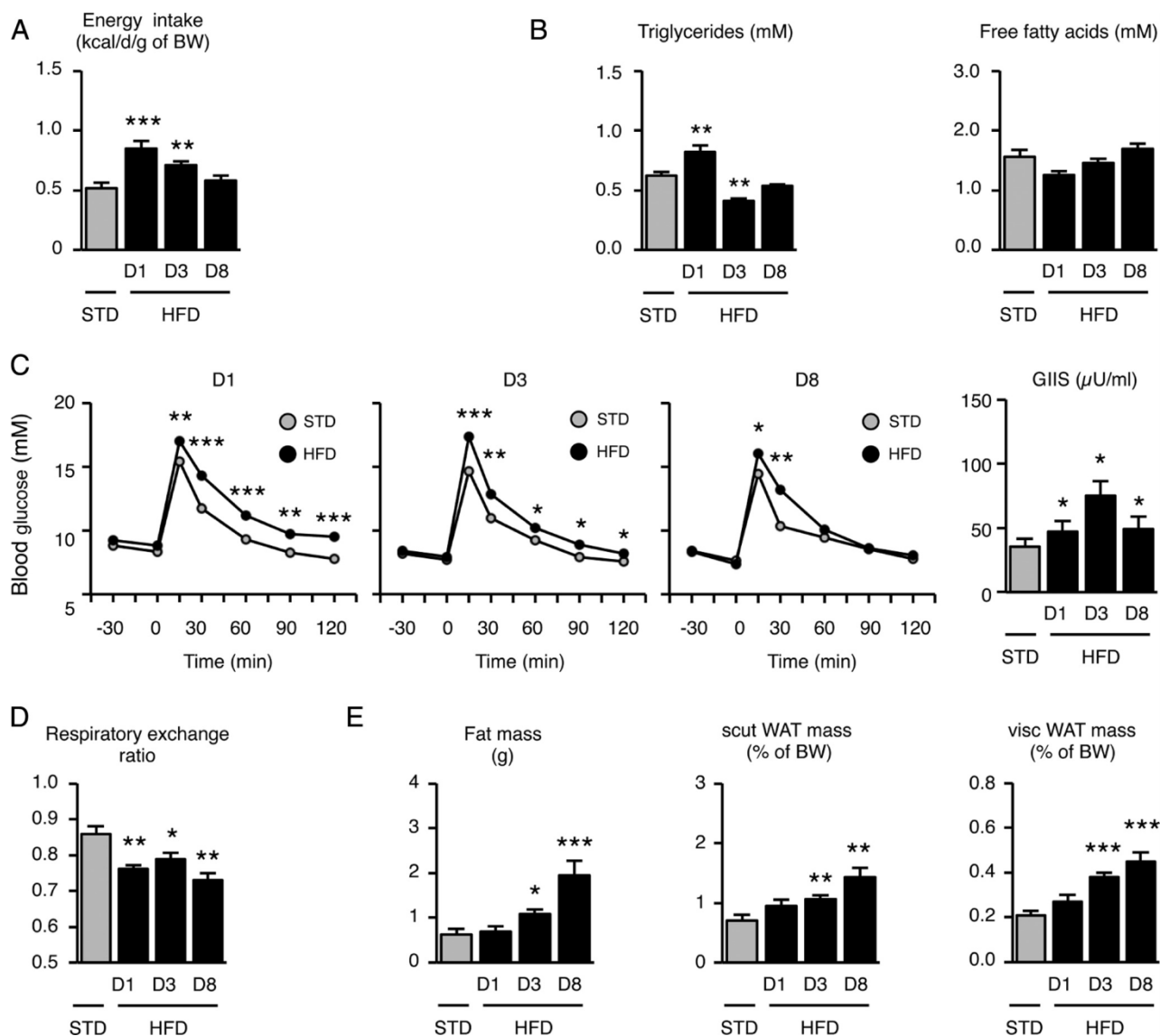
### B. Adaptation métabolique

L'exposition courte au régime HFD a déclenché très rapidement des désordres métaboliques. On a observé une augmentation des triglycérides circulants (**Figure 22B**) dès 1 journée d'exposition mais pas de différence dans le taux d'acides gras libres plasmatique. Une intolérance au glucose est apparue (**Figure 22C**). Ces altérations ont été rétablies au moins en partie, en une semaine alors que le régime gras était maintenu. A noter que l'intolérance au glucose à J8, même si elle était moins importante qu'à J1, est restée malgré tout présente.

La mesure du quotient respiratoire a permis d'obtenir une information sur la nature des substrats énergétiques utilisés. Il s'agit d'une méthode basée sur la mesure d'O<sub>2</sub> consommée et de CO<sub>2</sub> produite. En condition normale, les souris utilisent majoritairement les glucides. Cela se traduit par un quotient respiratoire proche de 1. Un quotient respiratoire proche de 0,7 traduit une utilisation préférentielle des lipides comme source énergétique. Lorsque l'alimentation des souris STD a été changée par un régime HFD, elles ont utilisé très rapidement les lipides dès 24h d'exposition (STD :  $0,86 \pm 0,04$  ; HFD D1 :  $0,77 \pm 0,02$ ) (**Figure 22D**).

Après 3 jours seulement de régime HFD, on a observé une augmentation de la masse grasse chez les souris, notamment du tissu adipeux blanc sous cutané et viscéral. Cette augmentation était plus importante après 8 jours de régime (**Figure 22E**).

L'ensemble de ces données montre que les souris adaptent leur comportement alimentaire mais aussi leur métabolisme face au changement de conditions nutritionnelles. Il s'agit d'une réponse homéostatique face à l'exposition au régime HFD.



**Figure 22 : Effet du régime HFD à court terme**

(A) Prise énergétique (B) Concentration des triglycérides plasmatiques et d'acides gras libres (C) Test de tolérance au glucose et sécrétion d'insuline gluco-induite (D) Quotient respiratoire (ratio) (E) Adiposité mesurée par echoMRI et pourcentage de tissu adipeux blanc sous-cutané et viscéral en fonction du poids total. Toutes les mesures ont été faites chez les souris STD vs 1, 3 ou 8 jours sous régime HFD. (A), (B), (C), (D) \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0, 01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  ANOVA one way et test de Dunnett post hoc vs STD. (E) \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0, 01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  Test t Mann & Withney vs STD

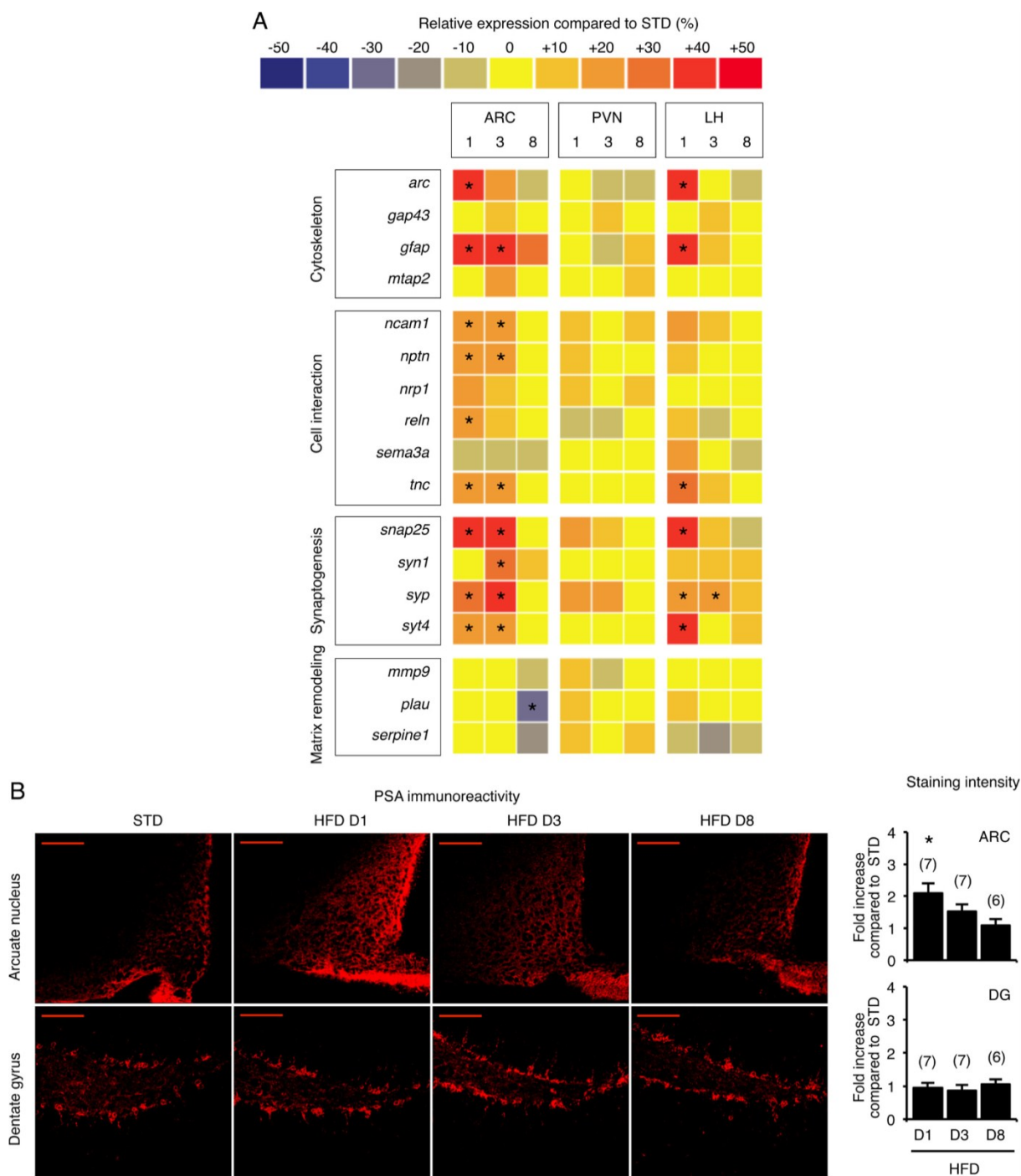
### 3. Signature moléculaire de plasticité hypothalamique synaptique induite par le régime HFD

Une réponse adaptative de l'organisme due à des stimuli extérieurs maintenus ou à des modifications physiologiques durables peut être liée à des réarrangements tissulaires cérébraux <sup>194</sup>. Ces modifications sont basées sur une régulation coordonnée de l'expression de mRNA <sup>195</sup> et de la synthèse protéique <sup>196</sup>. Pour déterminer si l'exposition au régime HFD induit des phénomènes de plasticité synaptique, nous avons mesuré l'expression de plusieurs facteurs permissifs de plasticité cérébrale dans différentes zones hypothalamiques par microdissection (ARC, PVN, LH), utilisé comme marqueurs moléculaires. Ceci a été fait avec des « low density arrays » (cartes microfluidiques Taqman) permettant de faire un criblage de plusieurs gènes en utilisant des échantillons contenant peu de matériel mRNA. Ce criblage a été réalisé sur des souris nourries en régime STD ou après 1, 3 et 8 jours de régime HFD.

Des gènes marqueurs de différents processus de plasticité ont été choisis : des gènes impliqués dans la dynamique du cytosquelette, les interactions cellulaires, la synaptogenèse et le remodelage matriciel. Une variation dans l'expression de ces gènes traduit indirectement des événements de plasticité au niveau hypothalamique.

Comparé avec les souris contrôle (en régime standard), il y a eu une augmentation de 10 à 40 % de l'expression des marqueurs de plasticité choisis chez des souris nourries en HFD pendant 1 et 3 jours. Ces augmentations ont été rapides et transitoires et majoritairement localisées dans le noyau arqué. Il y a eu une surexpression de *ncam1*, *nrp1*, *tnc*, *snap25*, *syp* et *syt4* suggérant que l'exposition au HFD a modifié les interactions cellulaires et a induit de la synaptogenèse. A l'inverse, l'expression de *gap43*, *serpine1*, *mmp9*, et *plau* n'a pas été modifiée, suggérant l'absence d'induction de bourgeonnements axonaux ou de projection axonale. L'ensemble de ces résultats est présenté sous forme de tableau dans la **Figure 23A**.

Comme cité dans l'introduction, les changements dans les interactions cellulaires peuvent être modulés par l'acide polysialique (PSA). Ce marqueur de plasticité synaptique et régulateur d'interaction cellulaire est en plus facilement manipulable dans l'optique d'étude fonctionnelle entre remodelage synaptique et phénotype. Nous avons donc examiné l'expression de PSA par immunohistochimie dans le cerveau des souris exposées au régime HFD. L'intensité du signal PSA a été calculée par densitométrie après acquisition d'images en microscopie laser confocale. Il y a eu une augmentation transitoire de l'expression de PSA dès la première journée d'exposition au HFD dans l'hypothalamus. Aucune variation n'a été détectée dans le gyrus denté de l'hippocampe ; aire de référence en ce qui concerne les capacités de plasticité synaptique du cerveau, influencée par les conditions environnementales, et exprimant PSA de manière constitutive (**Figure 23B**).



**Figure 23 : L'hypothalamus des souris nourries en HFD présente des signes de plasticité moléculaires**

(A) Quantification simultanée de l'expression de gènes de biopsies hypothalamiques par carte microfluidique Taqman. (B) Marquage immunohistochimique représentatif de PSA dans le noyau arqué et le gyrus denté des souris standard et HFD. Barre d'échelle, 100  $\mu$ m ; D, Jour ; ARC, noyau arqué ; PVN, noyau paraventriculaire ; LH, aire hypothalamique latérale ; DG, gyrus denté. Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  ANOVA one way et test de Bonferroni post hoc vs STD

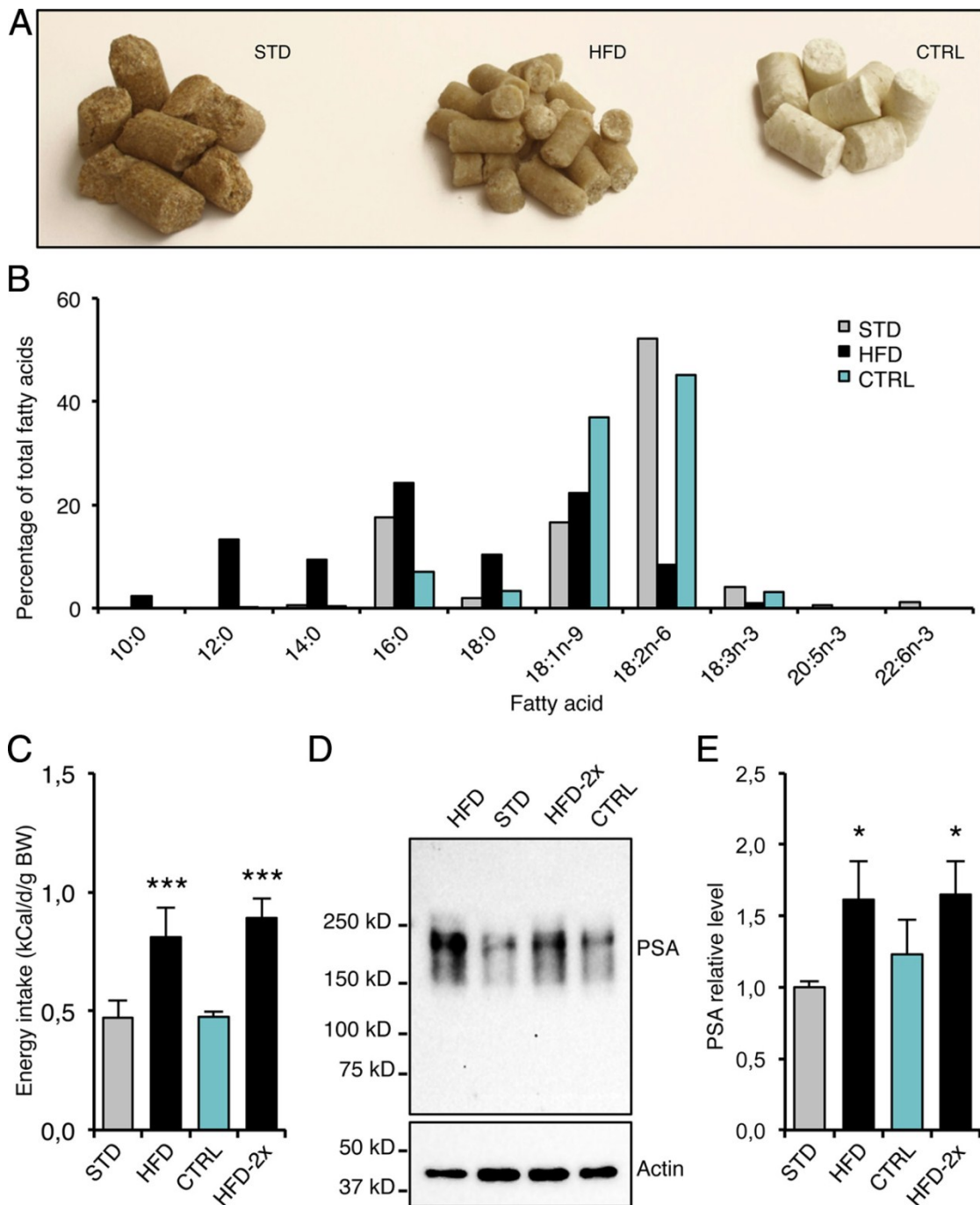
#### 4. La nouveauté n'est pas suffisante pour induire PSA dans l'hypothalamus

La signature moléculaire de plasticité détectée dans l'hypothalamus après l'introduction du régime HFD peut être due simplement au changement de composition de nourriture et/ou au stress lié à une nouvelle nourriture (effet de la nouveauté). Nous avons testé si le simple changement de régime était suffisant pour stimuler l'expression de PSA dans le noyau arqué. Le régime standard a été remplacé par un régime isocalorique isolipidique contrôle (CTRL) de composition similaire mais d'aspect, de texture et probablement de flaveur différentes (**Figure 24A, B**). L'introduction du régime CTRL n'a pas modifié la prise énergétique des souris (**Figure 24C**). Après une journée d'exposition avec le régime standard, HFD ou CTRL, les niveaux de PSA du noyau arqué ont été mesurés par Western Blot (**Figure 24D**). Comme montré précédemment, le régime HFD a provoqué une surexpression de PSA dans le noyau arqué (**Figure 24E**). A l'opposé, le régime CTRL n'a pas modifié le taux de PSA comparé au régime standard.

Après une première exposition d'une journée au régime HFD, les souris ont été renourries avec le régime standard pendant 6 jours. Une deuxième exposition au régime HFD d'une journée a été effectuée et le niveau de PSA dans le noyau arqué a été mesuré. La réexposition au régime HFD a augmenté la prise énergétique (**Figure 24C**), ainsi que le niveau de PSA dans les biopsies de noyau arqué.

L'ensemble de ces données indique que le changement d'alimentation seul n'est pas suffisant pour induire une augmentation du niveau de PSA dans l'hypothalamus





**Figure 24 La nouveauté n'est pas suffisante pour augmenter le niveau de PSA dans l'hypothalamus**

(A) Photographie des régimes STD, HFD et CTRL. (B) Composition en acides gras des différents régimes, déterminés par chromatographie gazeuse. (C) Prise énergétique après une journée d'exposition au régime STD, CTRL ou HFD. HFD-2X réfère à une deuxième journée d'exposition au régime HFD avec une latence de 6 jours en régime STD. (D) Image représentative de Western Blot dirigé contre PSA dans des extraits protéiques de biopsies de noyau arqué après exposition au régime STD, CTRL ou HFD. (E) Quantification des niveaux de PSA du Western Blot (D) et normalisé par rapport au STD. Moyenne  $\pm$  SEM de  $n = 9$  (STD), 5 (HFD), 7 (CTRL) et 7 (HFD-2x). (C) et (E) \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0, 01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  Test t Mann & Withney vs STD

## 5. L'exposition au régime HFD pendant 3 jours induit des reconnexions synaptiques des neurones POMC

Les expériences précédentes ont montré que les souris adaptaient leur comportement alimentaire face aux changements de conditions nutritionnelles. De plus, le criblage moléculaire a indiqué l'induction possible de remodelage synaptique dans ces conditions et a permis de définir une fenêtre spatio-temporelle d'intérêt dans laquelle pourrait se produire ces modifications d'interactions cellulaires : un remodelage synaptique pourrait donc se produire dans le noyau arqué durant les 3 premiers jours après introduction du HFD. Pour objectiver l'existence de ces phénomènes de plasticité synaptique, nous avons enregistré l'activité électrique de neurones du noyau arqué chez des souris soumises à un régime HFD. Nous avons étudié les neurones POMC car le système à mélanocortine a déjà démontré ses capacités de plasticité synaptique en fonction de l'état énergétique de l'organisme. Pour cela, nous avons utilisé des souris exprimant la GFP dans les neurones POMC, ce qui permet l'identification de ces cellules dans le parenchyme cérébral.

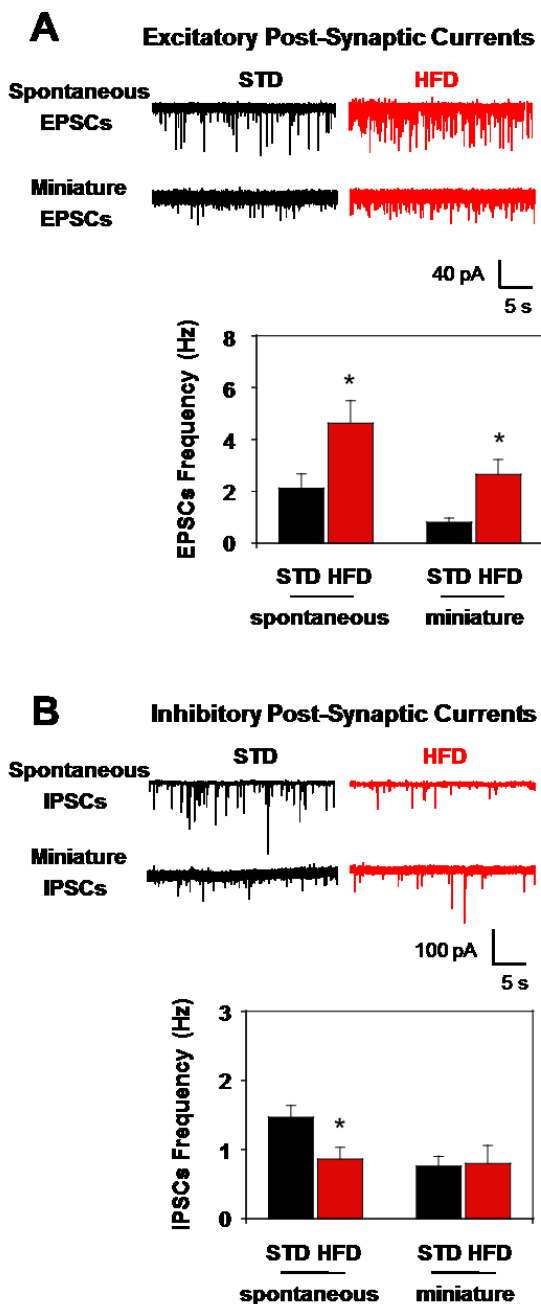
Des souris POMC-GFP ont donc été nourries pendant 3 jours en régime standard ou en régime HFD. Puis les courants spontanés et miniatures post-synaptiques (sPSCs et mPSCs) générés dans les neurones POMC du noyau arqué ont été enregistrés par voltage clamp en condition cellule entière, sur des tranches de cerveau maintenues *ex vivo*.

Nous avons trouvé une augmentation de la fréquence des courants excitateurs spontanés post-synaptiques (sEPSCs) sur les neurones POMC des souris nourries avec le régime HFD (STD :  $2,12 \pm 0,55$  Hz ; HFD :  $4,63 \pm 0,87$  Hz) (**Figure 25A**). A l'inverse, la fréquence des courants inhibiteurs spontanés post-synaptiques (sIPSCs) était diminuée chez les souris nourries avec le régime HFD (STD :  $1,47 \pm 0,17$  Hz ; HFD :  $0,86 \pm 0,17$  Hz) (**Figure 25B**).

Nous avons aussi quantifié la fréquence des mPSCs apparaissant dans les neurones POMC même en l'absence d'activité pré-synaptique, et ce phénomène aléatoire est en relation étroite avec la quantité d'afférences innervant les neurones étudiés. Cette mesure a donc été faite en présence de TTX afin de bloquer tous les potentiels d'action, et d'éviter l'influence de l'activité électrique pré-synaptique dans le comptage. Finalement, la quantification de la fréquence des mPSCs donne une estimation relative du nombre de synapses sur le neurone postsynaptique (en l'occurrence, le neurone POMC). La fréquence des courants miniatures excitateurs (mEPSCs) a été augmentée avec l'exposition au régime gras tandis que la fréquence des inhibiteurs (mIPSCs) n'a pas été changée (mEPSCs : STD :  $0,81 \pm 0,16$  Hz vs HFD :  $2,66 \pm 0,57$  Hz ; mIPSCs : STD :  $0,76 \pm 0,14$  Hz vs HFD :  $0,80 \pm 0,26$  Hz) (**Figure 25A, B**).

Concernant l'amplitude des sPSCs et mPSCs après l'exposition HFD, aucune différence significative n'a été trouvée (sPSCs : STD :  $18,25 \pm 1,49$  vs HFD  $17,32 \pm 3,77$  pA ; mPSCs : STD :  $11,19 \pm 0,87$  vs HFD  $11,54 \pm 0,72$  pA)

L'ensemble de ces données suggère qu'une réorganisation des synapses s'est produite sur les neurones POMC du noyau arqué, visible 3 jours après l'introduction du régime HFD, augmentant les afférences excitatrices sur ces cellules. Un tonus anorexigène plus important provenant des neurones POMC est cohérent avec la réduction progressive de la prise énergétique des souris après l'introduction du régime HFD.



**Figure 25 :** Les neurones POMC du noyau arqué des souris nourries en HFD sont reconnectés 3 jours après le début de l'exposition

Courants postsynaptiques excitateurs (A) et inhibiteurs (B) des neurones POMC-GFP de souris nourries en régime STD ou HFD pendant 3 jours enregistrés en voltage clamp sur cellule entière (potentiel de repos à -60 mV). Les traces représentatives (30 s) sont montrées dans chaque panel. La fréquence des courants spontanés et miniatures ont été calculés avant et après ajout de TTX, respectivement. Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  Test Student vs STD

## 6. PSA est requis pour les reconnections synaptiques des POMC

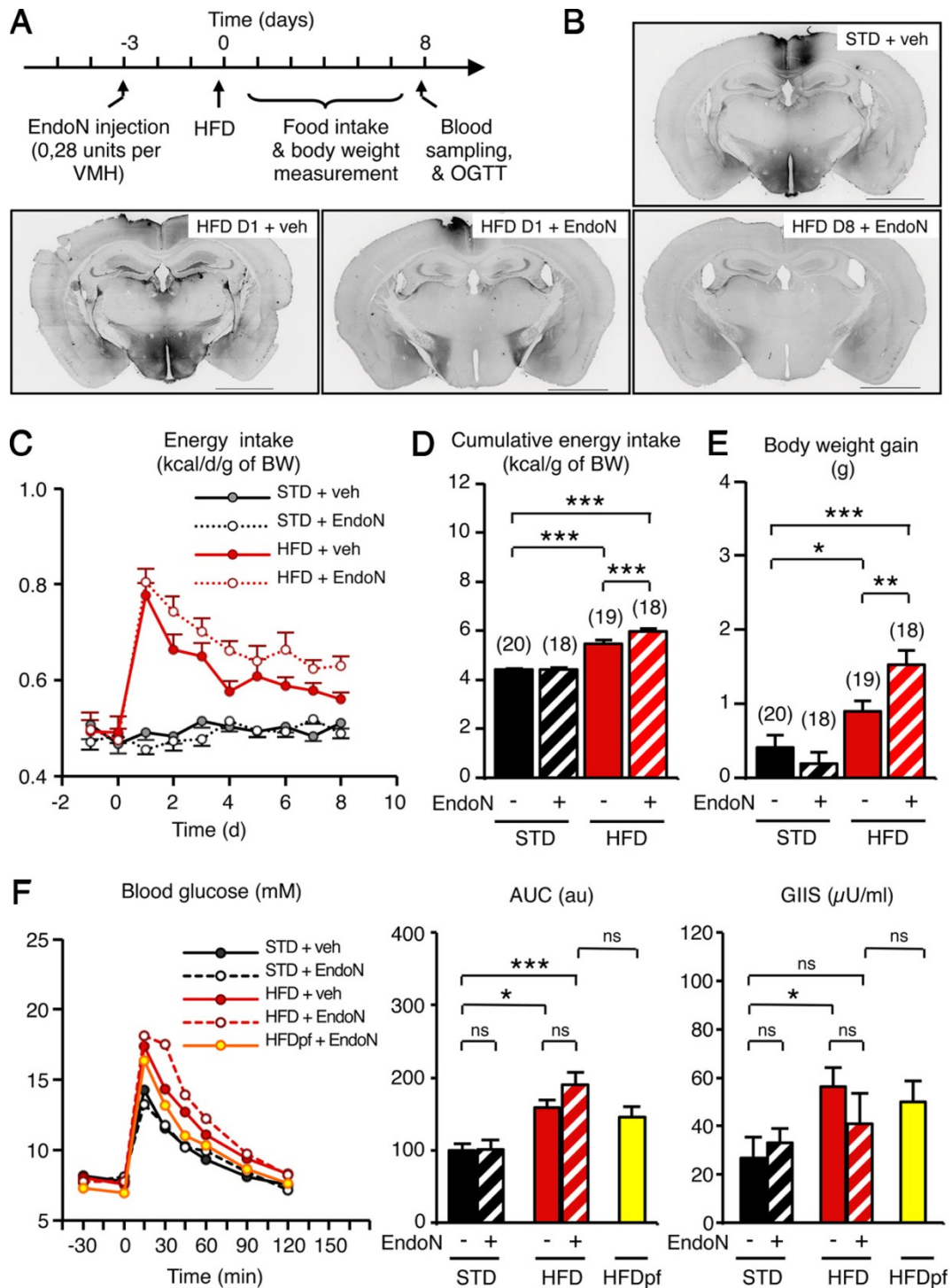
Nous avons examiné par la suite le rôle de PSA dans les phénomènes de plasticité induite par l'exposition au régime HFD. Pour cela, nous avons utilisé l'enzyme endoneuraminidase N (Endo N). Cette enzyme clive spécialement PSA de PSA-NCAM <sup>197</sup>, ainsi l'on peut inhiber les processus de plasticité synaptique PSA-NCAM dépendant. L'EndoN a été injectée bilatéralement dans le VMH par stéréotaxie. Trois jours après l'opération, les souris ont été exposées au régime HFD. Par immunohistochimie, nous avons observé que le traitement à l'Endo N a retiré complètement le signal de PSA après 1 et 8 jours d'exposition au régime HFD (**Figure 26B**).

De plus, l'injection d'EndoN a inhibé totalement l'augmentation de fréquence des sEPSCs et mEPSCs sur les neurones POMC précédemment observés sur des souris non injectées nourries 3 jours en HFD (sEPSCs :  $1,49 \pm 0,51$  Hz ; mEPSCs :  $0,65 \pm 0,12$  Hz ;  $p < 0,05$  Test de Student vs STD). Ce qui suggère que PSA était requis pour la plasticité synaptique des neurones POMC induite par le régime HFD.

## 7. PSA est requis pour établir la réponse homéostatique face au HFD

Pour savoir si les événements de plasticité synaptique dans l'hypothalamus induits par le régime HFD étaient impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, nous avons quantifié la prise énergétique des souris traitées à l'EndoN. Les souris recevant soit du véhicule soit de l'EndoN ont eu une prise énergétique relativement constante en régime STD ( $\approx 0,50$  kcal/j/g ; **Figure 26C**). Comme montré précédemment la prise énergétique a été augmentée chez les souris nourries en HFD dès le premier jour, et ce quel que soit le traitement intracérébral (Endo N ou véhicule), atteignant approximativement  $0,80$  kcal/j/g. Cependant, les jours suivants, les souris recevant de l'EndoN ont toujours eu une prise énergétique supérieure et l'énergie consommée cumulée sur une semaine a été plus importante (+ 9,2%) dans ce groupe par rapport aux souris traitées avec le véhicule (**Figure 26D**). De plus, les souris HFD + EndoN ont un gain de poids plus important après une semaine (HFD + EndoN :  $1,52 \pm 0,19$  g ; HFD + véhicule :  $0,90 \pm 0,14$  g) (**Figure 26E**).

Le traitement à l'EndoN, en revanche, n'a pas modifié la tolérance au glucose des animaux (**Figure 26F**). Comme montré précédemment, la tolérance au glucose n'a pas été totalement récupérée après 8 jours de HFD (**Figure 22C**). Le traitement à l'EndoN n'a pas modifié la tolérance au glucose des animaux nourris en régime STD. Chez les souris nourries en HFD, le traitement à l'EndoN n'a produit qu'une augmentation mineure, mais non significative, de l'intolérance au glucose. Cet effet était probablement dû à la prise énergétique élevée en HFD des animaux traités à l'EndoN, puisque des animaux traités à l'EndoN et restreints en prise calorique (*pair-fed* sur le groupe HFD vehicule) ont présenté une tolérance similaire.

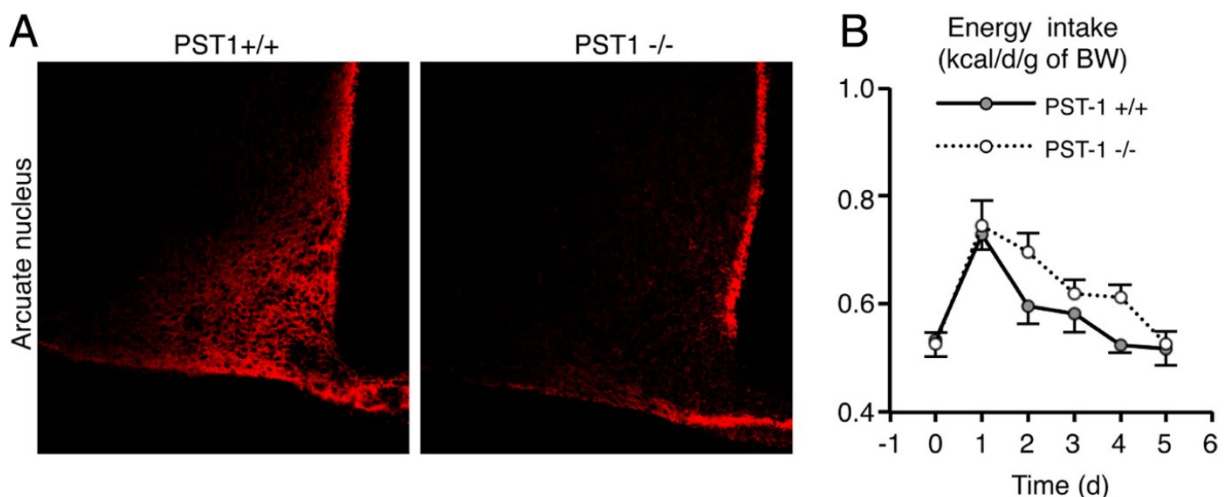


**Figure 26 : Le retrait de PSA dans l'hypothalamus altère le contrôle homéostatique de la prise énergétique après l'introduction de HFD**

(A) Protocole expérimental d'enlèvement de PSA dans l'hypothalamus et suivi métabolique des animaux. (B) Images représentatives d'immunohistochimie anti-PSA sur des sections de cerveaux montrant l'enlèvement de PSA. Barre d'échelle, 2 mm. (C) Prise énergétique. (D) Prise énergétique cumulée. (E) Gain de poids. (F) Tolérance au glucose et sécrétion d'insuline gluco-induite. Souris nourries en STD ou HFD, traitées avec l'EndoN ou le véhicule dans l'hypothalamus. D, jour ; veh, véhicule ; HFDpf, High Fat Diet pair fed ; AUC, aire sous la courbe ; GIIS, sécrétion d'insuline gluco-induite. Moyenne  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  ANOVA one way et test de Newman-Keuls post hoc.

Afin de poursuivre l'évaluation du rôle de PSA dans la régulation de la prise énergétique, nous avons comparé la réponse physiologique au HFD chez des souris wild-type et des souris PST-1 KO (ou *St8sia4*<sup>-/-</sup>). Ces souris sont dépourvues de l'enzyme PST-1, la polysialyltransférase responsable de l'addition de PSA sur NCAM <sup>182</sup>. Aucune augmentation de l'immunoréactivité anti-PSA n'a été détectée par immunohistochimie sur les souris KO après introduction du HFD (**Figure 27A**). Chez les souris wild-type et KO, la prise énergétique quotidienne en régime standard a été la même ( $0,53 \pm 0,03$  kcal/j/g) (**Figure 27B**). De plus, la prise énergétique des deux lignées a augmenté de manière similaire après une journée de HFD (wild-type :  $0,73 \pm 0,03$  ; KO :  $0,75 \pm 0,05$  kcal/j/g). Cependant, le retour à un niveau d'énergie consommée basal a pris environ une journée de plus chez les mutants que chez les wild-type. En conséquence, le cumul d'énergie consommée a été augmenté de 8,6% chez les souris KO nourries pendant 5 jours avec du HFD comparé au wild-type (wild-type :  $2,95 \pm 0,09$  kcal/g, KO :  $3,20 \pm 0,07$  kcal/g ;  $p < 0,05$  au test de Student). Le gain de poids en HFD entre les groupes n'a pas été significativement différent après 5 jours de régime HFD (wild-type :  $0,38 \pm 0,22$  g ; KO :  $0,69 \pm 0,14$  g), ceci était certainement dû à une exposition sous HFD trop courte.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'enzyme PST-1 joue un rôle dans l'adaptation comportementale face à l'exposition au HFD.



**Figure 27 : Une déficience de l'enzyme PST-1 altère le contrôle homéostatique de la prise énergétique après l'introduction du régime HFD**

(A) Image représentative d'immunohistochimie contre PSA dans le noyau arcué de souris PST-1<sup>+/+</sup> (wild-type) et PST-1<sup>-/-</sup> nourries en régime HFD pendant une journée. (B) Prise énergétique des souris PST-1<sup>+/+</sup> et PST-1<sup>-/-</sup> nourries en régime HFD pendant 5 jours. Les groupes ont été comparés en utilisant le test de Student.

## 8. Discussion

La plasticité hypothalamique peut être définie comme un processus adaptatif ayant pour but d'intégrer les changements dans les conditions environnementales et les états physiologiques <sup>198 199 200</sup>. Ici, nous avons montré qu'un changement d'alimentation est une autre situation aboutissant à des restructurations des réseaux neuronaux hypothalamiques. En effet, l'ingestion de graisses a augmenté la fréquence des courants miniatures excitateurs post-synaptiques dans les neurones POMC, suggérant fortement une réorganisation synaptique sur ces cellules <sup>126</sup>. Dans cette étude, nous n'avons pas trouvé de lien causal entre ces données électrophysiologiques et les modifications du comportement alimentaire après l'introduction du régime HFD. Pour ce faire, cela exigerait une inhibition inductible et ciblant la synaptogenèse PSA-dépendante dans les neurones POMC. Cependant, (1) la surexpression de PSA précède les changements comportementaux ; (2) les événements de plasticité synaptique sur les POMC et la restauration progressive de la prise énergétique sont tous les deux altérés par l'EndoN ; et (3) les neurones anorexigéniques POMC sont connus pour être impliqués dans les réponses homéostatiques adaptatives <sup>26</sup>. En conséquence, le recablage PSA dépendant des neurones POMC induit par le régime HFD peut expliquer la réponse homéostatique suite à l'ingestion de graisses.

Bien que le rôle du système à mélanocortine dans l'adaptation de la prise alimentaire en réponse à différentes variations environnementales a déjà été décrit <sup>81 201</sup>, la réorganisation synaptique des neurones POMC du noyau arqué peut être maintenant considérée comme un processus physiologique clé. Néanmoins, nous ne pouvons pas non plus exclure un effet synergique dû à des reconnections synaptiques des neurones antagonistes orexigènes AgRP/NPY, par exemple. A cela peut s'ajouter d'autres défenses contre les désordres métaboliques impliquant des mécanismes non-synaptiques, tels que la surexpression de POMC induite par le HFD <sup>202</sup>. Le contrôle homéostatique de la balance énergétique est sans doute consolidé par une combinaison de différents mécanismes associés aux processus de plasticités, incluant des processus pharmacologiques rapides et des changements morphologiques plus lents. Malheureusement, tous ces mécanismes cérébraux de régulation sont manifestement dépassés lorsque la pression calorique est maintenue.

Il est intéressant de noter que le criblage moléculaire des événements de plasticité a suggéré des modifications d'interactions cellulaires brèves et localisées au sein du noyau arqué. Bien que le système à mélanocortine se prolonge dans d'autres aires hypothalamiques et extrahypothalamiques, la surexpression de marqueurs de plasticité semble donc restreinte au sein du noyau arqué. Ainsi, les cibles des neurones POMC et AgRP comme les neurones du PVN exprimant MC4R, cruciaux pour l'établissement de la réponse homéostatique suite à une



alimentation grasse <sup>81</sup>, pourraient relayer l'augmentation du tonus anorexigénique dans le noyau arqué sans remodelage synaptique particulier du noyau paraventriculaire.

Dans cette étude, nous rapportons un contrôle du poids PSA-dépendant. L'effet obésogène de l'EndoN peut être lié à une altération du contrôle de la prise alimentaire, mais un effet sur les dépenses énergétiques n'est pas exclu. En effet, les neurones POMC contrôlent aussi la thermogenèse, qui élimine les surplus de calorie durant les périodes de balance énergétique positive (phase post-prandiale, par exemple). D'un autre côté, la restauration de la tolérance au glucose n'est pas affectée par le traitement à l'EndoN, suggérant que le remodelage synaptique PSA-dépendant n'est pas crucial pour l'homéostasie glucidique. Ainsi la plasticité hypothalamique PSA-dépendante ne semble agir que sur des fonctions physiologiques spécifiques comme le contrôle de la prise alimentaire. Ces résultats sont surprenants étant donné le large spectre d'action du système à mélanocortine <sup>204</sup>.

Il semble que le remodelage synaptique sur les neurones POMC favorise la réponse homéostatique induite par l'alimentation hypercalorique, avec la réduction progressive de la prise alimentaire. Ceci se déroule en moins d'une semaine. Or, il a été montré que le changement des connexions neuronales hypothalamiques persiste plusieurs mois alors même lorsque le régime HFD est maintenu <sup>205</sup>. Cependant, dans un cas le poids est maintenu, dans l'autre l'obésité apparaît. Les différentes fins phénotypiques selon les expositions courtes ou longues au régime HFD peuvent être liées à une résistance à la leptine observées chez des animaux devenus obèses par le régime alimentaire, situation dans laquelle les neurones POMC deviennent insensibles à la leptine, et donc moins actifs en dépit d'un recablage approprié <sup>46 206 207</sup>.

Nous avons identifié PSA comme acteur moléculaire nécessaire pour déclencher la plasticité synaptique induite par l'alimentation sur les neurones POMC. Il faut se rappeler que la polysialylation est un phénomène ubiquitaire dans le système nerveux, et qui est impliqué dans de nombreux processus de plasticité hypothalamique <sup>208</sup>. Dès lors, PSA n'est probablement pas un facteur spécifique de la plasticité induite par les conditions nutritionnelles, mais serait plutôt un facteur permissif commun qui pourrait être recruté dans d'autres phénomènes de plasticité liés à l'état métabolique, déjà décrits ou non <sup>126 134 142 131</sup>. De plus selon les analyses transcriptomiques, d'autres régulateurs des interactions cellulaires et de la synaptogenèse semblent aussi être impliqués dans le phénomène de plasticité hypothalamique induite par le régime gras. D'ailleurs, les protéines syndecan-3 et synaptogamin-4, qui respectivement régulent les interactions cellulaires et la synaptogenèse sont des cibles pharmacologiques prometteuses dans le traitement de l'obésité et des pathologies associées <sup>209 210</sup>.

Les médiateurs biologiques qui déclenchent la plasticité hypothalamique induite par le régime hyperlipidique n'ont pas été recherchés dans cette étude. Les médiateurs hormonaux agissant sur le métabolisme et ayant des propriétés neurotrophiques, tels que la leptine, la

ghréline ou l'insuline peuvent être aisément suspectés <sup>126 133 142 211 212 213</sup>. La leptine est un candidat idéal. En effet, le taux de leptine sanguin augmente rapidement après 3 jours de régime HFD <sup>214</sup>. Ceci est cohérent avec l'augmentation du tissu adipeux trouvée dans notre modèle. De plus, la leptine peut promouvoir la réorganisation synaptique des neurones POMC pour inhiber la prise alimentaire en plus de son action directe sur l'activité des neurones POMC. La contribution des nutriments eux même, ou de leurs métabolites, dans les processus de plasticité doit être elle aussi considérée. Par exemple, les dérivés endocannabinoïdes des graisses alimentaires sont des composants majeurs de l'axe intestin-cerveau capable d'engendrer des modifications synaptiques <sup>215 216 217</sup>. En revanche les médiateurs du stress qui peuvent aussi stimuler une plasticité synaptique, ne semblent pas être impliqués dans notre modèle. En effet, le changement d'alimentation (condition potentiellement anxiogène), ne produit pas toujours de surexpression de PSA, alors que la réexposition au régime HFD (condition devenue familière et potentiellement non anxiogène) déclenche systématiquement une surexpression de PSA.

Puisque la plasticité hypothalamique est un phénomène conservé à travers les espèces <sup>126 200 218 219 220</sup>, la plasticité hypothalamique induite par l'alimentation observée ici chez la souris pourrait être retrouvée dans l'espèce humaine. D'ailleurs, une haploinsuffisance pour le gène codant le BDNF, facteur permissif typique de la plasticité cérébrale, est associée avec le développement d'une obésité infantile <sup>221</sup>. De plus, deux études génomiques réalisées sur de larges cohortes de sujets humains ont rapporté une forte association entre un BMI élevé et un polymorphisme de loci proches de gènes exprimés dans le cerveau et impliqués dans le développement et/ou l'activité cérébrale <sup>222 223</sup>. De ce fait, le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique pourrait également impliquer des processus de plasticité synaptique chez l'Homme.

En conclusion, cette étude apporte des précisions quant aux mécanismes moléculaires intervenant dans le contrôle de la prise alimentaire. Nous avons en effet montré (i) que le système à mélanocortine s'adapte très rapidement aux nouvelles conditions nutritionnelles grâce à une plasticité synaptique, et (ii) que la plasticité synaptique hypothalamique induite par le régime hypercalorique contrôle la prise alimentaire. L'incapacité à déclencher cette plasticité adaptative en fonction de l'état métabolique pourrait être un facteur supplémentaire impliqué dans l'étiologie de l'obésité et des maladies métaboliques.

## 9. Article 1

Ces travaux ont été publiés dans le journal suivant :

Benani A, Hryhorczuk C, Gouazé A, Fioramonti X, **Brenachot X**, Guissard C, Krezymon A, Duparc T, Colom A, Nédélec E, Rigault C, Lemoine A, Gascuel J, Gerardy-Schahn R, Valet P, Knauf C, Lorsignol A, Pénicaud L. Food Intake Adaptation to Dietary Fat Involves PSA-Dependent Rewiring of the Arcuate Melanocortin System in Mice. *J. Neurosci.* 32, 11970–9 (2012).

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

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

<sup>1</sup>Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Unité Mixte de Recherche 6265-CNRS, 1324-INRA, Université de Bourgogne, 21000 Dijon, France, <sup>2</sup>STROMAlab; Unité Mixte de Recherche CNRS-Université Paul Sabatier 5273, EFS, U1031 INSERM, BP 84225 31432 Toulouse Cedex 4, France, <sup>3</sup>Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, Unité de Recherche 1048 INSERM, F-31432 Toulouse Cedex 4, France, and <sup>4</sup>Institute for Cellular Chemistry, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany

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

## Introduction

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

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

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

## Materials and Methods

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

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

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

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

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

DOI:10.1523/JNEUROSCI.0624-12.2012

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

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

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

performed with 2-month-old male C57BL/6JOLA mice from Harlan Laboratories. The mice were housed individually, and fed a standard pelletized commercial chow diet (A04; Safe) for 1 week after arrival. After acclimatization, they were fed either the same standard diet (STD) or a customized highly palatable high-fat diet (Safe). The characteristics of the diets are given in Table 1. The change of diet was made at 9:00 A.M. and both the standard and high-fat diet were renewed daily at 9:00 A.M. The mice had *ad libitum* access to food and water. Food consumption and body weight (BW) were measured daily. For metabolic studies by indirect calorimetry, the mice were housed in individual air-tight cages and gas exchanges were monitored using an air analyzer system (Oxylet; BIOSEB). For tissue collection, the mice were killed between 9:30 A.M. and 12:00 P.M. Some experiments used 8- to 10-week-old male transgenic homozygous knockout PST-1 mice. These mice had been generated by using targeted mutations in the ST8SiaIV gene (Eckhardt et al., 2000).

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

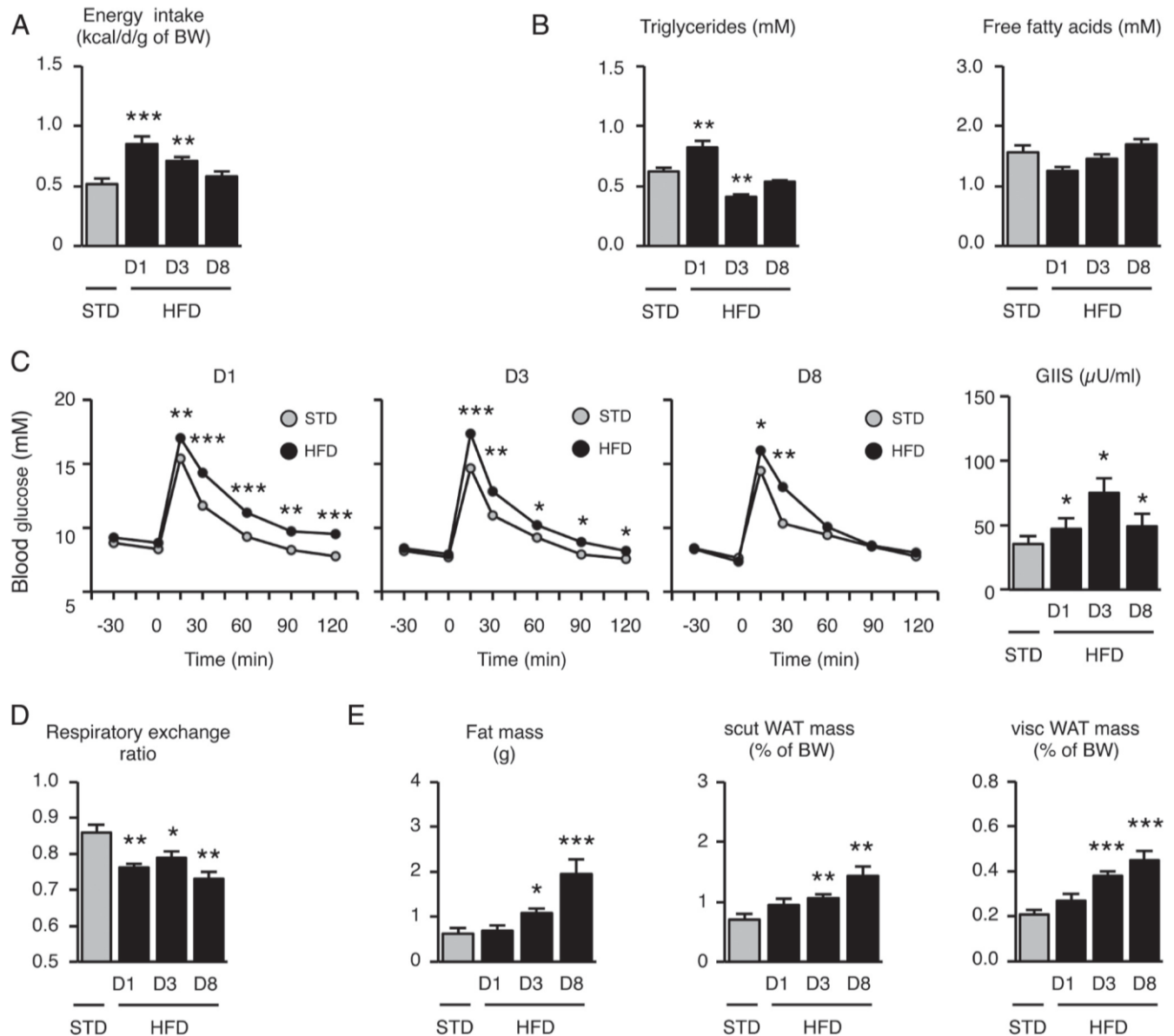
**Hypothalamus dissection for qPCR analysis.** Once the mice had been killed, their brains were quickly removed and immersed for 10 min in 2 ml of ice-cold preservative medium (200 mM sucrose, 28 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.5 mM KCl, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM L-ascorbate, and 8 mM D-glucose, pH 7.4) complemented with 10% RNAlater (Ambion). After incubation, the brains were mounted on a specimen plate using cyanoacrylate adhesive. The brains were then sliced using a vibratory microtome in a bath containing the chilled preservative medium with RNAlater. Five 500- $\mu$ m-thick serial coronal sections per brain were selected with the assistance of a mouse brain atlas, approximately from  $-3.0$  to  $-0.5$  to bregma. The slices were individually placed onto dishes containing 500  $\mu$ l of RNAlater. For the microdissection of the hypothalamus nuclei, each slice was placed on a 6% agarose bloc, covered with 50  $\mu$ l of RNAlater, and dissected under stereomicroscope and cold-light illumination, using a scalpel and sharp forceps. The arcuate nucleus (ARC), lateral hypothalamus area, and paraventricular nucleus were collected from two or three specific slices of the five, depending on their anteroposterior anatomical position. During the dissection, the harvested samples were placed on ice in 2 ml centrifuge tubes containing 50  $\mu$ l of RNAlater. After removal of the RNAlater, the samples were finally stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**RNA extraction and processing.** The tissues were lysed and homogenized in 300  $\mu$ l of lysis buffer (RLT Buffer, Qiagen) using the TissueLysers system (Qiagen) and 5 mm stainless steel beads (Qiagen). Total RNA was isolated on spin columns with silica-based membranes (RNeasy Mini Kit, Qiagen), following the manufacturer's instructions. DNA digestion was done directly on the columns. RNA was eluted with 30  $\mu$ l of H<sub>2</sub>O. Aliquots of each extract (1  $\mu$ l) were checked for RNA concentration, purity and integrity with the Experion electrophoresis system (Bio-Rad) and the Experion RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad). Total RNAs were then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . A small amount of purified RNAs (0.2  $\mu$ g) was reverse-transcribed in 20  $\mu$ l of mixture using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Qiagen), as indicated by the manufacturer. Synthesized cDNA were then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

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

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

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



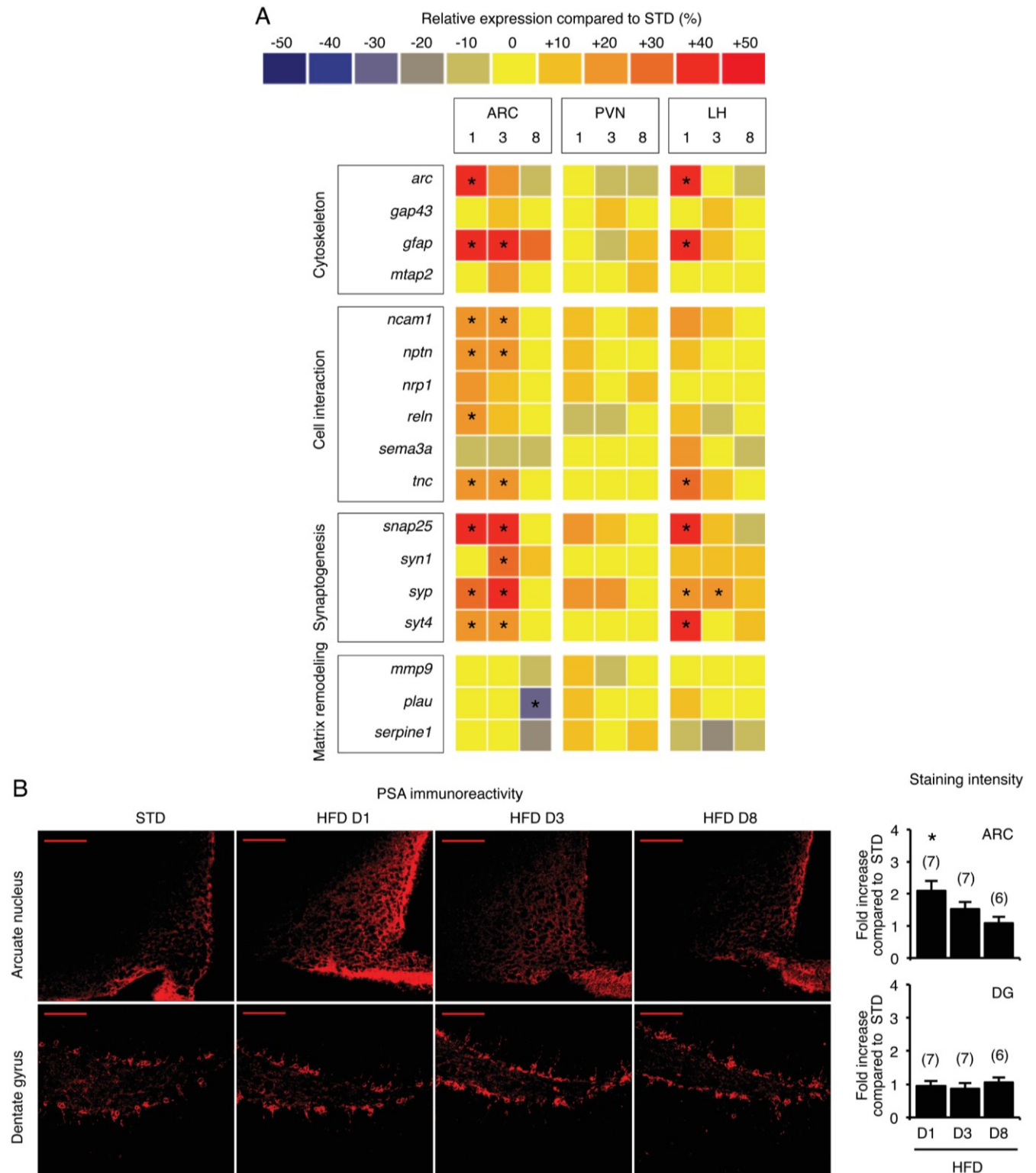
**Figure 1.** Energy intake and peripheral metabolism are transiently altered in mice fed HFD for 1 week. **A–E**, Energy intake (**A**), plasma triglycerides and free fatty acid levels (**B**), glucose tolerance with glucose-induced insulin secretion (GIIS) (**C**), respiratory exchange ratio (**D**),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

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

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

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

**Electrophysiological recordings.** Brain slices (300  $\mu$ m) were prepared from adult POMC-GFP (pro-opiomelanocortin-green fluorescent protein) mice (6–8 weeks old). The slices were incubated at room temperature in oxygenated extracellular medium containing (in mM): 118 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, 5 D-glucose, 15 sucrose (300–



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

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

fluorescence and specific filter sets (AHF analysentechnik AG). For EPSC recordings, borosilicate pipettes (4–6 M $\Omega$ ; GC150F-10, Phymep) were filled with a potassium-gluconate-based solution containing (in mM): 155 K-gluconate, 0.1 EGTA, 1 CaCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 5 KCl, 10 KOH, 4 Mg-ATP, 0.25 Na-GTP (290 mOsm, pH 7.3). The extracellular medium was supplemented

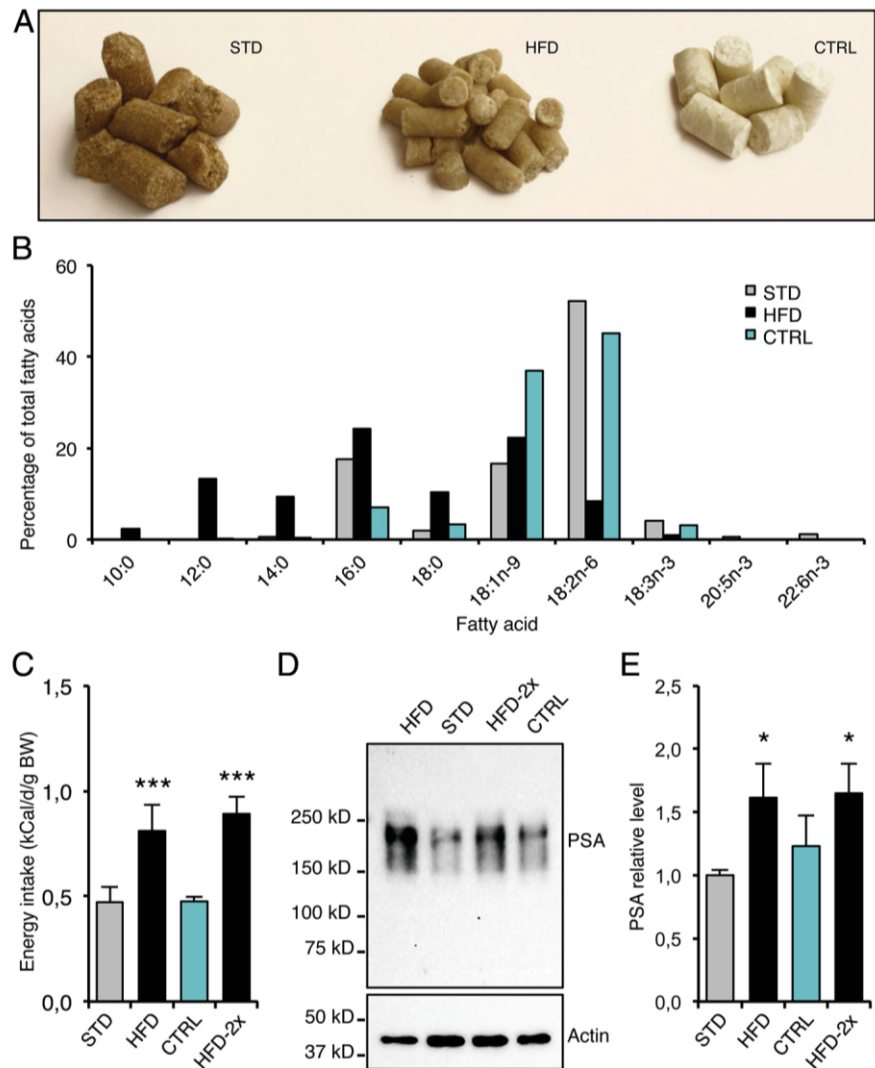
with picrotoxin (100  $\mu$ M) to block GABAergic IPSCs. For IPSC recordings, pipettes were filled with a cesium-chloride solution containing (in mM): 140 CsCl, 3.6 NaCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.1 Na<sub>4</sub>EGTA, 4 Mg-ATP, 0.25 Na-GTP (290 mOsm, pH 7.3). A mixture of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione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

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

## Results

### Homeostatic response to HFD feeding

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



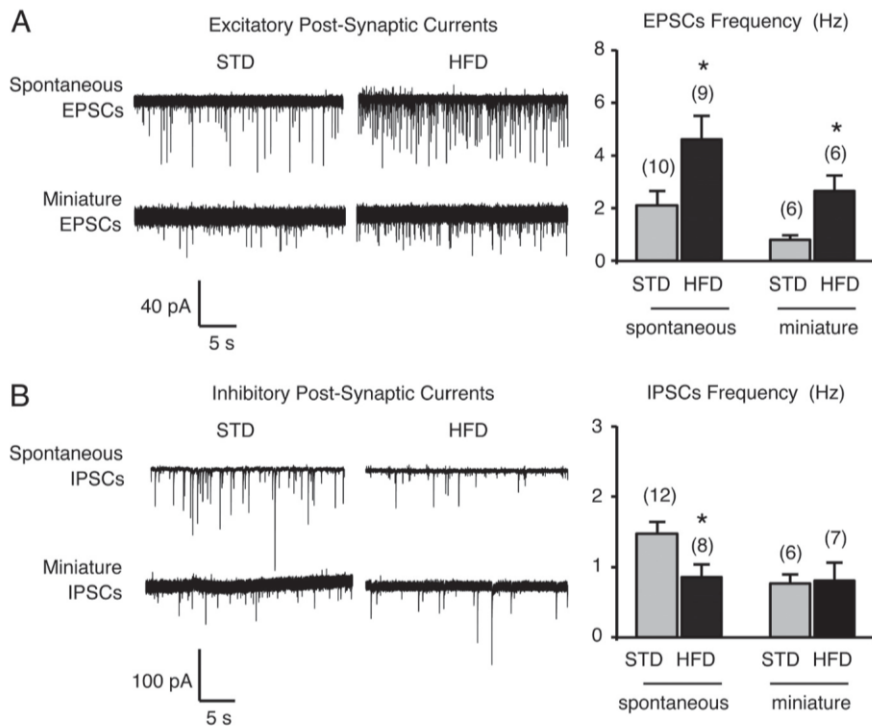
**Figure 3.** Food novelty is not sufficient to stimulate PSA production in the hypothalamus. *A*, Photograph of STD, HFD, and CTRL diets. *B*, Fatty acid composition of diets, as determined by gas chromatography. *C*, Energy intake after STD, CTRL, or HFD feeding for 1 d. HFD was introduced once (HFD)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

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

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

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





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

ordinated regulation of mRNA expression (Bramham and Wells, 2007) and protein synthesis (Cajigas et al., 2010). To determine whether HFD feeding induces plasticity within the hypothalamus, we measured the relative expression of several permissive factors of brain plasticity in dissected hypothalamic areas (i.e., arcuate nucleus, paraventricular nucleus and lateral hypothalamus) using low-density arrays. Screening was performed after 1, 3, and 8 d of HFD feeding. Compared with standard-diet-fed mice, mRNA abundance of a cluster of plasticity markers ( $n = 10$ ) was significantly increased in biopsies from HFD-fed mice (from 10 to 40%) (Fig. 2A; statistical significance determined using one-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* test, or using Mann–Whitney test when variances were unequal). This change was rapid and transient, occurring after 1 and 3 d of HFD feeding, and was mostly located in the arcuate nucleus. We found upregulation of *ncam1*, *nrp1*, *tnc*, *snap25*, *syp*, *syt4*, suggesting that HFD modified cell interactions and induced synaptogenesis. By contrast, expression of *gap43*, *serpine1*, *mmp9*, or *plau* was not affected suggesting no change in axonal sprouting. Changes in cell interactions can be mediated by the polysialic acid (PSA) molecule (Rutishauser, 2008). PSA is a cell-surface glycan with a large hydrated volume that modulates distances between cells. Basically, the attachment of PSA to membrane proteins, such as the neural cell-adhesion molecule (NCAM), promotes synaptic reorganization and other plasticity-related events by weakening cell-to-cell interactions. We therefore examined levels of PSA in adult brains from standard- and HFD-fed mice. The brains were fixed, sectioned and analyzed for the abundance of PSA by immunohistochemistry. A twofold increase in arcuate PSA immunoreactivity was calculated from optical sections acquired by confocal laser scanning microscope (Fig. 2B;  $F_{(3,24)} = 4.67$ ;  $p < 0.05$  for HFD D1, determined using one-way ANOVA and Bonferroni *post hoc* test), whereas no

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

#### Novelty is not sufficient to induce PSA in the arcuate nucleus

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

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

#### HFD feeding for 3 d induces arcuate POMC neuron rewiring

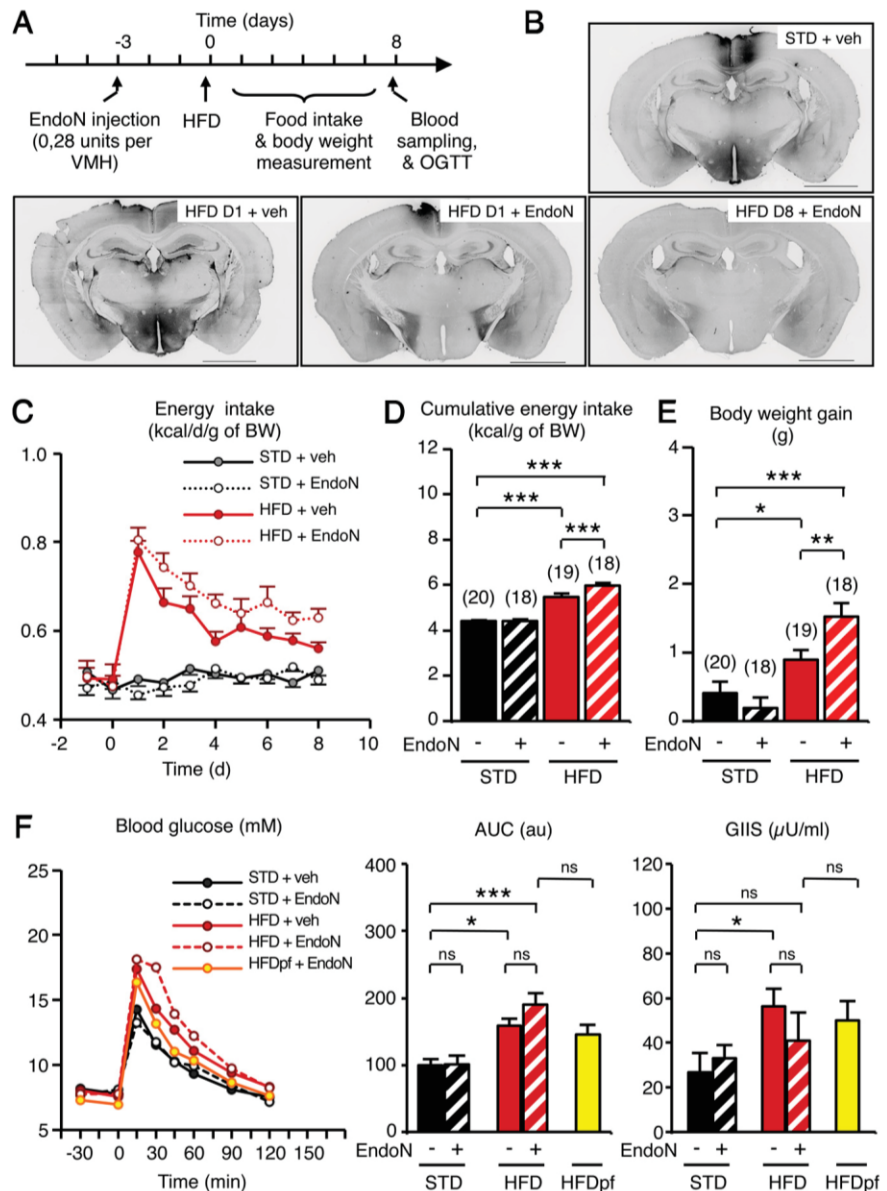
The melanocortin system in the CNS plays a fundamental role in the regulation of energy homeostasis by producing anorexigenic effects when stimulated (Cone, 2005; Berthoud and Morrison, 2008). The response controlled by POMC neurons is actually defined by their intrinsic neuronal activity and synaptic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

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

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

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

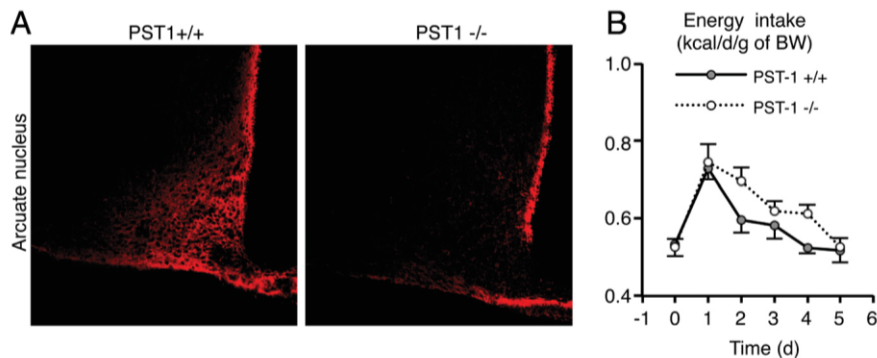
To investigate whether diet-induced POMC rewiring was involved in the maintenance of energy balance, we quantified energy intake in EndoN-treated animals. Mice receiving either vehicle or EndoN maintained a constant energy intake when fed a standard diet ( $\approx 0.50$  kcal/d/g; Fig. 5C). As before,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



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

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

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



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

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

## Discussion

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

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

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

Interestingly, the molecular screening of plastic events in the hypothalamus of HFD mice using low-density arrays suggests a brief and arcuate-specific modification in cell interactions. Although the melanocortin system is a widespread neuronal network, diet-induced synaptic plasticity seems to affect arcuate, probably first-order, neurons only. Therefore,

downstream targets of arcuate POMC or AgRP neurons such as paraventricular MC4R-positive neurons, which are crucial in the homeostatic response to dietary fat (Butler et al., 2001), could relay the increased anorexigenic tone from the arcuate nucleus without particular synaptic remodeling.

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

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

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

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

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

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

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

## References

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

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

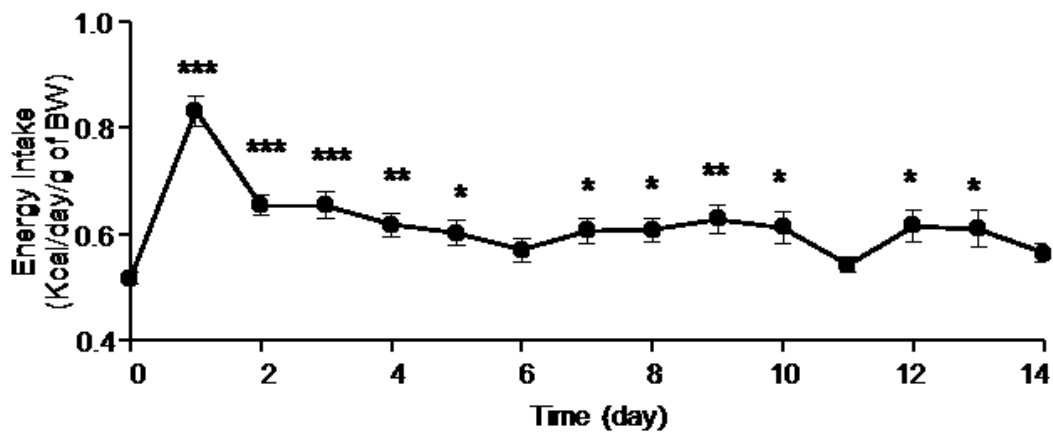
## Objectif 2 : évaluer les effets d'un défaut de plasticité hypothalamique dans un modèle d'obésité

Nous avons identifié PSA dans la première partie de ce travail comme un facteur permissif de la réorganisation synaptique du système à mélanocortine en fonction des conditions nutritionnelles. L'augmentation de la sialylation dans le noyau arqué est nécessaire pour la mise en place de la réponse homéostatique et le contrôle de la prise alimentaire face à une charge calorique importante.

Nous émettons l'hypothèse qu'une faible capacité à réorganiser les circuits neuronaux de la prise alimentaire à cause d'un faible taux hypothalamique de PSA peut rendre vulnérable à l'obésité induite par régime hypercalorique. Pour tester cette hypothèse, nous avons d'abord évalué le lien préexistant entre les différences interindividuelles de taux de PSA intrahypothalamique et la vulnérabilité à l'obésité nutritionnelle. Ensuite, nous avons recherché si une déplétion chronique de PSA dans l'hypothalamus était suffisante pour augmenter la vulnérabilité à l'obésité nutritionnelle. Ces approches ont été basées sur l'injection chronique d'EndoN et une extinction génique de la polysialyltransférase-1 (PST-1) dans l'hypothalamus de souris adultes sauvages.

## 1. Différences interindividuelles de réponse homéostatique au HFD

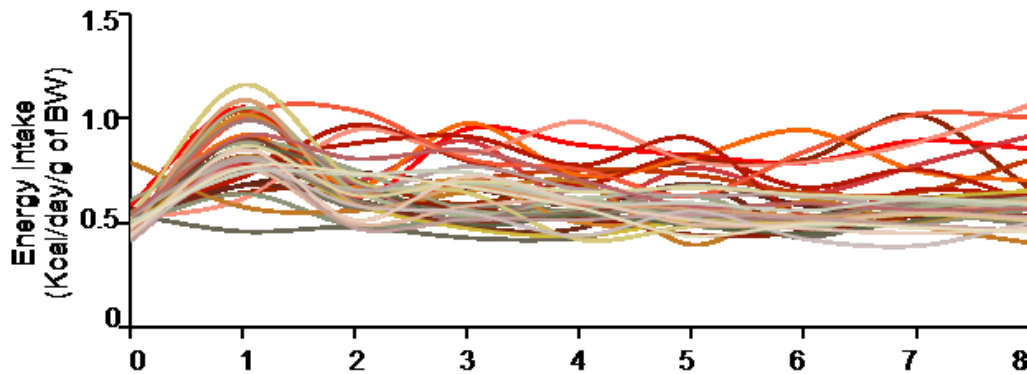
Comme décrit précédemment et d'après le « Mouse Phenome Database » du Jackson Laboratory, la prise énergétique en régime standard d'une souris mâle de 8 semaines est d'environ 0,5 kcal normalisée à son propre poids. L'introduction d'une alimentation hypercalorique provoque une hyperphagie transitoire chez la plupart des souris, correspondant à une prise énergétique élevée pendant quelques jours <sup>81 224 225</sup>. Dans cette étude, le pic de prise énergétique après l'introduction du régime HFD est apparu dès le premier jour et était de  $0,83 \pm 0,03$  kcal/g poids corporel. Il a fallu attendre deux semaines pour observer la normalisation de la prise énergétique (Figure 28).



**Figure 28 : Normalisation de la prise alimentaire après introduction de HFD**

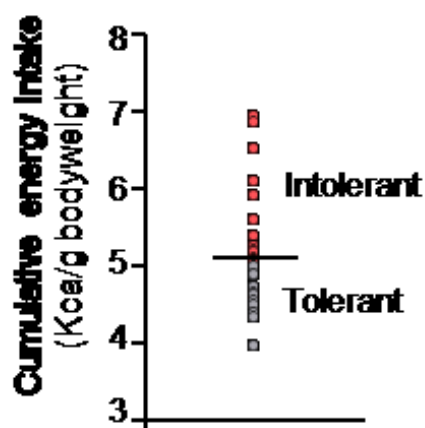
Prise énergétique moyenne après l'introduction du régime HFD de 31 souris mâles de 8 semaines. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ . ANOVA one-way mesures répétées et test de Dunnett *post-hoc* vs Jour 0.  $n = 31$ . Moyenne  $\pm$  SEM.

Cependant, la réponse homéostatique au HFD a été extrêmement variable selon les souris. La période de surconsommation énergétique pouvant varier de deux jours à deux semaines selon les souris. La **Figure 29** représente la prise énergétique des 31 souris sur une semaine.



**Figure 29 : Prise énergétique individuelle après l'introduction du régime**

En conséquence, la prise énergétique cumulée sur une semaine sous régime HFD, nommée par la suite « réponse comportementale », a varié énormément entre les souris : de 3,96 à 6,92 kcal/g poids corporel (**Figure 30**). Nous avons scindé en deux groupes l'ensemble des souris selon la médiane de la réponse comportementale. Les souris avec une grande réponse sont dites « intolérantes » au régime HFD et celles avec une faible réponse sont dites « tolérantes » au régime gras.

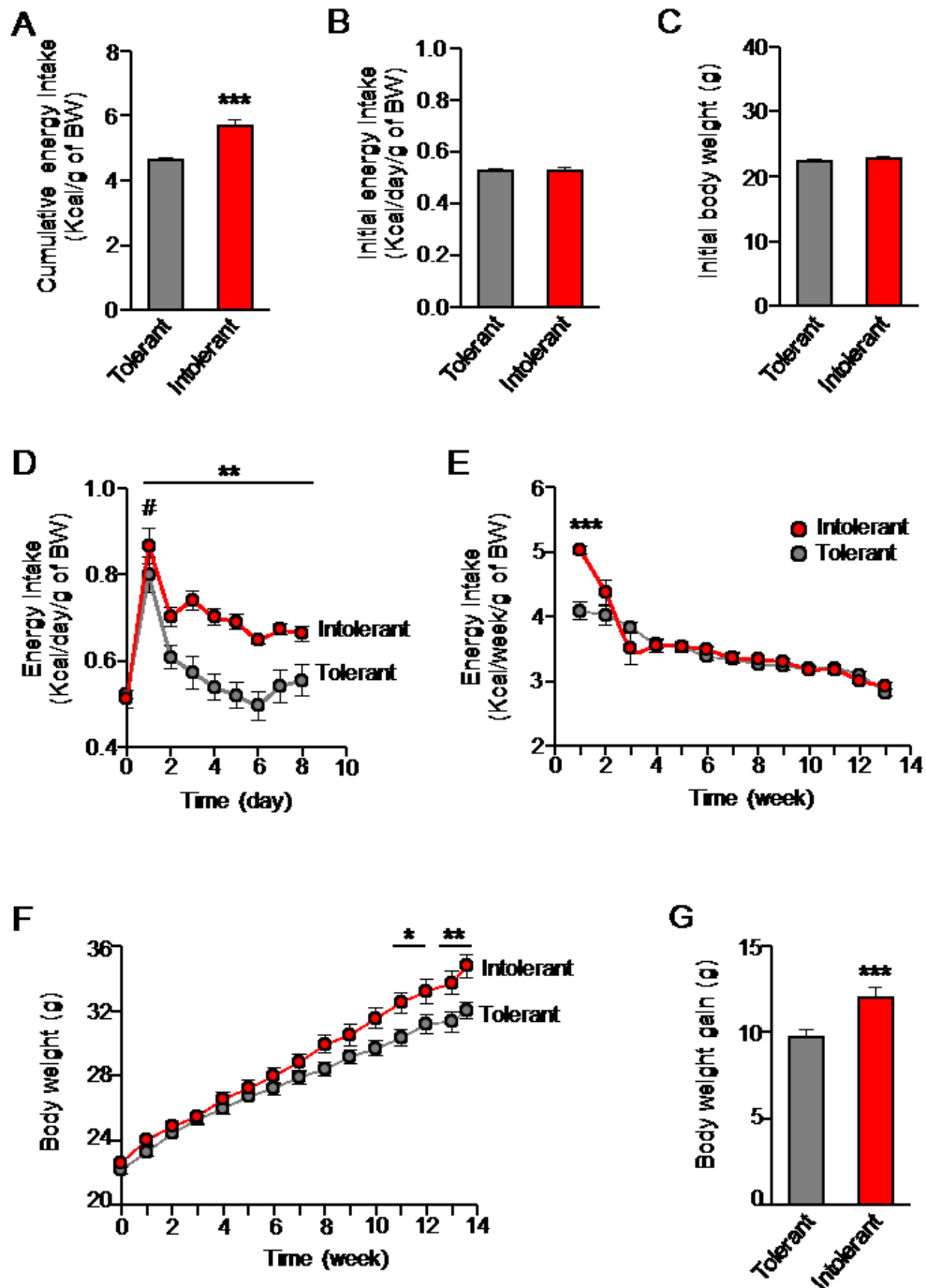


**Figure 30 : Création des groupes « intolérant » et « tolérant »**

La prise énergétique cumulée des souris sur une semaine est mesurée (réponse comportementale). Les groupes sont créés par la médiane de la réponse (ligne séparatrice noire), de manière à avoir la moitié des individus de part et d'autre de la médiane. Ceux au-dessus sont nommés « intolérant », ceux en dessous « tolérant ».

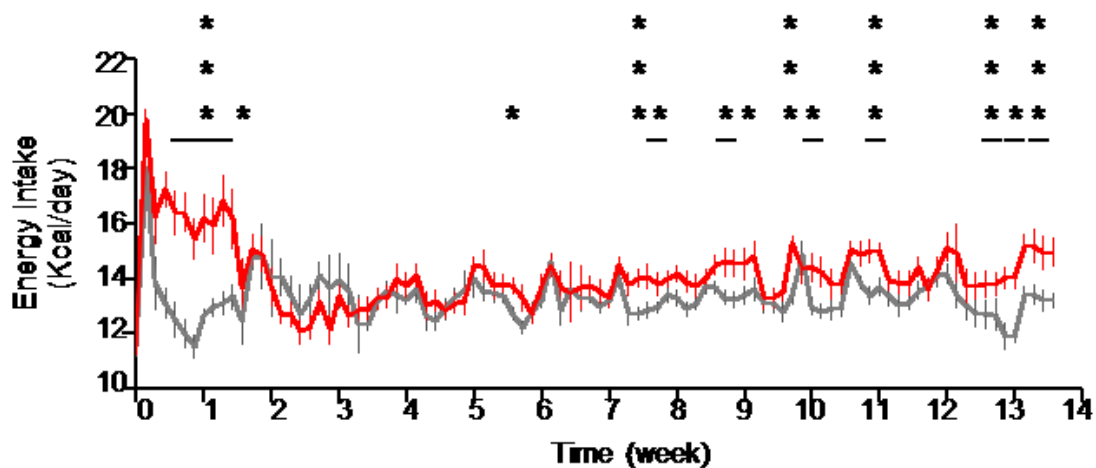


De ce fait, les souris intolérantes au régime gras ont ingéré plus de calories et ont eu une réponse comportementale significativement plus grande que les souris tolérantes (**Figure 31A**). Les deux groupes étaient initialement non distinguables sur la base de la prise énergétique en régime standard ou sur le poids (**Figure 31B** et **31C**). Après ségrégation, nous avons remarqué que les souris tolérantes ont normalisé leur prise énergétique en 2 jours seulement après l'introduction du régime HFD, tandis que les souris intolérantes l'ont normalisé après 10 jours (**Figure 31D** et **31E**). A posteriori, nous avons observé qu'après deux semaines de régime HFD, la prise énergétique était similaire entre les deux groupes, avec une chute progressive dans le temps (**Figure 30E**). Cependant, si l'on regarde la prise énergétique non normalisée au poids, on remarque que les souris intolérantes ont présenté des augmentations sporadiques de la prise énergétique après 5 semaines de régime HFD (**Figure 32**). De plus, la prise énergétique cumulée sur 3 mois de HFD a été plus importante chez les souris intolérantes (**Figure 33**). En outre, la mesure du poids des souris a révélé une augmentation plus importante du poids des souris intolérantes après 8 semaines de régime HFD comparé aux souris tolérantes (**Figure 31F**). De ce fait, le gain de poids a été plus important chez les souris intolérantes que chez les souris tolérantes après 3 mois de régime HFD (**Figure 31G**).



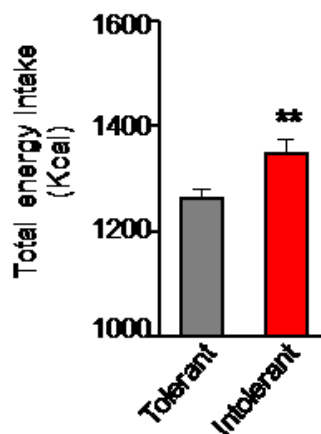
**Figure 31 . Différences interindividuelles de réponses comportementales au régime HFD révélant une sensibilité à l'obésité nutritionnelle**

(A) Après une semaine de HFD, les souris ont été séparées par la médiane sur la base de leur prise énergétique cumulée, « réponse comportementale », en tolérantes (gris) et intolérantes (rouge). \*\*\*  $p < 0.0001$ ; Test de Mann Whitney. (B) Prise énergétique sur une journée en régime standard, (C) Poids des souris avant l'exposition au régime HFD, (D) Prise énergétique sur une semaine en régime HFD, Souris tolérantes #  $p < 0,05$  et Souris intolérantes \*\*  $p < 0,01$  ANOVA one-way mesures répétées et test de Dunnett post-hoc vs Jour 0. (E) Prise énergétique sur 3 mois en régime HFD. \*\*\*  $p < 0,001$  two-way ANOVA et test de Bonferroni post-hoc (F) Evolution du poids en régime HFD, \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  two-way ANOVA et test de Bonferroni post-hoc (G) Gain de poids après 3 mois de régime HFD. \*\*\*  $p < 0,001$  test Mann Whitney.  $n$  tolérantes = 16,  $n$  intolérantes = 15. Moyennes  $\pm$  SEM.



**Figure 32 : Consommation calorique journalière des souris tolérantes et intolérantes sur 3 mois de régime HFD**

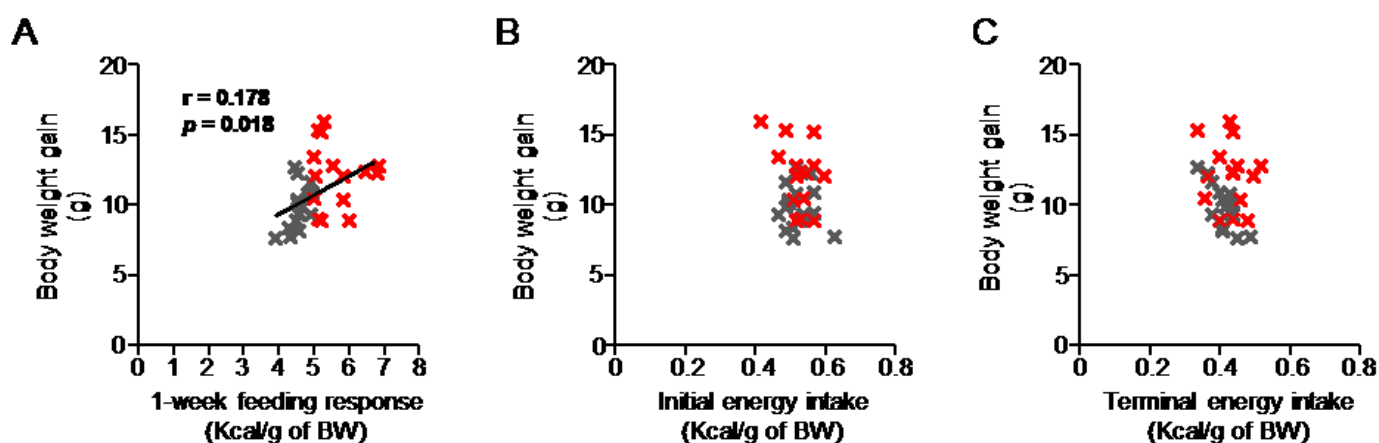
Rouge : consommation calorique des souris intolérantes, gris : consommation calorique des souris tolérantes. L'ensemble des mesures est réalisé sur 3 mois. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  two-way ; \*\*\*  $p < 0,001$  ANOVA et test de Bonferroni post-hoc.  $n$  tolérantes = 16,  $n$  intolérantes = 15. Moyennes  $\pm$  SEM.



**Figure 33 : Calories consommées pendant 3 mois de régime HFD**

Totale des calories consommées par les souris pendant les 3 mois de régime HFD. Gris : souris tolérantes, Rouge : souris intolérantes. \*\*  $p < 0,01$  Test Mann Whitney.  $n$  tolérantes = 16,  $n$  intolérantes = 15. Moyennes  $\pm$  SEM.

Il est important de noter que le poids corporel des souris après 3 mois de régime HFD était corrélé positivement avec la réponse comportementale observée dès une semaine d'exposition (**Figure 34A**). En revanche, cette corrélation n'a pas été retrouvée avec la prise énergétique en régime standard, ou avec la prise énergétique à terme après 3 mois de HFD (**Figure 34B et C**). Ces résultats indiquent que la réponse comportementale dès une semaine de régime HFD est prédictive du gain de poids observé 3 mois après l'exposition au HFD, alors que la prise énergétique en régime standard ou à terme en HFD, ne l'est pas.



**Figure 34 : Corrélation entre la réponse comportementale et certains paramètres métaboliques**

Gris : souris tolérantes, Rouge : souris intolérantes. Les corrélations sont des régressions linéaires entre tous les points. (A) Corrélation entre la réponse comportementale après une semaine de HFD et le gain de poids à terme. (B) Corrélation entre la prise énergétique basale en régime standard et le gain de poids à terme. (C) Corrélation entre la prise énergétique à terme après 3 mois de HFD et le gain de poids à terme.  $n$  tolérantes = 16,  $n$  intolérantes = 15.

## 2. Les différentes réponses comportementales sont liées au taux hypothalamique de PSA

Comme montré dans la première partie de ce travail, PSA, est impliqué dans la plasticité synaptique des circuits de la prise alimentaire de l'hypothalamus. Cette plasticité est stimulée par l'alimentation hypercalorique et est nécessaire à l'établissement d'une réponse comportementale adaptée. Nous avons émis l'hypothèse que l'adaptabilité au régime gras, pouvait être fonction de la capacité de plasticité synaptique individuelle par le niveau de PSA hypothalamique. Pour vérifier cela, nous avons étudié les taux de PSA hypothalamiques constitutifs dans une autre cohorte de souris ségréguées en fonction de leur vulnérabilité au surpoids, caractère qui a été préalablement déterminé sur la base des réponses comportementales aiguës au régime gras. Après 8 jours de régime HFD et identification de la tolérance au régime gras, le taux de PSA a été mesuré dans des biopsies d'hypothalamus médiobasal par ELISA. Les souris intolérantes ont présenté de plus faibles quantités de PSA dans l'hypothalamus que les souris tolérantes (respectivement  $684,7 \pm 59,4$  ng/mg protéines vs  $505,9 \pm 27,1$  ng/mg protéines. Ceci suggère que les souris intolérantes ont de plus faibles capacités à déclencher des événements de plasticité synaptique PSA-NCAM dépendants (**Figure 35**).

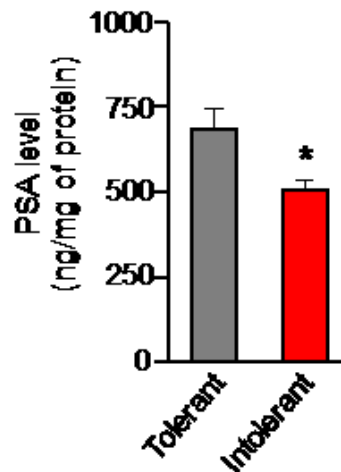


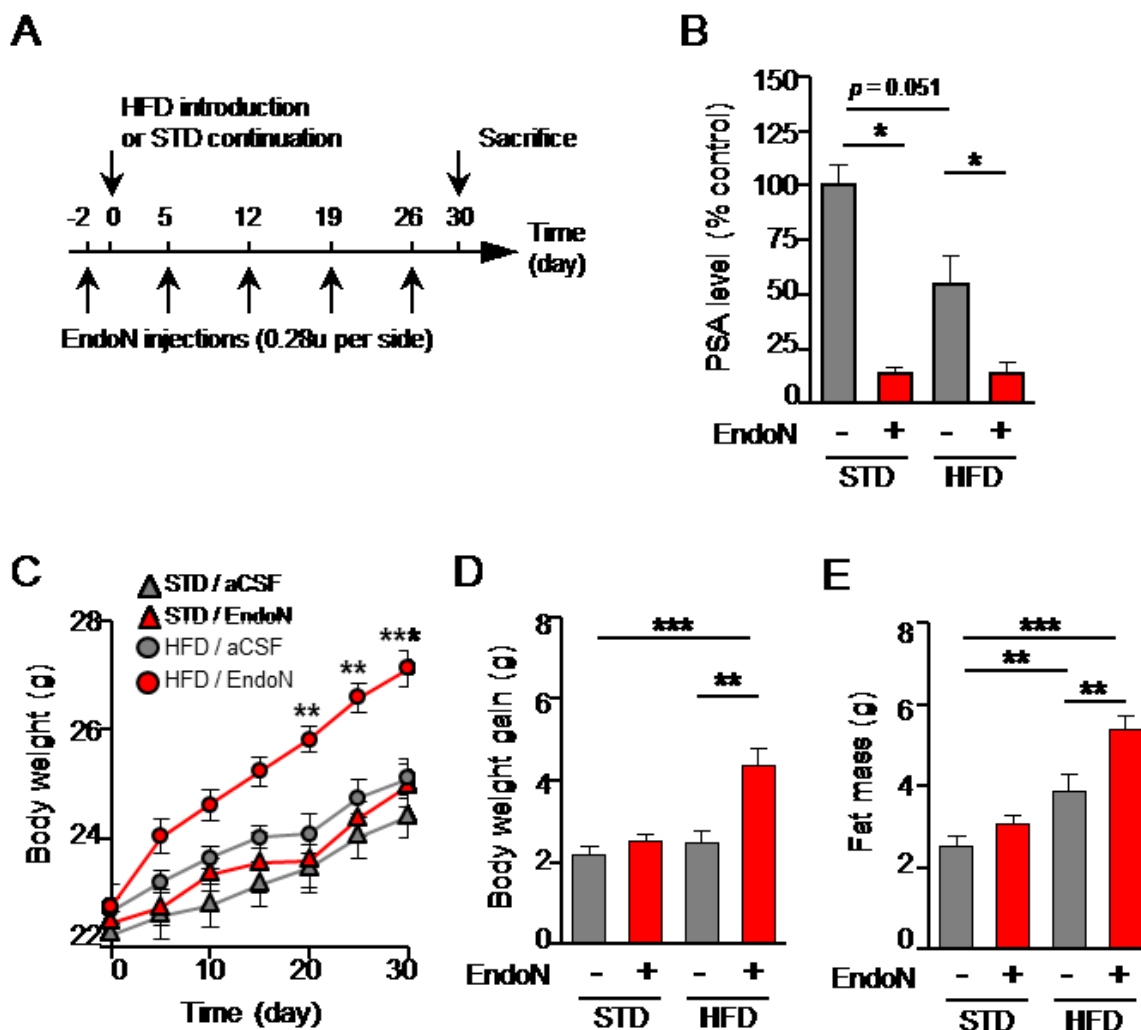
Figure 35 : Quantité de PS

ques des souris tolérantes et

*Gris : souris tolérantes, rouges : intolérantes. Les quantités de PSA sont rapportées aux quantités de protéines totales dans les échantillons. \*  $p < 0,05$  Test Mann Whitney.  $n$  tolérantes = 7,  $n$  intolérantes = 7. Moyennes  $\pm$  SEM.*

### 3. La suppression de PSA dans l'hypothalamus accélère le développement de l'obésité

La vulnérabilité à l'obésité semble être liée à des niveaux de sialylation différents dans l'hypothalamus. Nous avons voulu savoir s'il existait un lien causal entre ces deux paramètres. Pour évaluer ce lien, nous avons déplété PSA dans l'hypothalamus de manière chronique et observé la vulnérabilité à l'obésité des souris face au régime gras. Ainsi nous avons supprimé PSA de l'hypothalamus par injections hebdomadaires bilatérales d'EndoN (0,4 $\mu$ L/côté ; 0,28 unités/côté) chez des souris mâles de 8 semaines et avons nourri ces souris avec du HFD pendant 1 mois (**Figure 36A**). L'efficacité du traitement à l'EndoN a été recherché, par des analyses post, et montre une réduction de 80-90 % du niveau PSA dans l'hypothalamus médiobasal (**Figure 36B**). Il est intéressant de noter que le taux de PSA dans l'hypothalamus semble diminuer avec l'exposition au régime HFD ( $p < 0,051$ ). Le traitement intrahypothalamique chronique à l'EndoN n'a pas modifié le poids corporel des souris sous régime standard (STD EndoN), en comparaison au groupe contrôle (STD aCSF). Cependant, la déplétion chronique de PSA dans l'hypothalamus a provoqué un gain de poids et une masse grasse supérieures lorsque les souris ont été nourries en HFD (HFD EndoN) en comparaison aux souris injectées avec le véhicule (HFD aCSF) (**Figure 35C, D et E**). En conclusion, la suppression de PSA dans l'hypothalamus a accéléré le développement de l'obésité.



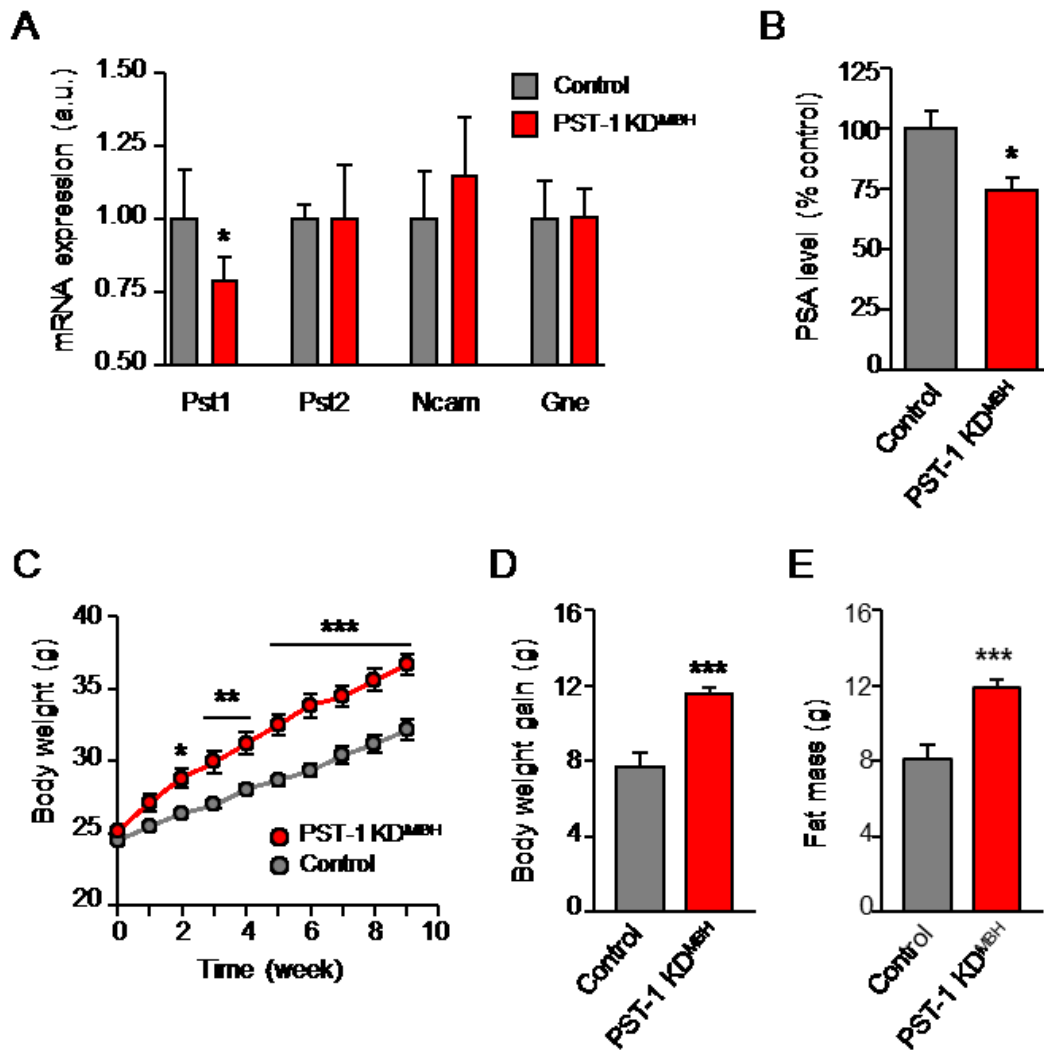
**Figure 36 : La suppression de PSA dans l'hypothalamus accélère le développement de l'obésité**

(A) Protocole d'injection chronique d'EndoN dans l'hypothalamus médiobasal. (B) Effet du traitement à l'EndoN sur les niveaux de PSA dans l'hypothalamus.  $n = 4$  STD/aCSF;  $n = 5$  STD/endoN;  $n = 5$  HFD/aCSF;  $n = 6$  HFD/endoN. (C) Evolution du poids corporel des souris injectées à l'EndoN ou à l'aCSF nourries en STD ou HFD.  $n = 10$  STD/aCSF;  $n = 9$  STD/endoN;  $n = 13$  HFD/aCSF;  $n = 14$  HFD/endoN. (D) Gain de poids des souris traitées à l'EndoN ou à l'aCSF après 1 mois de régime STD ou HFD. (E) Adiposité mesurée par echoMRI des souris traitées à l'EndoN ou à l'aCSF après 1 mois de régime STD ou HFD. (B), (D) et (E) \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  Test Mann-Whitney. (C) \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  ANOVA two ways et test post hoc de Bonferroni comparé à HFD / aCSF. Moyennes  $\pm$  SEM.

#### 4. Une réduction partielle de la polysialylation de l'hypothalamus accélère le développement de l'obésité

Pour réduire partiellement le niveau de PSA dans le MBH, nous avons entrepris de diminuer l'expression de PST-1, la sialyltransferase prédominante dans le cerveau adulte <sup>154 155</sup>. Nous avons utilisé des ARN interférant via des vecteurs lentiviraux pour éteindre spécifiquement l'expression de PST-1 dans l'hypothalamus de souris adultes. Les souris contrôles reçoivent un vecteur contenant une séquence shRNA ne ciblant aucun ARN spécifique chez les mammifères. L'injection bilatérale dans le parenchyme du MBH (0,4µL/côté ; 2.10<sup>9</sup> unités/mL) de vecteurs lentiviraux contenant le shRNA réduit de 21% l'expression des ARN messagers de Pst1 3 semaines après l'opération, comparé aux souris contrôle (**Figure 37A**). Ces souris seront appelées par la suite PST-1 knockdown (KD), désignées comme PST-1 KD<sup>MBH</sup>. Chez ces animaux, l'expression de Pst2, Ncam et Gne n'a pas été altérée (**Figure 37A**), indiquant que l'interférence ARN produisant le knockdown de PST-1 a été spécifique et n'a pas modifié l'expression d'autres gènes impliqués dans la voie de signalisation de PSA. Nous avons recherché par la suite si une réduction de la polysialylation de l'hypothalamus pouvait augmenter la vulnérabilité au développement de l'obésité. Pour cela, nous avons généré une deuxième cohorte de souris PST-1 KD<sup>MBH</sup> que nous avons nourri en régime HFD pendant 2 mois. Chez ces souris, l'efficacité du knockdown a été déterminée par des analyses du taux de PSA sur biopsies hypothalamiques *post mortem*. Seules les souris avec plus de 5 % de réduction de PSA dans l'hypothalamus ont été retenues dans l'étude, considérant qu'en dessous nous avons échoué à cibler le MBH. Après criblage, nous avons détecté une baisse significative de 25.7 % du taux de PSA dans le MBH des souris PST-1 K<sup>DMBH</sup> comparées aux souris contrôles (**Figure 37B**). Le suivi du poids a montré que les souris PST-1 KD<sup>MBH</sup> ont grossi progressivement pendant les 2 mois de HFD (**Figure 37C**). Le gain de poids et l'adiposité des souris PST-1 KD<sup>MBH</sup> a été significativement augmenté (**Figure 37D et E**). L'ensemble de ces données montre qu'une polysialylation limitée dans le MBH est suffisante pour accélérer le développement de l'obésité.





**Figure 37 La réduction de PSA dans l'hypothalamus augmente le gain de poids sous HFD**

(A) Effet de l'interférence ARN par les vecteurs lentiviraux sur les gènes impliqués dans la voie de signalisation de PSA, réalisé par RT-qPCR sur des extraits de MBH de souris en régime STD ; \* < p 0,05 test t student ; n = 4 contrôle ; n = 5 PST-1 K<sup>DMBH</sup>. (B) Niveau de PSA dans le MBH des souris PST-1 K<sup>DMBH</sup> et contrôle, nourries 2 mois en HFD ; \* < p 0,05 test t student ; n = 9 contrôle ; n = 9 PST-1 K<sup>DMBH</sup>. (C) Poids PST-1 K<sup>DMBH</sup> et contrôle nourries 2 mois en HFD. \* p < 0,05 ; \*\* < p 0,01 ; \*\*\* p < 0,001 ANOVA two et test de Bonferroni post hoc. (D) Gain de poids PST-1 K<sup>DMBH</sup> et contrôle nourries 2 mois en HFD. \*\*\* p < 0,001 test t student. (E) Adiposité PST-1 K<sup>DMBH</sup> et contrôle nourries 2 mois en HFD. \*\*\* p < 0,001 test t student. Moyennes ± SEM

## 5. Discussion

D'intenses efforts ont été réalisés pour rechercher les bases moléculaires de la prédisposition à l'obésité et aux pathologies associées, avec comme résultat la découverte de plusieurs cibles moléculaires cérébrales d'intérêt thérapeutiques <sup>226</sup>. Dans cette étude, nous avons trouvé que la réponse comportementale aigue suite à l'ingestion de régime hyperlipidique hypercalorique était prédictive de la vulnérabilité à l'obésité nutritionnelle, et qu'elle était liée au niveau de PSA dans l'hypothalamus. De plus, la suppression de PSA dans l'hypothalamus en utilisant des outils pharmacologiques et génétiques a favorisé le développement de l'obésité. L'ensemble de ces données indique qu'un faible taux de polysialylation dans l'hypothalamus prédispose à l'obésité nutritionnelle. Dans plusieurs modèles de pathologies psychologiques, la perte de PSA dans le tissu nerveux altère les défenses physiologiques, exacerbe les symptômes ou aggrave la maladie. Par exemple, la déplétion ciblée de PSA altère la mémoire conditionnée par la peur après un stress aversif <sup>227 228</sup>, intensifie l'hyperalgésie neuropathique <sup>184</sup>, augmente la vulnérabilité au stress chronique <sup>229</sup> et favorise les comportements addictifs <sup>230</sup>. Toutes ces observations montrent un rôle potentiellement protecteur de PSA dans les désordres cérébraux impliquant des phénomènes de plasticité.

Les malformations développementales du système à mélanocortine, comme une atrophie des projections neuronales innervant le PVN, pourraient contribuer au développement de l'obésité <sup>128</sup>. De plus, le nombre et la nature des afférences sur les neurones POMC dans le noyau arqué chez des rats maintenus en régime standard renseignent sur leur vulnérabilité à gagner du poids sous HFD, ce qui suggère que l'organisation synaptique du système à mélanocortine est cruciale pour maintenir l'homéostasie énergétique <sup>205</sup>. D'ailleurs, une organisation synaptique anormale de ce système qui favorise un tonus orexigène et qui peut être rapidement corrigée par traitement pharmacologique ou hormonal, a été trouvée chez des souris et rats obèses <sup>126 231</sup>. Par conséquent, il a été suggéré qu'une capacité de plasticité synaptique altérée au sein des circuits neuronaux de la prise alimentaire, à côté des défauts neuroanatomiques innés, pouvait également favoriser l'obésité <sup>232</sup>. Pourtant, si un défaut de plasticité synaptique est la cause ou la conséquence d'un désordre métabolique restait à déterminer avant notre étude <sup>146</sup>. Nous avons observé qu'un défaut de PSA dans l'hypothalamus accélérerait le développement de l'obésité chez les souris. Compte tenu du rôle de PSA dans la plasticité synaptique, nos résultats indiquent qu'un faible potentiel pour effectuer des phénomènes de plasticité synaptique est responsable d'un gain de poids plus important lors d'un régime HFD. Ceci est en cohérence avec l'importante littérature décrivant la plasticité synaptique des circuits de la prise alimentaire, comme un processus adaptatif face aux fluctuations métaboliques maintenant l'homéostasie énergétique <sup>142 143</sup>.

Similaire à ce qui a été observé chez des rats <sup>233</sup>, nous avons trouvé que l'hyperphagie aigüe suite à l'introduction du HFD (réponse comportementale) était prédictive du gain de poids observé 3 mois après. De plus, la surconsommation alimentaire était corrélée négativement avec les taux de PSA hypothalamique, suggérant une différence préexistante de la plasticité neuronale des circuits de la prise alimentaire et de la prédisposition au développement de l'obésité. Des résultats similaires ont déjà été rapportés, reliant le niveau de PSA du cortex préfrontal à la susceptibilité à développer des comportements addictifs <sup>230</sup>. La source de variation d'expression constitutive de PSA dans ces modèles n'est pas connue. Cependant, des travaux précédents ont montré qu'un stress aigüe prédisposant de jeunes rats à développer des troubles de l'humeur et de l'anxiété à l'âge adulte, ou un stress chronique à l'âge adulte, pouvaient conduire à une altération dramatique des niveaux de PSA dans le système limbique <sup>234 235</sup>. Ces résultats montrent que la synthèse cérébrale de PSA est affectée non seulement par l'héritage génétique mais aussi par l'expérience.

La suppression hypothalamique de PSA a été suffisante pour causer un surpoids sévère chez des souris nourries après 1 ou 2 mois de HFD, suggérant que l'incapacité à recabler efficacement les circuits de la prise alimentaire, en fonction des conditions nutritionnelles, rend les souris sensibles au développement de l'obésité. Depuis peu, il a été montré que l'hypothalamus humain est lui aussi capable de subir des événements de plasticité structurale hormono-dépendante <sup>220</sup>. Ceci suggère que nos observations faites chez la souris pourraient également se produire chez l'Homme. D'ailleurs, des études génétiques à haut débit portant sur les déterminants de la masse corporelle ont révélé une forte influence de gènes impliqués dans les processus de plasticité neuronale <sup>222 223</sup>. Il est intéressant de noter, qu'une délétion de *Negr1*, gène codant le facteur de croissance neuronale 1, molécule d'adhésion impliquée dans les remodelages cérébraux, semble être la cause d'un poids corporel élevé <sup>223</sup>. De plus, le faible niveau du facteur de croissance neurotrophique (BDNF) chez l'Homme, facteur permissif de plasticité cérébrale (causé par une haploinsuffisance du gène) est associé à une l'obésité infantile <sup>221</sup>. Il est donc concevable que l'altération de la plasticité synaptique chez l'Homme puisse prédisposer à l'obésité.

Le traitement à l'EndoN dans l'hypothalamus ne produit pas d'altération métabolique notable chez les souris contrôles maintenues en régime standard, suggérant que la plasticité synaptique dans l'hypothalamus n'a pas d'impact sur la prise alimentaire ou le poids corporel lorsque la balance énergétique est équilibrée. Ce résultat est quelque peu étonnant parce que dans des « conditions physiologiques », la réactivité du système à mélanocortine est ajustée de manière dynamique par des réorganisations synaptiques en fonction de « l'état métabolique » (jeun de 24h vs état nourri chez la souris) et des hormones associées <sup>41 142 143</sup>. Une possibilité est que la plasticité synaptique circadienne dans les neurones POMC/CART et AgRP/NPY n'est simplement pas dépendante de PSA, mais il ne peut pas être exclu non plus que l'altération de la

plasticité synaptique des circuits de la prise alimentaire si elle persiste pendant plus de 2 mois, puisse aboutir à la longue à des désordres métaboliques même chez des souris maintenues en régime standard.

En conclusion, nous avons identifié une association entre un caractère latent de vulnérabilité à l'obésité chez les rongeurs et des variations individuelles de PSA dans l'hypothalamus. La manipulation ciblée du niveau de PSA indique le rôle causal du taux de PSA dans l'hypothalamus dans l'installation de l'obésité. Par conséquent, ces résultats suggèrent que la plasticité synaptique des circuits de la prise alimentaire contribue à maintenir constant le poids corporel lors d'une pression nutritionnelle hypercalorique. Bien que ces résultats ne fournissent pas des bases pour un diagnostic préalable – PSA n'a pas été examiné comme un biomarqueur circulant ou excrété, et la charge calorique d'une semaine est difficilement compatible avec un test de performance fonctionnelle métabolique chez l'Homme, ils renforcent le concept selon lequel la plasticité synaptique est un élément clef dans la sensibilité individuelle à développer un surpoids avec une alimentation obésogène [205](#) [232](#).

## 6. Article 2

Ces travaux ont été soumis dans le journal Proceedings of the National Academy of Sciences :

Low level of polysialic acid in the hypothalamus predisposes to diet-induced obesity

Xavier Brenachot , Caroline Rigault , Emmanuelle Nédélec , Sylvie Chaudy , Alexandra Gouazé , Jean Gascuel , Luc Pénicaud , Alexandre Benani

# Low level of polysialic acid in the hypothalamus predisposes to diet-induced obesity

Brenachot Xavier\*, Rigault Caroline\*, Nédélec Emmanuelle, Chaudy Sylvie, Gouazé Alexandra, Gascuel Jean, Pénicaud Luc, Benani Alexandre† \* these authors contributed equally to this work †To whom correspondence should be addressed.

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation; Unité Mixte de Recherche CNRS - INRA - Université de Bourgogne; 9E Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

**Neuronal feeding circuits that control appetite and body weight rapidly and reversibly adjust their responsiveness to the fluctuation of the body's energy state through changes in cell connection. This morphological plasticity is altered in genetically obese and diet-induced obese rodents. Whether this neuroanatomical impairment underlies the obese phenotype or develops along with the metabolic unbalance is not well defined. In mice, we observed that a vulnerability trait predicting overweight on high-fat diet (HFD) was associated to the decreased abundance of polysialic acid (PSA) in the hypothalamus, a molecule that triggers synaptic plasticity. Moreover, pharmacological or genetic removal of PSA in the hypothalamus accelerated the weight gain of mice on HFD, showing the causal role of PSA deficiency in the metabolic outcome. Taken together, these results indicate that low propensity to synaptic plasticity in the hypothalamus confers risk for obesity under excessive caloric pressure.**

Hypothalamus | synaptic plasticity | food intake | obesity | vulnerability

## Introduction

The changes in lifestyle, and in the availability and quality of food largely explain the worldwide epidemic of obesity (1). However, high variability exists in individual susceptibility to develop overweight in an obesogenic environment (2). This implies that genetic risk factors among individuals substantially influence the variability in body mass index (3). The improved understanding of the molecular basis of this heterogeneity will probably help to fight against obesity and its related disorders.

Pre-existing differences in brain circuits controlling appetite and energy homeostasis could account for the vulnerability to common obesity (4, 5). An abnormal fibers organization and the synaptology of the melanocortin system have been found in the hypothalamus of animals genetically predisposed to obesity (6, 7). Interestingly, brain circuits involved in the control of energy balance remain plastic through adulthood (8, 9). The ability to acutely rewire feeding circuits is crucial for the physiological control of energy homeostasis (10). The synaptic plasticity in response to changes in metabolic state is coordinated by hormonal signals across multiple neuronal cell types dispersed in the hypothalamus (11-13). For instance, fasting increases excitatory synaptic inputs and enhances presynaptic glutamate release on Agouti-related peptide (AgRP)-containing neurons, which increases their firing rate to favor feeding behavior (11). This effect can be mimicked by the administration of the orexigenic gut-derived hormone ghrelin (12). In fed state, the leptin, which is secreted by the adipose tissue in proportion to its mass, activates anorexigen proopiomelanocortin (POMC)-containing neurons that indirectly inhibit the activity of AgRP neurons through a reduction of excitatory synaptic inputs (12). The inability to dynamically modulate presynaptic inputs on AgRP and POMC neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus according to the metabolic state could contribute to obesity and related metabolic disorders (10, 13). Indeed, genome-wide association studies in human have reported a strong association between high

body mass index and polymorphic loci whose neighboring genes are highly expressed in the brain and directly involved in neuronal plasticity (14, 15). Moreover, haploinsufficiency of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in human, a factor that mediates brain plasticity, is associated with the childhood onset of obesity (16).

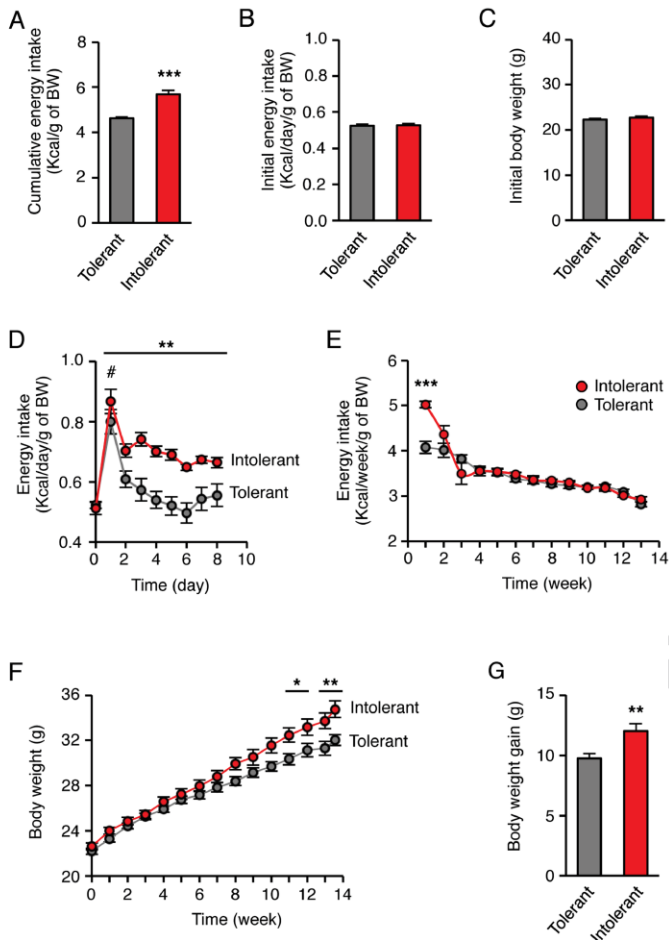
The polysialic acid (PSA) is a molecule that triggers brain plasticity. When added onto specific cell surface molecules, this complex sugar residue promotes synaptic plasticity and dendritic remodeling by the weakening of cell interaction (17, 18). In the postnatal nervous system, the polysialylation of synaptic proteins is viewed as an adaptive process involved in many plasticity-related responses, such as learning (19-22), fear conditioning (23, 24), circadian cycle (25-27), neuroendocrine function (28, 29), hyperalgesia (30, 31), and nerve regeneration (32). We have recently identified PSA as a permissive factor for synaptic reorganization in the hypothalamic melanocortin system according to nutritional condition (10). Moreover, during acute positive energy imbalance caused by high-fat diet, the hypothalamic polysialylation is involved in the homeostatic control of energy intake (10).

We therefore postulated that the low individual capacity of neuronal plasticity in feeding circuits due to a low hypothalamic level of PSA could incite metabolic inflexibility and thereby vulnerability to diet-induced obesity (DIO) in mice. To test this hypothesis, we first assessed the link between the pre-existing individual differences in the hypothalamic levels of PSA and the vulnerability to DIO. Then, we investigated whether the chronic depletion of the hypothalamic PSA level was sufficient to increase

## Significance

**Neuronal feeding circuits that control energy balance can be rewired in the adulthood. This plasticity allows fine tuning of the energy balance. The capacity to rewire feeding circuits is altered in obese rodents. Whether this neuroanatomical alteration is the cause or the consequence of obesity remains to be elucidated. Here, we report that the vulnerability to diet-induced obesity in mice could rely on the individual pre-existing differences in the propensity to elicit neuronal rewiring in the hypothalamus, as revealed by the decreased expression of PSA, a factor of synaptic plasticity. Indeed, the experimental reduction of hypothalamic PSA level makes mice prone to obesity. These results show that the inflexibility of feeding circuits is a risk factor for obesity.**

## Reserved for Publication Footnotes

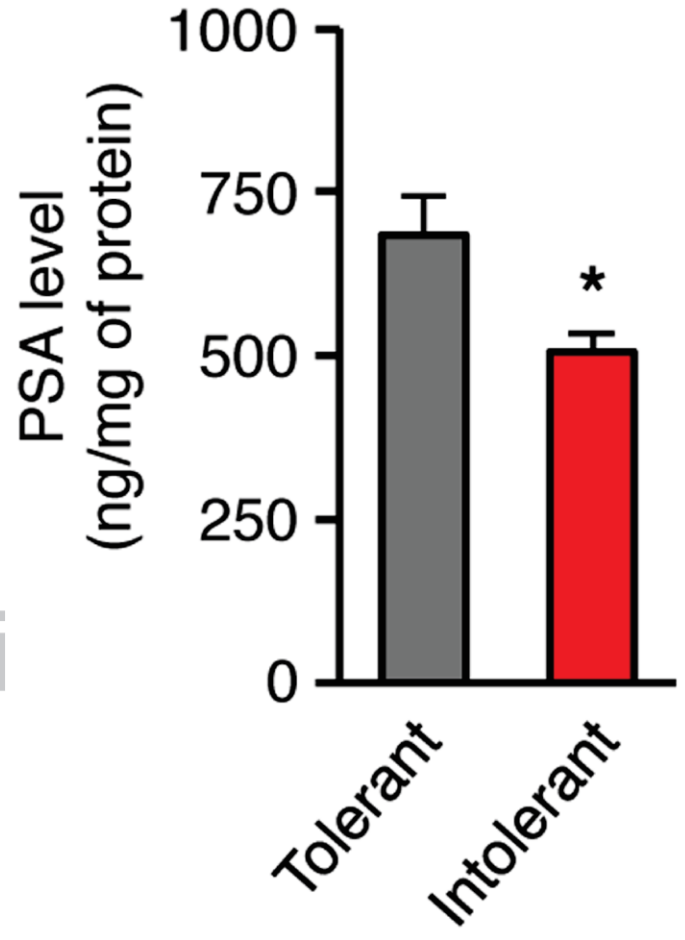


**Fig. 1. Individual differences in the homeostatic feeding response to HFD reveal susceptibility to diet-induced obesity.** (A) After one week on HFD, mice were separated into HFD-tolerant ( $n = 16$ ) and HFD-intolerant ( $n = 15$ ) groups by a median split based on the cumulative energy intake over the week (\*\*\*:  $p < 0.001$ ; Mann Whitney test). (B,C) Initial energy intake and body weight of HFD-tolerant and HFD-intolerant mice were similar on standard chow, i.e. before HFD introduction. (D) Kinetic of energy intake of HFD-tolerant and HFD-intolerant mice during 8-day HFD (For tolerant mice, #:  $p < 0.05$ , vs energy intake at day 0; for intolerant mice, \*\*:  $p < 0.01$ , vs energy intake at day 0; one-way ANOVA for repeated measures followed by multiple comparison Dunnett post-hoc test). (E) Kinetic of the energy intake of HFD-tolerant and HFD-intolerant mice during 13 weeks-HFD (\*\*\*:  $p < 0.001$ , HFD-tolerant vs HFD-intolerant mice; two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test). (F) Kinetic of the body weight of HFD-tolerant and HFD-intolerant mice during 13-week HFD (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , HFD-tolerant vs HFD-intolerant mice; two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test). (G) Body weight gain of HFD-tolerant and HFD-intolerant mice after 13-week HFD (\*\*:  $p < 0.01$ ; unpaired t test). All results are mean  $\pm$  SEM.

the vulnerability to DIO. The approach was based on the repeated injections of endoneuraminidase N (endo N), a bacterial enzyme that specifically removes PSA from cell adhesion proteins, and on the permanent knock-down of polysialyltransferase-1 (PST-1), an enzyme that allows polysialylation in the adult brain (33, 34). These pharmacological and genetic manipulations were performed in the mediobasal hypothalamus (MBH) of adult mice. Taken together, the results indicated that low hypothalamic level of PSA accelerated the onset of DIO.

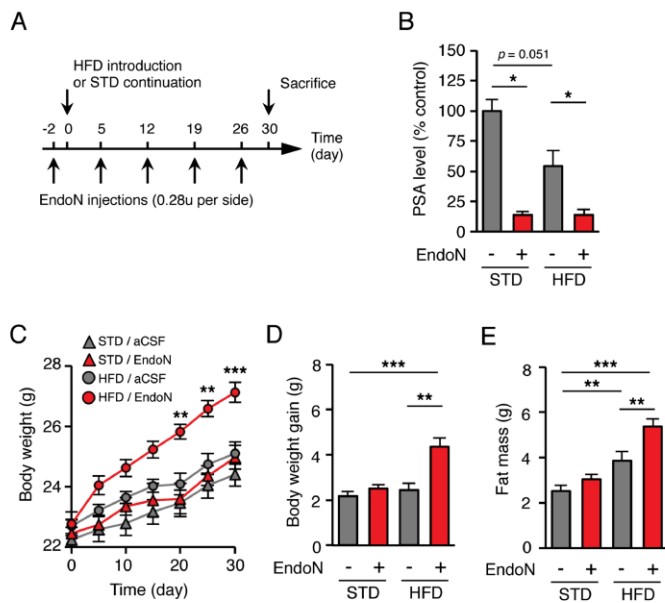
## Results

### Individual differences in the homeostatic feeding response to HFD reveal susceptibility to DIO.



**Fig. 2. Individual differences in the tolerance to HFD are linked to the level of hypothalamic PSA.** PSA levels were measured in mediobasal hypothalamus after a one-week HFD test to discriminate HFD-tolerant and HFD-intolerant mice ( $n = 7$  HFD-tolerant,  $n = 7$  HFD-intolerant; \*:  $p < 0.05$ ; Mann Whitney test). Results are mean  $\pm$  SEM.

For a 2-month old mice fed with standard diet, the typical daily energy intake is 0.5 kcal per gram of body weight (The Jackson Laboratory, Mouse Phenome Database, <http://phenome.jax.org/>). It is well known that high-energy foods cause transient overeating in most of the mice, which corresponds to an acute increase in energy intake during a few days (10, 35, 36). In this study, the peak of energy intake after the introduction of high-fat diet (HFD) was  $0.83 \pm 0.03$  kcal/g on the first day, and the normalization of energy intake occurred after two weeks (Fig. S1A;  $n = 31$ ). However, the homeostatic response to short-term HFD was variable between mice. The period of overconsumption lasted from two days to more than one week (Fig. S1B). Consequently, the individual cumulative energy intake during one-week HFD, hereinafter referred to as the “feeding response”, ranged from 3.96 to 6.92 kcal/g (Fig. S1C). According to this response, we discriminated HFD-intolerant mice with high feeding response and HFD-tolerant mice with low feeding response (Fig. 1A, Fig. S1C). The two groups of mice were initially undistinguishable on the basis of their energy intake on standard diet or on their body weight (Fig. 1B and 1C). Tolerant mice normalized their energy intake in only two days after HFD introduction, whereas intolerant mice normalized it after ten days (Fig. 1D and 1E). After two weeks on HFD, energy intake was similar between groups, with a slight decline over time (Fig. 1E). However, data of energy intake when not normalized to body weight showed that intolerant mice had sporadic increases

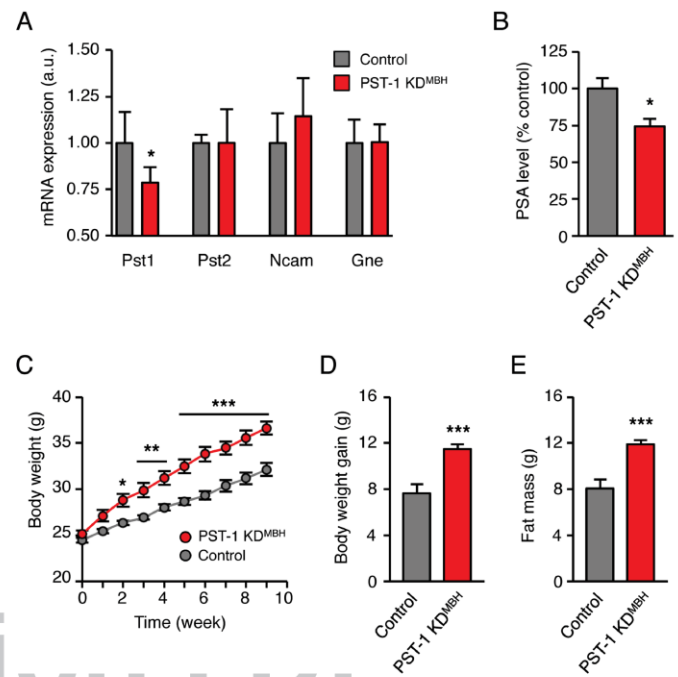


**Fig. 3.** PSA removal in the hypothalamus accelerates the onset of DIO. (A) Picture showing the injection protocol of endoN in the mediobasal hypothalamus of mice fed either standard or a high-fat diet for one month. Five weekly bilateral injections of endoN (0.28 units/side) were performed. Control mice received artificial cerebrospinal fluid. (B) Effect of endoN injections on PSA level in the mediobasal hypothalamus, at the end of the treatment ( $n = 4$  STD/aCSF;  $n = 5$  STD/endoN;  $n = 5$  HFD/aCSF;  $n = 6$  HFD/endoN;  $*$ :  $p < 0.05$ ; Mann Whitney test). (C) Body weight of endoN-treated and control mice fed a standard diet or a HFD for one month ( $n = 10$  STD/aCSF;  $n = 9$  STD/endoN;  $n = 13$  HFD/aCSF;  $n = 14$  HFD/endoN;  $**$ :  $p < 0.01$ .  $***$ :  $p < 0.001$ ; two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test). (D) Body weight gain of endoN-treated and control mice fed a standard diet or a HFD for one month ( $**$ :  $p < 0.01$ .  $***$ :  $p < 0.001$ ; Mann Whitney test). (E) Fat mass of endoN-treated and control mice fed a standard diet or a HFD for one month ( $**$ :  $p < 0.01$ .  $***$ :  $p < 0.001$ ; Mann Whitney test). All results are mean  $\pm$  SEM.

of energy intake which appeared after five weeks on HFD (Fig. S1D). Therefore, the cumulative energy intake over 3 months with HFD was significantly higher in intolerant mice than in tolerant mice (Fig. S1E). Moreover, the longitudinal follow-up showed that body weight of intolerant mice maintained on HFD increased strongly after 8 weeks in comparison to tolerant mice (Fig. 1F). Hence, the body weight gain between the two groups of mice was significantly different after 3 months on HFD (Fig. 1G). Importantly, the body weight gain was positively correlated with the feeding response to HFD (Fig. S1F). By contrast, the body weight gain was not correlated with the initial energy intake on standard diet or with the final energy intake on HFD (Fig. S1G and S1H). These results indicated that the short-term feeding response to HFD was predictive of a highest body weight gain upon HFD, while the basal energy intake before or during HFD was not.

#### Individual differences in the tolerance for HFD are linked to the level of hypothalamic PSA.

PSA, an endogenous molecule that promotes synaptic plasticity, is critically involved in the homeostatic feeding response to dietary fat (10). Therefore, the biological processes that underlie the individual variations in the feeding response to HFD could reside in pre-existing differences in PSA levels in the hypothalamus, and thereby in the ability to rewire feeding circuits. To test this hypothesis, we first identified in a second cohort of mice, the HFD-tolerant and HFD-intolerant animals, according to their feeding response to HFD, and then we examined the concentration of PSA in the medio-basal hypothalamus (MBH) collected after sacrifice. Intolerant mice showed significant lower



**Fig. 4.** Reduction of polysialylation in the hypothalamus increases the body weight gain on HFD. PST-1 knockdown mice, designated as PST-1 KD<sup>MBH</sup> mice, were stereotactically injected in the mediobasal hypothalamus with  $\sim 7.5 \times 10^5$  shRNA-expressing lentiviral vectors against a Pst1 sequence. Control mice received lentiviral vectors targeting a non mammalian sequence. (A) Effect of the lentiviral vectors-mediated RNA interference on relative mRNA expression of genes involved in the PSA signaling, assessed by RT-qPCR on mediobasal hypothalamus extracts from standard diet-fed mice ( $n = 4$  control;  $n = 5$  PST-1 KD<sup>MBH</sup>;  $*$ :  $p < 0.05$ ; unpaired t test). (B) PSA level in the mediobasal hypothalamus of PST-1 KD<sup>MBH</sup> mice fed a HFD for 2 months, compared to control mice ( $n = 9$  control;  $n = 9$  PST-1 KD<sup>MBH</sup>;  $*$ :  $p < 0.05$ ; unpaired t test). (C) Kinetic of the body weight of PST-1 KD<sup>MBH</sup> and control mice during 2-month HFD ( $*$ :  $p < 0.05$ ,  $**$ :  $p < 0.01$ .  $***$ :  $p < 0.001$ ; two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test). (D) Body weight gain of PST-1 KD<sup>MBH</sup> and control mice after 2-month HFD ( $***$ :  $p < 0.001$ ; unpaired t test). (E) Fat mass of PST-1 KD<sup>MBH</sup> and control mice after 2 month-HFD ( $***$ :  $p < 0.001$ ; unpaired t test). All results are mean  $\pm$  SEM.

levels of hypothalamic PSA in comparison to tolerant mice (Fig. 2; tolerant:  $684.7 \pm 59.4$  ng/mg; intolerant:  $505.9 \pm 27.1$  ng/mg;  $p = 0.038$ ), suggesting that intolerant mice might have lesser ability to trigger synaptic plasticity in the hypothalamus than tolerant mice.

#### PSA removal in the hypothalamus accelerates the onset of DIO.

EndoN is a bacterial enzyme that specifically removes PSA residues from cell adhesion molecules (37). It remains active at least eight days after a single injection in the brain parenchyma (10). To test whether low PSA level in the MBH makes mice prone to DIO, we chronically depleted PSA in this area by bilateral intraparenchymal injections of endoN (0.4  $\mu$ L/side; 0.28 units/side) once a week during one month in mice fed with HFD (Fig. 3A). The effect of the drug was checked by post-mortem analysis. We observed that the repeated injections of endoN reduced by 80-90% the PSA level in the MBH (Fig. 3B). The repeated injections of endoN did not modify body weight in mice fed a standard diet for one month (Fig. 3C, 3D and 3E). However, the persistent loss of hypothalamic PSA caused by endoN dramatically increased the weight gain of mice on HFD, in comparison to vehicle-treated mice (Fig. 3C). As a result, body weight gain and fat mass measured after one month in mice on HFD were higher in endoN-treated mice relative to vehicle-treated mice (Fig. 3D, 3E). Thus, PSA removal in the hypothalamus accelerated the onset of DIO in mice.



### Reduction of polysialylation in the hypothalamus increases the body weight gain on HFD.

To reduce PSA level in the MBH, we also tended to decrease the expression of PST-1, the predominant sialyltransferase in the mature brain (33, 34). We used lentiviral vectors-mediated RNA interference for specifically knocking down PST-1 expression in the hypothalamus of adult mice. Control mice received lentiviral vectors carrying a shRNA sequence against a non mammalian target. When injected bilaterally into the MBH of mice (0.4  $\mu$ L/site;  $2.10^9$  units/mL), shRNA-expressing lentiviral vectors against *pst1* reduced by 21% the expression of *pst1* mRNA 3 weeks after surgery, compared to control mice (Fig. 4A). In these PST-1 knockdown (KD) animals, designated as PST-1 KD<sup>MBH</sup> mice, the expression of *pst2*, *ncam*, and *gne* was not altered (Fig. 4A), indicating that the RNAi-mediated knockdown of *pst1* was specific and did not modify expression of other genes involved in the signaling pathway of PSA. To investigate whether a reduction of polysialylation in the hypothalamus increased the vulnerability to DIO, we generated a second cohort of PST-1 KD<sup>MBH</sup> mice that were fed a HFD for two months. In these mice, knockdown efficiency was determined by post-mortem analysis of PSA level in MBH biopsies. Only mice with more than 5% reduction of hypothalamic PSA were further analyzed, considering otherwise that we failed to target the MBH. After screening, we detected a significant reduction of the PSA level by 25.7% in the MBH of PST-1 KD<sup>MBH</sup> mice, in comparison to control mice (Fig. 4B). A retrospective analysis showed that PST-1 KD<sup>MBH</sup> mice gained progressively more weight during the 2-month HFD than control mice (Fig. 4C). Body weight gain and adiposity of PST-1 KD<sup>MBH</sup> mice on HFD were therefore significantly increased (Fig. 4D and 4E). Thus, a limited polysialylation in the hypothalamus was sufficient to accelerate the onset of DIO.

### Discussion

Intense efforts are carried out to investigate the biological basis of individual predisposition to obesity and related disorders. As a result, several molecular brain targets of therapeutical interest have been identified (38). In this study, we found that the acute behavioral response to dietary fat was predictive of the vulnerability to weight gain on HFD, and was linked to the level of PSA in the hypothalamus. Moreover, the removal of hypothalamic PSA using pharmacological or genetic tools promoted obesity upon HFD. Taken together, these results indicated that the decreased polysialylation in the hypothalamus predisposes to DIO. In several models of neuropsychological disorders, the loss of neural PSA alters physiological defenses, exacerbates symptoms or worsens the disease. For instance, a targeted depletion of PSA alters fear memory after an aversive stress (23, 24), intensifies injury-induced neuropathic hyperalgesia (30), increases vulnerability to chronic stress (39) and incites addiction-related behaviors (40). All these observations point out the potential protective role of PSA against brain dysfunctions involving a plasticity-related component.

Developmental malformation of the melanocortin system, i.e. disruption of neural projection pathways within the hypothalamus, could contribute to the obese phenotype and related metabolic disorders (41). Moreover, the wiring of arcuate POMC neurons of rats kept on standard diet predicts vulnerability to weight gain on HFD, suggesting that accurate connectivity in this neuronal system is crucial to maintain energy homeostasis (7). Besides, an abnormal pro-orexigenic synaptic organization that can be acutely reversed by hormonal or pharmacological treatments, has been found in obese mice and rats (13, 42). Thus, it has been suggested that the altered synaptic plasticity in feeding circuits, in addition to steady neuroanatomical defects, might promote DIO (8). Nevertheless, whether synaptic inadequacy is cause or consequence of the metabolic imbalance is still not clear

(43). Here, we report that the lack of hypothalamic PSA strongly accelerated the onset of DIO in mice. Given the role of PSA in synaptic plasticity, our results indicated that a lowest potential for hypothalamic rewiring was responsible for a highest weight gain on HFD. This observation is in line with the well-documented adaptive function of the plasticity in feeding circuits, which follows metabolic fluctuations to maintain energy homeostasis (11, 12).

We found that the acute hyperphagic response upon HFD predicted the excessive weight gain 3 months later in mice. This result is similar to that observed in rats (44). Moreover, the overconsumption negatively correlated with the hypothalamic PSA content, suggesting that pre-existing individual differences in neuronal plasticity of feeding circuits underlie the propensity for obesity. Similar findings have been already reported, linking the level of prefrontal PSA to the susceptibility for addiction-related behaviors (40). The source of variation of constitutive PSA expression in these models is not known. However, previous works have shown that acute stress that predisposes young rats to mood and anxiety during adulthood, as well as chronic stress in adult, cause dramatic alteration in PSA expression in the limbic system (45, 46). These results show that brain PSA synthesis is affected not only by genetic heritage but also by experience.

The removal of hypothalamic PSA was sufficient to cause severe overweight in mice fed a HFD for 1-2 months, suggesting that the inability to properly rewire feeding circuits, depending on the nutritional conditions, makes mice prone to obesity. Since the human hypothalamus is able to undergo hormone-dependent structural plasticity (47), our findings could be relevant to the etiology of obesity in humans as well. Indeed, large-scale studies on the genetic determinants of body mass index have revealed the strong influence of some genes involved in neuronal plasticity (14, 15). Interestingly, the polymorphism in *Negr1*, the gene coding the neuronal growth regulator 1, a cell adhesion molecule involved in the brain remodeling, seems to be causal in high body weight (15). In addition, low level of BDNF in human, a permissive factor of brain plasticity, is associated with obesity during childhood (16). Therefore, it is conceivable that an altered synaptic plasticity could predispose humans to obesity.

EndoN treatment in the hypothalamus did not produce noticeable metabolic alteration in control mice maintained on standard diet, suggesting that the synaptic plasticity in the hypothalamus does not have an impact on food intake or body weight when energy status is balanced. This result was rather unexpected because the responsiveness of the melanocortin system is thought to be dynamically adjusted by synaptic plasticity in healthy condition (11, 12, 48). However, the hormone-driven synaptic reorganization on NPY and POMC neurons has been evidenced after a 24-hr fasting, which causes a dramatic drop of circulating leptin, and it is still unclear whether such synaptic plasticity actually occurs in physiological condition, i.e. in rhythm with meals and moderate fluctuation of the metabolic state (43). Thus, our results suggest that PSA is either merely not involved in the physiological synaptic plasticity of POMC and NPY neurons and thereby in the short-term regulation of food intake, or involved but compensation of energy intake over the circadian time frame may have covered a possible endoN-triggered alteration of meal pattern.

In conclusion, we identified an association between a latent vulnerability trait to obesity in rodents and individual variations in hypothalamic PSA. However, these results does not provide the bases for an early diagnosis because PSA was not examined as a systemic or excreted biomarker, and the 1-week calorie loading-based behavioral assay is hardly compatible to a functional test of metabolic performance in human. Nevertheless, the targeted manipulation of PSA content in mice clearly indicated the causal role of low hypothalamic PSA in accelerating the development

of obesity. Hence, these findings suggest that synaptic plasticity in feeding circuits contributes, at least to a certain extent, to the maintenance of body weight upon hypercaloric pressure. In addition, they strengthen the concept that the propensity to synaptic plasticity is a key factor in the individual susceptibility to develop overweight with obesogenic foods (7, 8).

## Methods

**Animals.** Protocols including manipulation of animals (registration number 853.01) were reviewed and approved by our local Institutional Animal Care and Use Committee ("Comité d'éthique en expérimentation animale n°105"), and were in strict accordance with the European Community guidelines (directive 86/906). Experiments were carried out with 2 months-old male C57Bl/6J mice from Harlan Laboratories. Mice were housed individually, fed either a standard diet (#A04; Safe Laboratories) or a customized highly palatable high-fat diet (Safe Laboratories; see (10) for a complete description). Free access was given for food and water. Food consumption and body weight were measured daily. For tissue collection, mice were killed between 14h00 and 16h00 after a 6-hour fast.

**Repeated bilateral injection of endoneuraminidase N into the medio-basal hypothalamus.** Mice were anesthetized with isoflurane (Abbott) and placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments) in flat skull position. After dermal disinfection with betadine solution, the skin and cranial muscles were incised and the skull was exposed. Small holes were drilled and a double canula with a cap (C235G-0.8/SP 4.6 mm; Plastic One) was inserted to target above the medio-basal hypothalamus (MBH) using the following coordinates: -1.4 mm posterior to the Bregma, ±0.4 mm lateral to the sagittal suture, and -4.6 mm below the skull surface. Canula was fixed with screws and dental cement. After cannulation, animals were kept under controlled temperature and rehydrated with intraperitoneal injections of physiological fluid. Mice were then housed individually and were allowed 1 week for recovery before experiment. For injection, mice were anesthetized with isoflurane, and canula cap was removed. Mice were injected with either vehicle or Endoneuraminidase N (EndoN, 0.28 units per side, 400 nL; Eurobio) at a rate of 100 nL/min, weekly during one month, with a 5.6 mm injector (C235I/SP 5.6 mm; Plastic One) inserted into the canula targeting the MBH. The injector was maintained for an additional 3 min to avoid back leakage. After injection, mice were replaced in their individual cages.

**Bilateral injection of lentiviral vectors into the hypothalamus.** As described above, mice were placed in a stereotaxic apparatus under anesthesia and prepared for acute bilateral injection as described above. Stereotaxic coordinates were: -1.4 mm posterior to the Bregma, ±0.4 mm lateral to the sagittal suture, and -5.6 mm below the skull surface. Mice were injected with lentiviral transduction particles (Sigma-Aldrich) containing a "control shRNA", targeting a non mammalian sequence, or a "target shRNA" for RNAi-mediated knockdown of PST-1. The viral particles-containing solution (400 nL/side; 2.10<sup>9</sup> U/mL) was delivered into the brain parenchyma at a rate of 100 nL/min through a 34G blunt needle mounted on a 10 µL syringe (NanoFil device from WPI) controlled by a micropump (UMP2 from WPI). After injection, the needle was maintained for an additional 3 min to avoid back leakage. Finally, the skin was sutured. After surgery, animals were kept under controlled temperature and rehydrated with intraperitoneal injection of physiological fluid. Mice also received analgesic (ip 0.1 mg/kg buprenorphine; Buprecare, Animalcare) and non-steroidal anti-inflammatory drugs (20mg/kg ibuprofen for 3 days in drink water; Advil, Pfizer). Experiments started after a 3-week rest and observation period.

**Arcuate nucleus dissection.** After sacrifice, brains were quickly removed and immersed in cold PBS solution. A 2 mm coronal slice was cut with a brain matrix. The slice was laid on a 6% agarose block and the arcuate nucleus was dissected under stereomicroscope and cold-light illumination using a scalpel. Tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further experiments (i.e. PSA assay or RT-qPCR).

**PSA assay.** The tissues were lysed and homogenized in RIPA lysis buffer using the TissueLyser system (Qiagen) and 5 mm stainless steel beads (Qiagen). The homogenates were centrifuged 5 min at 5000 g and supernatants were collected for PSA assay using an enzyme-linked immunosorbent assay kit (PSA NCAM ELISA kit; Eurobio) and for protein assay (Bio-Rad Protein Assay Kit II, Biorad).

**RT-qPCR for mRNA assay.** The tissues were lysed and homogenized in 300 µL of lysis buffer (RLT Buffer, Qiagen) using the TissueLyser system (Qiagen) and 5 mm stainless steel beads (Qiagen). Total RNA was isolated on spin columns with silica-based membranes (RNeasy Mini Kit; Qiagen), according to the manufacturer's instructions. DNA digestion was done directly on the columns. RNA was eluted with 30 µL of H<sub>2</sub>O. Aliquots of each extract (1 µL) were checked for RNA concentration, purity and integrity with the Experion electrophoresis system (Bio-Rad) and the Experion RNA StdSens Analysis Kit (Bio-Rad). Total RNAs were then stored at -80°C. A small amount of purified RNAs (0.3 µg) was reverse transcribed in 20 µL of mixture using the High-Capacity cDNA Archive Kit (Qiagen), as indicated by the manufacturer. Synthesized cDNA were then stored at -20°C. Quantitative PCR analysis was performed using inventoried TaqMan Gene Expression Assays and the TaqMan FAST Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems).

TaqMan assay IDs for each gene are as follow: Mm00456815\_m1 for Ncam1, Mm00456289\_m1 for St8sia2, Mm01292231\_m1 for St8sia4, Mm00450174\_m1 for Gne, Mm00839493\_m1 for Polr2a. For each reaction, one aliquot of the 1:20 diluted RT product (2 µL) was used in a final volume of 10 µL and each sample was assayed in triplicate. PCR amplification was run on a StepOne Plus RealTime PCR System (Applied Biosystems) and the StepOne Gene Expression Software was used for gene expression analysis. Quantification was done using the comparative Ct method and Polr2a was used for normalization.

**EchoMRI.** The body composition was assessed using the EchoMRI system (QNMR system EchoMRI-500T, Echo Medical Systems). Before scanning, mice were anesthetized with intraperitoneal injection of a mix of ketamine (100 mg/kg; Kétamine 1000, Virbac) and xylazine (10 mg/kg, Rompum 2%, Bayer HealthCare).

**Statistical analysis.** All data are expressed as means. Error bars indicate standard errors of the mean (SEM). Multiple comparisons between groups were carried out by one- or two-way ANOVA using Prism 5.0 software (GraphPad Software). Post hoc analyses were done without any mathematical correction when main effects reached significance. Before comparison, Bartlett's and Shapiro-Wilk's tests were applied to check equality of variances and to evaluate the normality of the distribution, respectively. Accordingly, we used Bonferroni's or Mann Whitney's test to compare groups. Unpaired t test was used to compare two groups with similar variances. Significant difference was noted \*, \*\*, or \*\*\* on the graphic representation when p value was < 0.05, 0.01, and 0.001, respectively.

## Acknowledgements.

We thank Rita Gerardy-Schahn for fruitful discussion, Christelle Boileau for the editing of the manuscript, and Anne Lefranc and Michel Tavan for their technical assistance. This work was funded by CNRS, INRA, the Burgundy county (FEDER 2010 O0431SGO003S03440), and ANR (ANR-13-JSV1-0003-01).

- Hill JO & Peters JC (1998) Environmental contributions to the obesity epidemic. *Science* 280(5368):1371-1374.
- El-Sayed Moustafa JS & Froguel P (2013) From obesity genetics to the future of personalized obesity therapy. *Nat Rev Endocrinol* 9(7):402-13.
- Friedman JM (2003) A war on obesity, not the obese. *Science* 299(5608):856-858.
- Schwartz MW & Porte D, Jr. (2005) Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307(5708):375-379.
- Eckel RH, et al. (2011) Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *J Clin Endocrinol Metab* 96(6):1654-1663.
- Bouret SG, et al. (2008) Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet-induced obese rats. *Cell Metab* 7(2):179-185.
- Horvath TL, et al. (2010) Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(33):14875-14880.
- Dietrich MO & Horvath TL (2013) Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 2013 Feb;36(2):65-73.
- Sternson SM, Shepherd GM, & Friedman JM (2005) Topographic mapping of VMH --> arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nat Neurosci* 8(10):1356-1363.
- Benani A, et al. (2012) Food intake adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice. *J Neurosci* 32(35):11970-11979.
- Liu T, et al. (2012) Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron* 73(3):511-522.
- Yang Y, Atasoy D, Su HH, & Sternson SM (2011) Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 146(6):992-1003.
- Pinto S, et al. (2004) Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304(5667):110-115.
- Thorleifsson G, et al. (2009) Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet* 41(1):18-24.
- Willer CJ, et al. (2009) Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* 41(1):25-34.
- Han JC, et al. (2008) Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N Engl J Med* 359(9):918-927.
- Rutishauser U (2008) Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 9(1):26-35.
- Muhlenhoff M, Rollenhagen M, Werneburg S, Gerardy-Schahn R, & Hildebrandt H (2013) Polysialic Acid: Versatile Modification of NCAM, SynCAM 1 and Neuropilin-2. *Neurochem Res*.
- Markram K, Gerardy-Schahn R, & Sandi C (2007) Selective learning and memory impairments in mice deficient for polysialylated NCAM in adulthood. *Neuroscience* 144(3):788-796.
- Becker CG, et al. (1996) The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J Neurosci Res* 45(2):143-152.
- Venero C, et al. (2006) Hippocampal up-regulation of NCAM expression and polysialylation plays a key role on spatial memory. *Eur J Neurosci* 23(6):1585-1595.
- Seymour CM, Foley AG, Murphy KJ, & Regan CM (2008) Intraventricular infusions of anti-NCAM PSA impair the process of consolidation of both avoidance conditioning and spatial learning paradigms in Wistar rats. *Neuroscience* 157(4):813-820.
- Markram K, Lopez Fernandez MA, Abrous DN, & Sandi C (2007) Amygdala upregulation of NCAM polysialylation induced by auditory fear conditioning is not required for memory

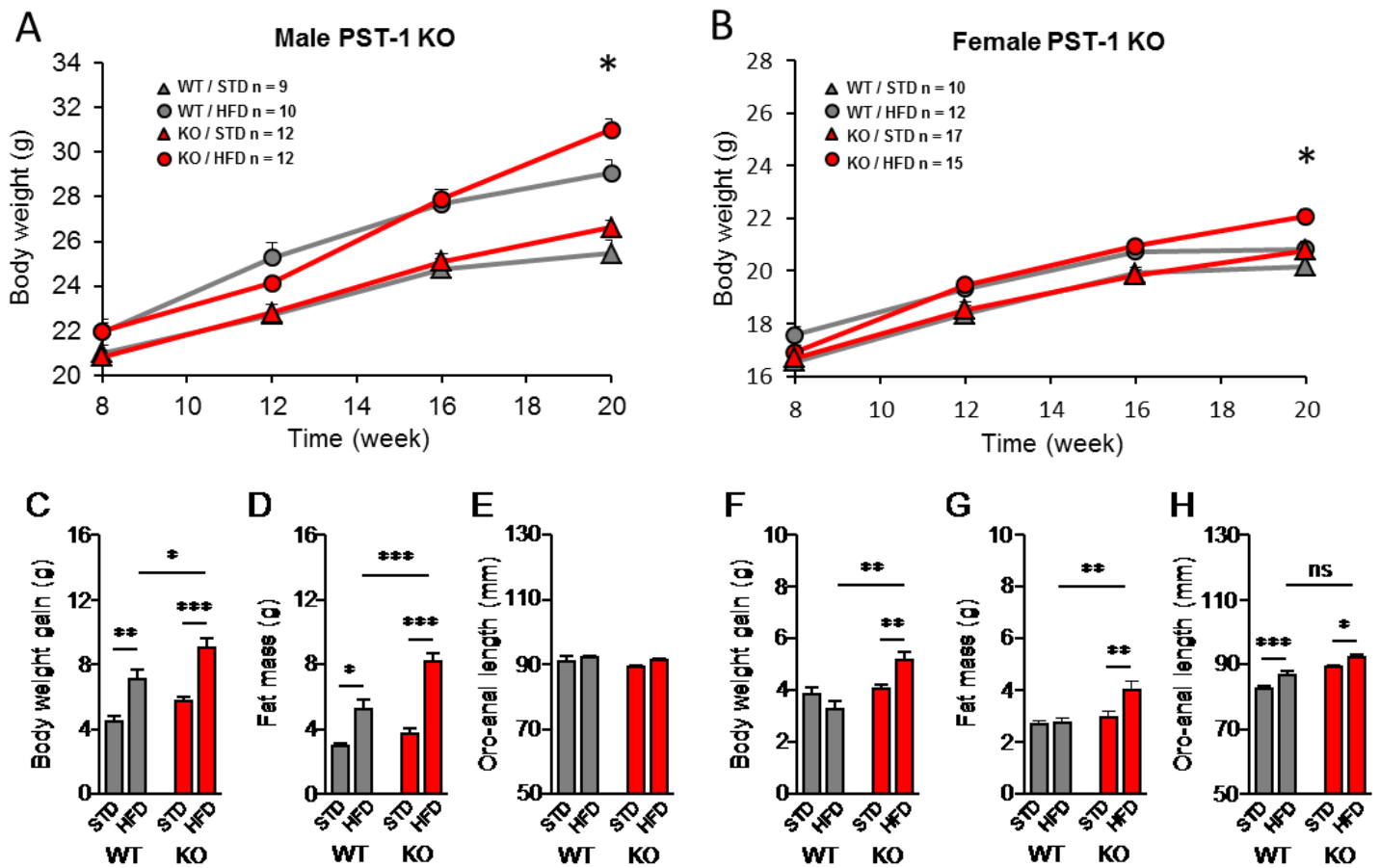
681	formation, but plays a role in fear extinction. <i>Neurobiol Learn Mem</i> 87(4):573-582.	
682	24. Lopez-Fernandez MA, et al. (2007) Upregulation of polysialylated neural cell adhesion	749
683	molecule in the dorsal hippocampus after contextual fear conditioning is involved in long-	750
684	term memory formation. <i>J Neurosci</i> 27(17):4552-4561.	751
685	25. Fedorkova L, Rutishauser U, Prosser R, Shen H, & Glass JD (2002) Removal of polysialic	752
686	acid from the SCN potentiates nonphotic circadian phase resetting. <i>Physiol Behav</i> 77(2-	753
687	3):361-369.	754
688	26. Prosser RA, Rutishauser U, Ungers G, Fedorkova L, & Glass JD (2003) Intrinsic role of	755
689	polysialylated neural cell adhesion molecule in photic phase resetting of the Mammalian	756
690	circadian clock. <i>J Neurosci</i> 23(2):652-658.	757
691	27. Glass JD, et al. (2000) Polysialylated neural cell adhesion molecule modulates photic signaling	758
692	in the mouse suprachiasmatic nucleus. <i>Neurosci Lett</i> 280(3):207-210.	759
693	28. Theodosis DT, Bonhomme R, Vitiello S, Rougon G, & Poulain DA (1999) Cell surface	760
694	expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological	761
695	neuronal and glial plasticity. <i>J Neurosci</i> 19(23):10228-10236.	762
696	29. Hoyk Z, Pardeuz A, & Theodosis DT (2001) The highly sialylated isoform of the neural cell	763
697	adhesion molecule is required for estradiol-induced morphological synaptic plasticity in the	764
698	adult arcuate nucleus. <i>Eur J Neurosci</i> 13(4):649-656.	765
699	30. El Maarouf A, Kolesnikov Y, Pasternak G, & Rutishauser U (2005) Polysialic acid-induced	766
700	plasticity reduces neuropathic insult to the central nervous system. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>	767
701	102(32):11516-11520.	768
702	31. El Maarouf A, Kolesnikov Y, Pasternak G, & Rutishauser U (2012) Neural cell adhesion	769
703	molecule and its polysialic acid moiety exhibit opposing and linked effects on neuropathic	770
704	hyperalgesia. <i>Exp Neurol</i> 233(2):866-870.	771
705	32. Jungnickel J, et al. (2009) Level and localization of polysialic acid is critical for early	772
706	peripheral nerve regeneration. <i>Mol Cell Neurosci</i> 40(3):374-381.	773
707	33. Ong E, et al. (1998) Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed	774
708	by two polysialyltransferases, PST and STX. <i>Glycobiology</i> 8(4):415-424.	775
709	34. Hildebrandt H, Becker C, Murau M, Gerardy-Schahn R, & Rahmann H (1998) Heteroge-	776
710	neous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat	777
711	brain development. <i>J Neurochem</i> 71(6):2339-2348.	778
712	35. Butler AA, et al. (2001) Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses	779
713	to increased dietary fat. <i>Nat Neurosci</i> 4(6):605-611.	780
714		781
715		782
716		783
717		784
718		785
719		786
720		787
721		788
722		789
723		790
724		791
725		792
726		793
727		794
728		795
729		796
730		797
731		798
732		799
733		800
734		801
735		802
736		803
737		804
738		805
739		806
740		807
741		808
742		809
743		810
744		811
745		812
746		813
747		814
748		815
		816

## Objectif 3 : évaluer les effets d'une déficience innée de plasticité synaptique dans un modèle d'obésité

Nous avons vu dans l'Objectif 1 que PSA était nécessaire pour établir une réponse comportementale correcte lors de l'introduction d'un régime obésogène. Dans l'Objectif 2, nous avons montré que l'induction d'un défaut de plasticité synaptique dans l'hypothalamus rendait vulnérable à l'obésité lors d'une exposition chronique à un régime hyperlipidique, hypercalorique. Nous avons ensuite recherché si des individus présentant un défaut inné affectant les capacités de plasticité synaptique n'étaient pas plus vulnérables au développement de l'obésité que des individus sains lors d'une exposition longue à un régime HFD.

### 1. Effet du régime HFD sur les animaux PST-1 KO

Pour cela, des souris mâles et femelles de 8 semaines PST-1 KO ont été nourries pendant 3 mois avec un régime HFD. Ces souris présente une déficience totale de PST-1 et présentent des troubles adaptatifs et de la mémoire. Après 3 mois d'exposition au régime HFD, les mâles et femelles KO développent un surpoids (**Figure 38A et B**) et présentent un gain de poids plus important (**Figure 38C et F**) par rapport aux contrôles. Ce surpoids, après mesure de l'adiposité par echoMRI, correspond à une accumulation de masse grasse dans l'organisme (**Figure 38D et G**). Il est intéressant de noter que les femelles sauvages ne développent pas de surpoids après 3 mois de régime, contrairement aux femelles KO (**Figure 38F et G**). L'ensemble de ces données montrent que des individus déficient pour PST-1, et donc en PSA, développent une obésité importante lorsqu'ils sont soumis à un régime HFD. La distance oro-anale permet de déterminer s'il n'a pas des anomalies de croissance. Elle reste inchangée chez les mâles (**Figure 38E**). En revanche, chez les femelles, celle-ci augmente lors de l'exposition au HFD (**Figure 38H**). Toutefois, il n'y a pas de différence chez les femelles entre le groupe WT/HFD et KO/HFD, suggérant un effet du HFD plus que du génotype sur des anomalies de croissance.



**Figure 38 : Les souris PST-1 KO sont vulnérables à l'obésité**

Evolution du poids des souris mâles (A) et femelles (B) de 8 semaines soumis à 12 semaines de régime HFD ou de régime standard. \*  $p < 0,05$  ANOVA two ways et test de Bonferroni post hoc vs WT/HFD. (C) et (F) gain de poids après les 12 semaines de régimes HFD. (D) et (G) adiposité à terme mesurée par echoMRI après les 12 semaines de régimes HFD. (E) et (H) distance oro-anale après les 12 semaines de régimes HFD. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  Test Mann-Whitney. Moyennes  $\pm$  SEM.

## 2. Discussion

Dans cette étude préliminaire, nous avons montré que des individus présentant un défaut inné de plasticité synaptique développent une obésité plus importante lorsqu'ils sont soumis à un régime obésogène. Dans l'Objectif 1, nous avons observé que les animaux PST-1 KO ne régulaient pas leur prise énergétique lorsque le régime HFD est introduit. Cette première expérience menée dans le laboratoire de Toulouse n'a pas été reproductible à Dijon. En effet, la prise énergétique des animaux KO étaient similaire à ceux des animaux sauvages pendant la première semaine après l'introduction du régime HFD. Les animaux, bien qu'ayant la même mutation, provenaient de deux élevages distincts (Animalerie de l'UPS de Toulouse et animalerie du laboratoire de Rita Gerardy-Schahn en Allemagne pour Dijon). Il se peut qu'une dérivation de la lignée soit à l'origine de cette différence comportementale.

Il serait important d'étudier les causes de ce surpoids. En premier lieu, évaluer précisément la prise alimentaire de ces animaux durant la période d'exposition au HFD. De plus, il conviendrait d'étudier les dépenses énergétiques de ces mutants, à différents temps, lors de l'exposition longue au régime HFD : est-ce que la mutation elle-même provoque un défaut des dépenses énergétiques aboutissant au surpoids des animaux, ou bien le développement plus rapide de l'obésité chez ces animaux altère les dépenses énergétiques.

Des résultats préliminaires, non présentés dans ce manuscrit, montrent que les mâles KO nourris pendant 3 mois avec le HFD présentent une glycémie à jeun plus élevée que les animaux sauvages, indiquant une perturbation de l'homéostasie glucidique. Il est important de définir plus clairement la nature de cette perturbation : s'agit-il d'une conséquence indirecte, issue du développement de l'obésité chez ces animaux ou d'une perturbation du contrôle nerveux de l'homéostasie glucidique. Une étude montre qu'il existe différentes sous population de cellules  $\beta$  pancréatiques relatives à l'expression de PSA-NCAM chez le rat (faible expression et forte expression). Les cellules ayant beaucoup de PSA-NCAM sont plus à même de sécréter de l'insuline <sup>236</sup>. Dans notre modèle KO PST-1, il serait donc intéressant de doser la quantité d'insuline, pouvant expliquer la perturbation de l'homéostasie glucidique d'origine pancréatique. Cependant, comme il a été présenté dans la partie 1, lors d'une phase d'exposition courte au régime HFD, aucun lien n'a été trouvé entre l'homéostasie glucidique et le niveau de PSA dans l'hypothalamus.

## Objectif 4 : évaluer les effets d'un défaut de plasticité hypothalamique dans un modèle d'athérosclérose

Le cholestérol est insoluble dans le sang et requiert un transport sur des complexes lipoprotéiques de différentes densités. On distingue les *very low-density* et les *low-density lipoproteins* (VLDL et LDL) dérivant du foie et acheminant le cholestérol aux organes périphériques, et les *high-density lipoproteins* (HDL), qui ramènent le cholestérol excédentaire de la périphérie vers le foie (pour une métabolisation ultérieure) ou qui le distribuent aux autres cellules. Chez l'homme, la constance du ratio LDL/HDL est fondamentale. D'ailleurs, le « mauvais cholestérol », correspondant aux LDL en excès, contribue à la formation des plaques d'athérome dans la paroi artérielle. Celui-ci est capté par les macrophages, qui se transforment en cellules spumeuses en se chargeant de vésicules lipidiques. Ces cellules s'infiltrent dans la paroi des vaisseaux, s'accumulent au niveau sous-endothélial, et obstruent finalement le réseau vasculaire.

L'activité du système à mélanocortine varie selon la perception de signaux de satiété et d'adiposité <sup>119 237 238</sup>. En retour, le système à mélanocortine déclenche des réponses comportementales et végétatives qui ajustent la prise alimentaire et les dépenses énergétiques afin de maintenir l'homéostasie énergétique. Par exemple, le système à mélanocortine contrôle la production hépatique de glucose et la thermogenèse dans le tissu adipeux brun <sup>239 240</sup>. De plus, le système à mélanocortine agit sur le métabolisme lipidique périphérique. En effet, l'inhibition des récepteurs à mélanocortine chez le rat favorise le captage des acides gras dans le tissu adipeux blanc, ainsi que la synthèse et l'accumulation de graisses sous forme de triglycérides, alors que leur activation stimule la mobilisation des lipides à partir de ce tissu <sup>241</sup>. Ce contrôle sur l'orientation des flux de nutriments en périphérie est relayé par le système nerveux sympathique. En ce qui concerne le foie, les neurones à NPY stimulent la production des lipoprotéines VLDL qui portent les triglycérides, augmentant ainsi leur teneur dans le sang <sup>242 243</sup>, un effet transmis également par le système sympathique <sup>244</sup>. Les neurones à POMC semblent jouer sur l'internalisation hépatique des lipoprotéines HDL <sup>245</sup>. Toutes ces observations montrent que le système à mélanocortine contrôle directement les taux de cholestérol circulant.

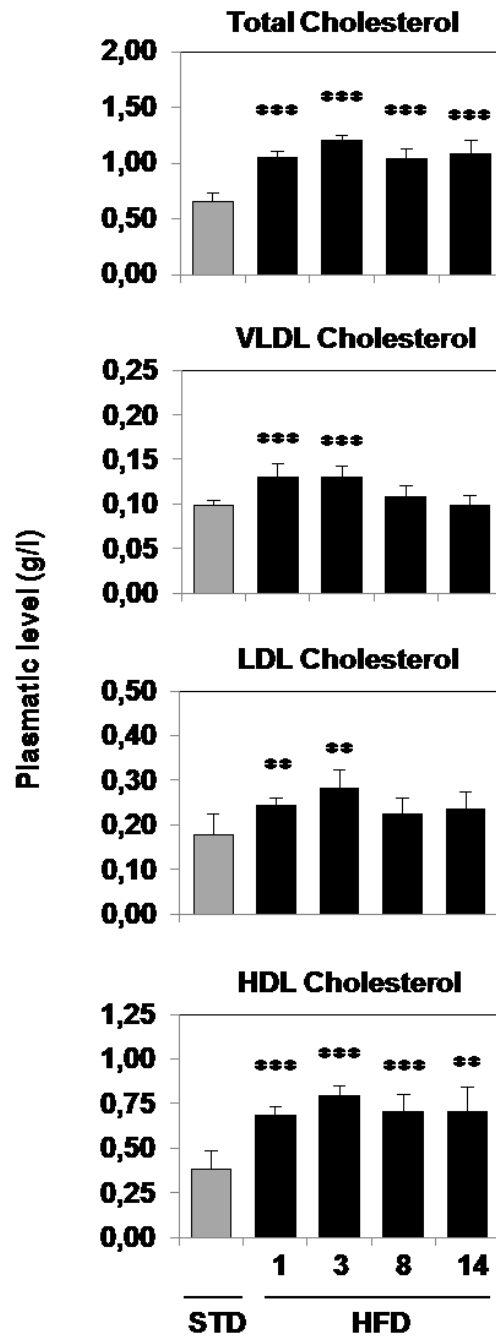
Nous avons précédemment montré qu'un processus de plasticité synaptique du système à mélanocortine, dépendant de PSA dans l'hypothalamus, est mis en jeu lors de la régulation homéostatique de la prise alimentaire. Une défaillance dans ce système, rend vulnérable au développement de l'obésité lors de l'ingestion chronique de nourriture hypercalorique et hyperlipidique. Nous avons voulu savoir si la plasticité synaptique avait une influence directe sur le métabolisme périphérique. Manifestement, il existe un mécanisme homéostatique qui assure la constance des niveaux de lipoprotéines circulantes transportant le cholestérol. L'ajustement

de ces paramètres biologiques pourrait être gouverné au moins en partie par un remodelage PSA-dépendant des connexions synaptiques du système à mélanocortine. De plus, une aptitude moindre à produire un phénomène de plasticité hypothalamique pourrait altérer les niveaux de lipoprotéines plasmatiques et s'avérer être un facteur pro-athérogène.



## 1. Régulation homéostatique du cholestérol circulant

Avant toute chose, nous avons voulu savoir s'il y avait une régulation homéostatique du cholestérol circulant lors d'un changement d'alimentation. Pour cela, des souris ont été exposées à 1, 3, 8 et 14 jours de régime HFD et des analyses de la concentration plasmatique du cholestérol et des différentes lipoparticules ont été effectuées. Nous avons tout d'abord observé que la concentration plasmatique de cholestérol augmente après l'introduction du régime HFD et ne revient jamais à des concentrations équivalentes au régime STD. Cependant, si l'on s'intéresse à la répartition du cholestérol dans les différentes lipoparticules, on remarque que les niveaux plasmatiques de VLDL et LDL sont rapidement augmentés (en 24 heures seulement) après l'introduction d'un régime gras. Toutefois, ces niveaux ont été normalisés en une semaine alors que le régime s'est poursuivi. Ceci pourrait traduire un contrôle homéostatique qui s'exerce sur le cholestérol circulant lorsque son niveau s'élève en réponse à une alimentation riche, à forte teneur en cholestérol. Le cholestérol HDL quant à lui, reste élevé et sa concentration ne revient pas à un niveau basal (**Figure 39**).

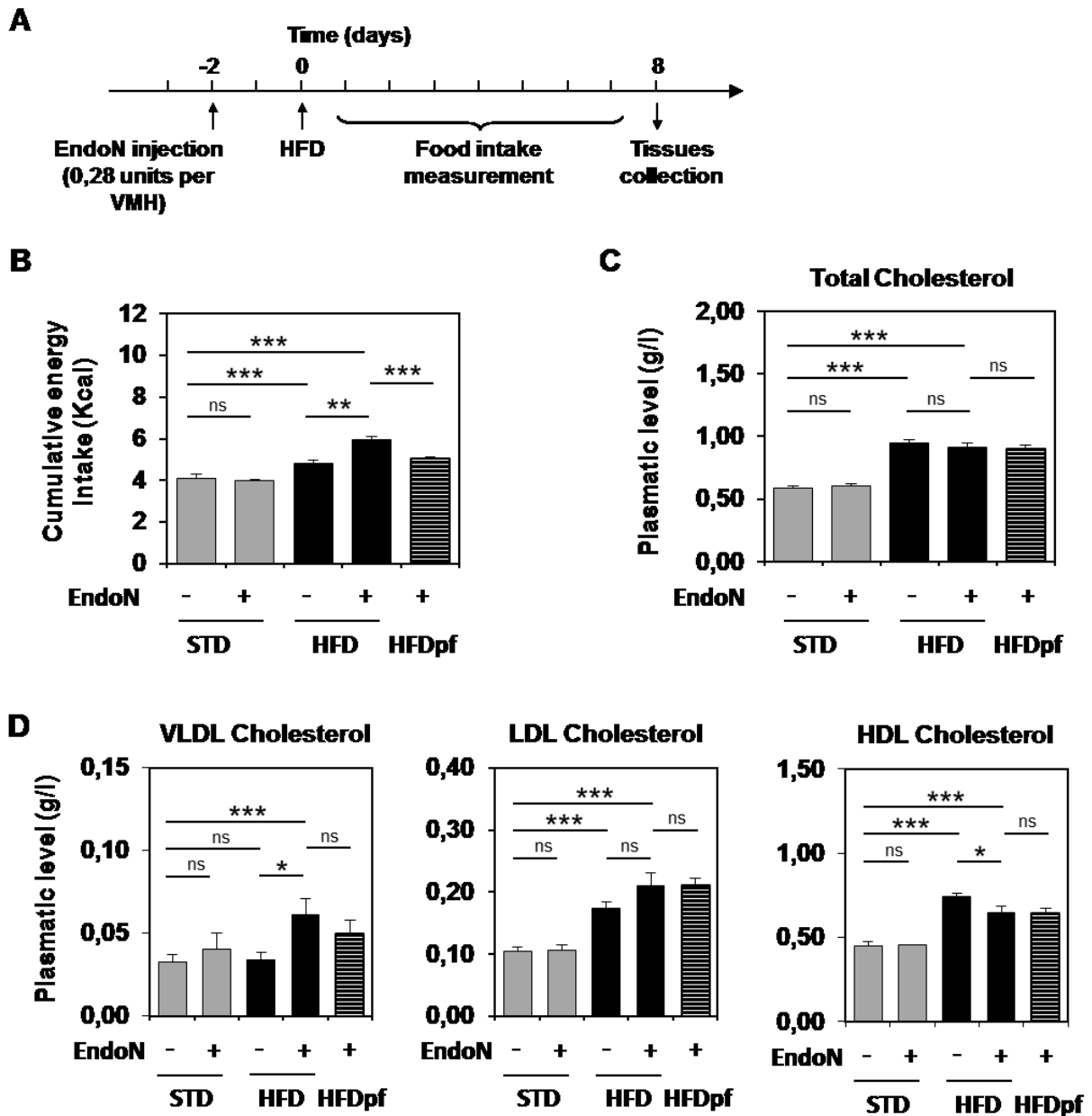


**Figure 39 : Régulation homéostatique du cholestérol circulant**

Des souris de 8 semaines ont été exposées à 1, 3, 8 ou 14 jours de régimes HFD. Le sang a été prélevé en intracardiaque. « Cholestérol total » représente la quantité de cholestérol plasmatique. Les différentes fractions ont été séparées par ultracentrifugation.  $n = 6$  STD,  $n = 6$  J1,  $n = 6$  J3,  $n = 6$  J8,  $n = 6$  J14. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  Test Mann et Whitney. Moyenne  $\pm$  SEM.

## 2. Rôle de PSA hypothalamus dans l'homéostasie du cholestérol circulant

Nous avons voulu savoir si la régulation homéostatique périphérique du cholestérol circulant était dépendante de phénomène de plasticité synaptique impliquant PSA dans l'hypothalamus. Pour évaluer ce rôle, nous avons inhibé localement et durablement la signalisation de PSA dans l'hypothalamus de souris adultes. Pour cela, nous avons injecté par stéréotaxie dans l'hypothalamus des souris de l'EndoN avant la mise sous régime gras (**Figure 40A**). Nous avons précédemment démontré que l'injection intra-parenchymale bilatérale d'EndoN retire spécifiquement toute trace de PSA pendant au moins une semaine dans l'hypothalamus et bloque le remodelage synaptique induit par la mise sous régime gras (Objectifs 1 et 2). Suite à l'injection d'EndoN, l'augmentation temporaire de la prise énergétique n'est plus régulée et conduit à un apport énergétique plus important sous régime gras. Ceci nous permet de voir que le traitement a bien été effectif (**Figure 40B**). En ce qui concerne notre nouvelle étude, l'administration d'EndoN n'a pas modifié les taux de cholestérol total circulant chez les souris sous régime standard ou HFD pendant une semaine (**Figure 40C**). En revanche, le traitement EndoN a empêché la normalisation des niveaux de VLDL-Cholestérol qui survient normalement après une semaine de régime HFD, et a limité l'augmentation de HDL-Cholestérol induite normalement par le régime HFD (**Figure 40D**). Il faut noter qu'un groupe supplémentaire de souris permet de discriminer l'effet du traitement *per se*, par rapport à l'effet de l'hyperphagie secondaire provoquée par le traitement. Il s'agit de souris *pair-fed* qui reçoivent le traitement et dont la ration alimentaire est restreinte et similaire à celle des souris nourries sous régime HFD qui ne reçoivent pas le traitement (**Figure 40B**). Ainsi ces données montrent que PSA hypothalamique est nécessaire pour normaliser les niveaux des VLDL circulants et pour augmenter les niveaux de HDL durant une alimentation grasse (**Figure 40D**). Par extension, nos résultats suggèrent que la plasticité cérébrale semble être requise pour adapter le métabolisme périphérique du cholestérol en fonction de l'alimentation.



**Figure 40 : Régulation centrale du cholestérol circulant par PSA**

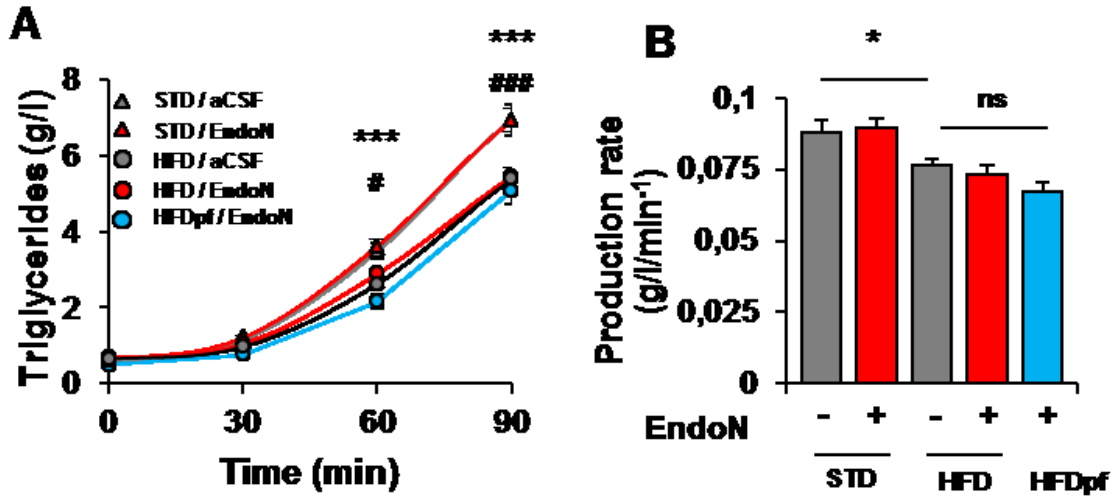
(A) Protocole d'injection d'EndoN dans l'hypothalamus médiobasal et suivi expérimental. (B) Prise énergétique cumulée sur 8 jours. (C) Cholestérol plasmatique total après 8 jours de régime et traitement hypothalamique. (D) Fraction VLDL, LDL et HDL plasmatique séparées par ultracentrifugation après 8 jours de régime et traitement hypothalamique. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  Test Mann Whitney.  $n = 10$  STD/aCSF,  $n = 6$  STD/EndoN,  $n = 10$  HFD/aCSF,  $n = 11$  HFD/EndoN,  $n = 11$  HFDpf/EndoN Moyennes  $\pm$  SEM.

### 3. Implication de PSA dans la production des VLDL circulantes

Lorsque la plasticité synaptique est inhibée par injection d'EndoN dans le parenchyme nerveux de l'hypothalamus, nous avons observé une augmentation du taux de VLDL circulant après une semaine de régime HFD. Cette augmentation peut être due à une production anormale de VLDL. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé un test fonctionnel chez la souris nous permettant de déterminer la cinétique de production des VLDL. Lorsque les animaux subissent un jeun court (environ 6h), les triglycérides (TG) circulants sont uniquement portés par les VLDL. La lipoprotéine lipase (LPL) transforme les VLDL en LDL. En inhibant la LPL par injection *i.p* de poloxamer, nous pouvons réaliser une cinétique de production des VLDL en mesurant simplement les triglycérides plasmatiques à différents intervalles.

Ainsi, selon le même protocole d'injection que dans la partie 2 de l'Objectif 4 (**Figure 40A**), des souris nourries en régime STD ou HFD, traitées avec du véhicule ou de l'EndoN ont été utilisées pour établir une cinétique de production des VLDL. Nous avons observé que le traitement à l'EndoN chez les souris nourries en régime standard n'a pas perturbé la production des VLDL. En revanche, lorsque les souris ont été soumises à un régime HFD pendant une semaine, la production de VLDL a diminué de manière significative (**Figure 41A et B**), suggérant un processus adaptatif limitant la surproduction de VLDL pendant le régime gras. Dans ce contexte, le traitement à l'EndoN n'a pas modifié les vitesses de production des VLDL hépatiques ni chez les souris nourries en régime STD ni chez les souris nourries en HFD.

L'ensemble de ces données nous suggère que le régime alimentaire semble être le seul facteur capable de modifier la production de VLDL. En revanche, le traitement à l'EndoN dans l'hypothalamus n'a pas affecté la production de VLDL chez les souris indiquant que PSA ne participe pas au contrôle de la production de VLDL hépatique.



**Figure 41 : Production de VLDL circulantes**

(A) Cinétique de production de VLDL circulantes après une semaine de régime STD ou HFD. À  $t(0)$  un prélèvement de sang est effectué et le poloxamer injecté par i.p. \*\*\*  $p < 0,001$  ANOVA two ways et test de Bonferroni post hoc STD/aCSF vs HFD/aCSF et HFDpf/EndoN ; #  $p < 0,05$  ; ###  $p < 0,001$  STD LCR vs HFD EndoN. (B) Vitesse de production de VLDL circulantes après une semaine de régime STD ou HFD calculée à partir de la cinétique selon une régression linéaire avec les points  $t(30)$ ,  $t(60)$  et  $t(90)$ . \*  $p < 0,05$  test Mann Whitney.  $n = 12$  STD/aCSF,  $n = 13$  STD/EndoN,  $n = 22$  HFD/aCSF,  $n = 13$  HFD/EndoN et  $n = 6$  HFDpf EndoN. Moyennes  $\pm$  SEM.

#### 4. Implication de PSA dans le développement de l'athérosclérose

Nous avons remarqué qu'une régulation centrale PSA dépendante, du cholestérol circulant se mettait en place pendant la première semaine après introduction d'une diète grasse hypercalorique. La déplétion de PSA hypothalamique empêche la normalisation du taux de VLDL. Or une élévation chronique des VLDL circulants est un facteur athérogène. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'un faible taux de PSA hypothalamique pouvait être à l'origine de l'athérosclérose. La souris sauvage étant un mauvais modèle d'athérosclérose, nous avons utilisé la souris déficiente pour le récepteur au LDL (LDLR KO), afin d'étudier la sensibilité des animaux à générer des dépôts graisseux dans les vaisseaux lorsqu'ils sont soumis à un régime HFD.

Nous avons exposé dans un premier temps des souris LDLR KO de 8 semaines à un régime STD ou au régime HFD pour vérifier le caractère athérogénique du régime HFD que l'on a utilisé. Après 2 mois d'exposition, les souris ont été sacrifiées, les aortes récupérées et colorées à l'huile rouge afin de quantifier par traitement d'image l'aire des dépôts. Lorsque les souris LDLR KO ont été exposées deux mois à notre régime HFD, celles-ci ont développé des dépôts dans l'aorte et notamment au niveau de la crosse-aortique (**Tableau 5**). Par la suite, nous avons invalidé l'expression de Pst1 chez des animaux LDLR afin de voir si la réduction chronique de PSA dans l'hypothalamus pouvait être un facteur de risque supplémentaire dans l'étiologie de l'athérosclérose. Les souris, recevant les particules contrôles ou le vecteur contenant le shRNA ciblant PST-1, ont été nourries au régime HFD pendant 2 mois. Les animaux ont développé significativement plus de dépôts dans les aortes que les souris contrôles.

**Tableau 5 : Quantification des dépôts graisseux dans les aortes des souris LDLR KO**

\*\*\*  $p < 0,001$  ANOVA one way test Bonferroni post hoc vs STD. ### \*\*\*  $p < 0,001$  ANOVA one way test Bonferroni post hoc vs HFD.  $n = 7$  STD,  $n = 9$  HFD,  $n = 8$  HFD + PST-1. Moyennes  $\pm$  SEM.

Régime et traitement	Aire des dépôts (mm <sup>2</sup> )	Statistiques
STD	0,011 $\pm$ 0,004	
HFD	0,454 $\pm$ 0,151	***
HFD + PST-1	2,184 $\pm$ 0,345	###

## 5. Discussion

Nous avons déjà vu que la surexpression de PSA au niveau de l'hypothalamus lors de l'introduction d'un régime HFD permet le contrôle de la prise alimentaire et du poids corporel via des mécanismes de plasticité synaptique. Ici, ces résultats préliminaires nous ont indiqué que le phénomène de plasticité synaptique PSA dépendant contrôle en plus l'homéostasie du cholestérol circulant.

Tout d'abord, nous avons remarqué qu'il existe une régulation homéostatique de la répartition du cholestérol circulant lors de l'introduction du régime HFD. Nous avons observé une augmentation du taux de LDL et VLDL après l'introduction du régime HFD, mais ce phénomène était transitoire. Cette adaptation était dépendante de PSA-NCAM dans l'hypothalamus puisqu'un traitement à l'EndoN a empêché la régulation du taux de VLDL et a diminué le taux de HDL. Précédemment nous avons montré une augmentation du nombre de mEPSC sur les neurones POMC après une semaine de HFD, suggérant une augmentation de l'activité de ces neurones. Ces résultats sont surprenants si on se réfère à la littérature qui indique que l'activation du système à mélanocortine diminue le taux de HDL de circulant <sup>245</sup>. Or ici, le traitement à l'EndoN, réduisant l'activité des neurones POMC, a fait diminuer le taux de HDL. Nos résultats sont en accord avec le rôle adaptatif catabolique des neurones POMC alors que la baisse du taux de HDL rapportée dans la littérature après activation de ces neurones apparaît paradoxale. Il est également connu que l'activation des neurones NPY augmente le taux de VLDL circulant <sup>244</sup>. Or nous avons observé une normalisation du taux de VLDL après une semaine de HFD, bloquée par le traitement hypothalamique à l'EndoN. Ces résultats sont cohérents si l'on fait l'hypothèse que les neurones NPY sont mis au repos après introduction du régime gras afin de maintenir la balance énergétique. Cette mise au repos pourrait être liée à des phénomènes de plasticité synaptique PSA-dépendant, affectant l'activité des neurones NPY.

Nous avons ensuite recherchés les mécanismes périphériques mis en jeu dans le contrôle des rapports VLDL + LDL / HDL. Celui-ci est influencé par la production de VLDL hépatique, mais aussi par le captage et par l'élimination. Dans un premier temps, nous évalués la production des VLDL puisque le traitement hypothalamique à l'EndoN a modifié la teneur en VLDL après une semaine de HFD. Pourtant nous n'avons pas mis en évidence un effet de l'EndoN sur la production aberrante de VLDL lors des expériences d'injection *i.p* de Poloxamer. En effet, les groupes de souris nourris avec du HFD ont une production moins importante de VLDL que les souris nourries en régime STD. La réduction de la production hépatique de VLDL sous régime gras pourrait être une adaptation indépendante d'une régulation hypothalamique par PSA. D'autres mécanismes sont donc mis en jeu dans notre modèle. On peut émettre l'hypothèse d'un rôle de l'intestin, puisqu'après une semaine de HFD, une adaptation cellulaire et moléculaire freinant la sécrétion de triglycérides a auparavant été décrite <sup>246</sup>. Il serait donc intéressant par la



suite d'étudier l'axe cerveau – intestin. Il a notamment été montré que la leptine pouvait induire des phénomènes centraux de plasticité <sup>126</sup> et qu'une inhibition centrale de sa voie de signalisation déclenchait des stéatoses hépatiques via une diminution de l'activité nerveux sympathique <sup>247</sup>. Il conviendrait d'étudier les gènes hépatiques clefs impliqués dans la synthèse, sécrétion, capture et élimination des lipoparticules et du cholestérol. Cette étude est en cours de réalisation afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de cette régulation.

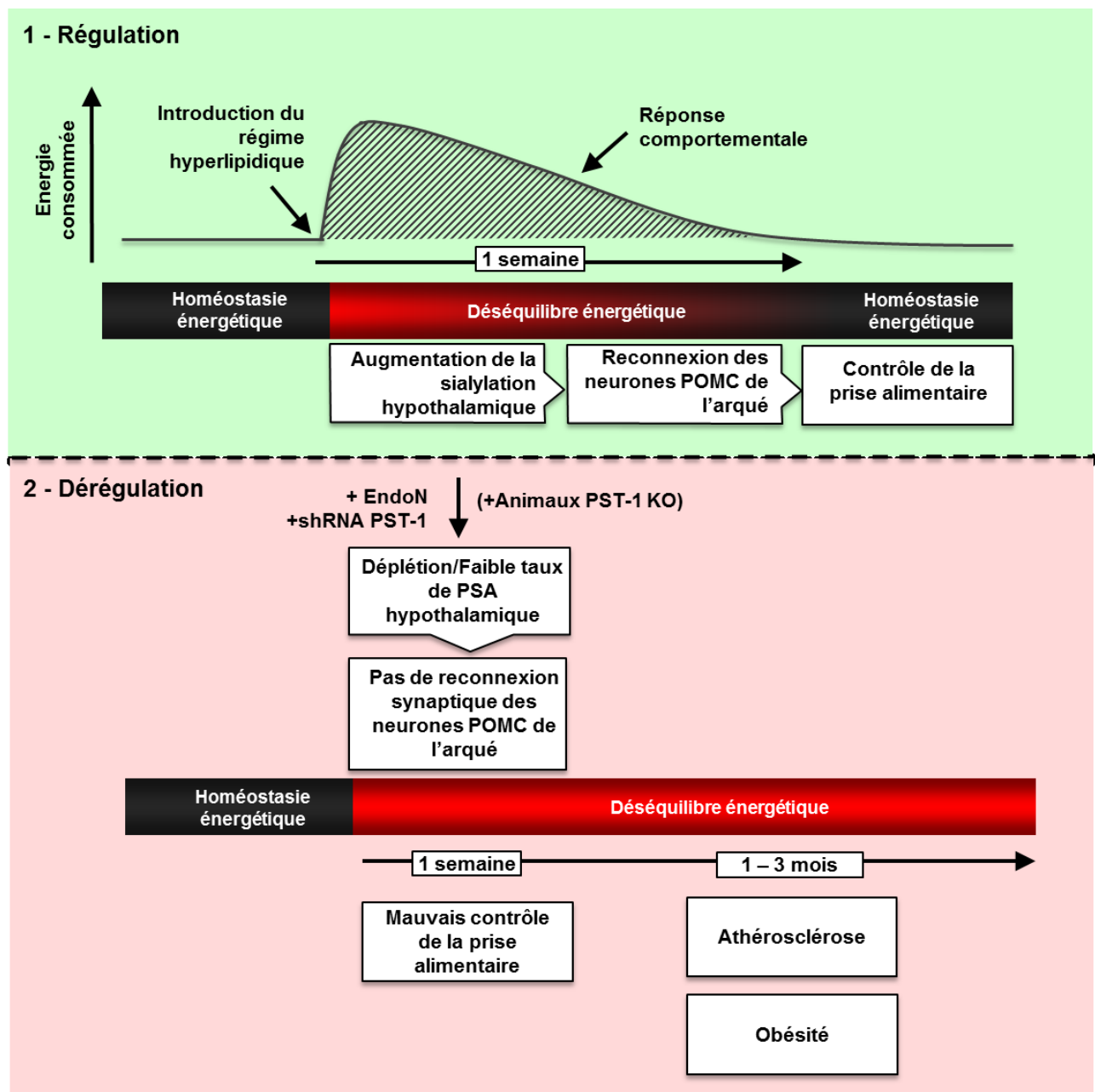
Malgré tout, même si nous n'avons pas encore décrit les mécanismes centraux et périphériques permettant la régulation du cholestérol circulant par PSA dans l'hypothalamus, une réduction de la sialylation hypothalamique a favorisé les dépôts graisseux dans l'aorte. Toutefois, à l'heure actuelle, nous ne savons pas s'il s'agit d'un lien direct de PSA sur le cholestérol circulant, ou d'une complication de l'obésité induite dans ce modèle.

Dans tous les cas, les phénomènes de plasticité synaptique apparaissent comme de nouveaux régulateurs du cholestérol circulant.

# Conclusion

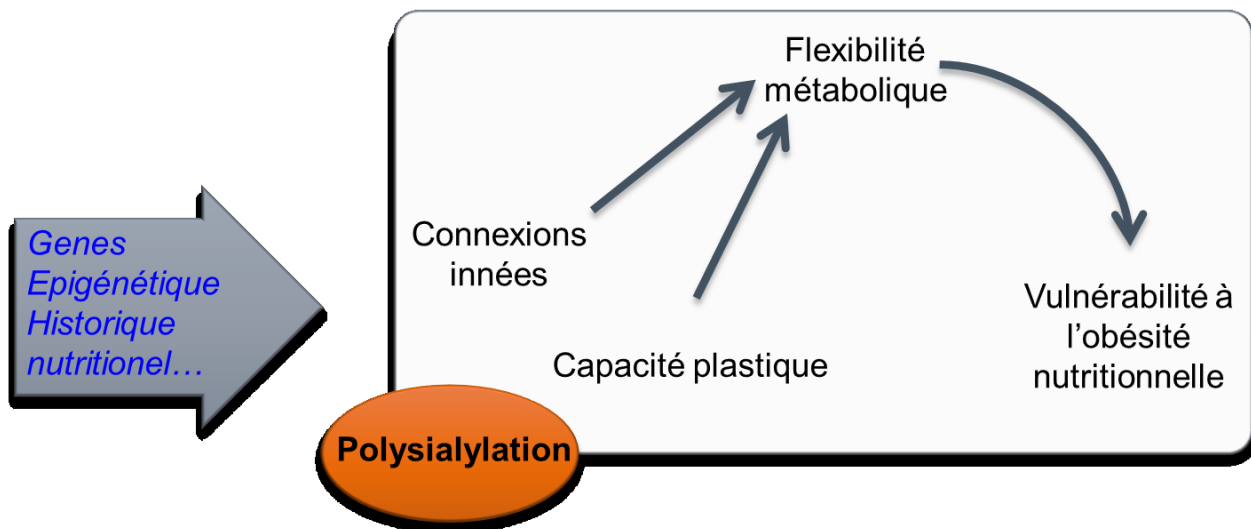
L'ensemble de ces travaux nous conduit à proposer le modèle suivant (Figure 42). L'introduction d'un régime HFD chez la souris adulte provoque une rupture de l'homéostasie énergétique. Ceci est perçu par l'hypothalamus, qui, selon des mécanismes encore inconnus, déclenche une augmentation de la sialylation, permettant aux neurones POMC de se reconnecter. Cet événement de plasticité synaptique augmente ainsi le tonus anorexigène et permet de freiner de la prise alimentaire et de restaurer l'homéostasie énergétique. Si les événements de plasticité synaptique hypothalamique sont empêchés par réduction de la sialylation, le comportement alimentaire n'est plus contrôlé. Il apparaît dès lors un désordre métabolique dès les premiers jours d'exposition au régime HFD. Si ce désordre se poursuit, une obésité se développe ainsi que des complications cardiovasculaires comme l'athérosclérose.

Figure 42 Modèle proposé

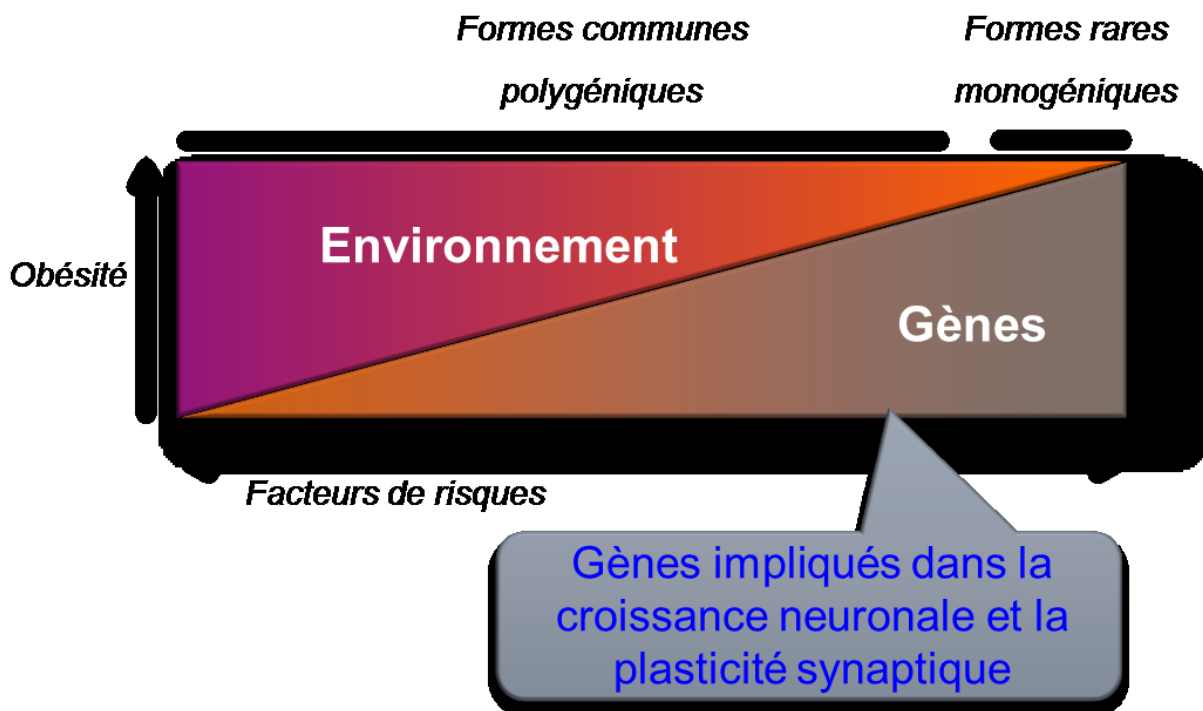


## Perspectives

L'origine de la variation naturelle du niveau de PSA dans l'hypothalamus n'a pas été étudiée dans cette étude. La flexibilité relative des circuits neuronaux de la prise alimentaire pourrait être sous la dominance de pressions génétiques, épigénétiques et environnementales <sup>205</sup>. Ainsi le niveau de PSA pourrait être influencé par l'histoire personnelle et les facteurs environnementaux. D'ailleurs, un stress juvénile altère profondément le niveau de PSA dans l'hypothalamus et ceci est associé à une vulnérabilité à la dépression et au stress chronique. Nous sommes en train de rechercher comment PSA est régulée de manière épigénétique et quels sont les facteurs pouvant influencer son abondance dans l'hypothalamus.



Nous pensons que nos résultats fondamentaux obtenus chez la souris pourraient être retrouvé chez l'Homme. En effet, on sait que c'est l'interaction entre l'environnement et les gènes qui expliquent les formes communes d'obésité. Récemment, des études de criblage génétique à haut débit ont permis de mettre en évidence l'expression de certains variants alléliques associés à un BMI élevé. Ces variants sont fortement exprimés dans le cerveau et sont directement impliqués dans la plasticité synaptiques <sup>221 222</sup>. Ainsi les effets combinés entre un déficit de plasticité synaptique et d'autres facteurs de risques pourraient être à l'origine de la vulnérabilité au développement de l'obésité chez l'Homme dans l'environnement actuel obésogène.



# Annexes

## **1. Matériels et méthodes**

Dans ce manuscrit, les protocoles utilisés pour les expérimentations sont détaillés dans les articles publiés ou en cours de soumission. Cependant, certaines méthodes utilisées sont manquantes, notamment concernant l'Objectif 4. Ces protocoles sont brièvement décrits ci-dessous.

### **A. Séparation des lipoparticules, dosage du cholestérol et des triglycérides**

Le sang a été centrifugé 5 min à 5000 g à 4 °C pour obtenir du plasma. Les lipoprotéines (VLDL,  $d < 1.006$  ; IDL/LDL,  $1.006 < d < 1.063$  ; HDL,  $1.063 < d < 1.21$ ) ont été isolées du plasma par ultracentrifugation séquentielles. Les concentrations en cholestérol et en triglycérides plasmatique ou des fractions lipoprotéiques isolées ont été réalisées par kit de réaction enzymatique Cholestérol-FS (Diasys, Bouffémont, France) et Triglyceride-FS (Diasys) puis mesurées via un lecteur de plaque Victor2 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer Life Science; Boston, MA).

### **B. Coloration des aortes et quantification des dépôts**

Les souris ont été perfusées en intracardiaque avec du PBS. Les aortes ont été disséquées, ouvertes puis fixées dans du PFA 4% pendant 1 semaine. Par la suite elles ont été incubées 10 min dans une solution Oil Red 0,3 % - Isopropanol 24 %. La densité des plaques colorées en rouge a été quantifiée par logiciel Axiovision.

## 2. Participation à des travaux

Au cours de ma thèse, j'ai pu collaborer à différents projets scientifiques. Une première étude au sein du laboratoire a montré que la plasticité synaptique observée dans l'hypothalamus était consolidée par des processus neurogéniques adaptatifs. Mon rôle dans cette étude a été d'aider au phénotypage des souris (suivi de poids et de prise alimentaire, EchoMRI) et la fixation pour étude immunohistologique. Ces travaux ont été valorisés dans la publication suivante :

Article 1: Cerebral cell renewal in adult mice controls the onset of obesity. Gouazé A, **Brenachot X**, Rigault C, Krezymon A, Rauch C, Nédélec E, Lemoine A, Gascuel J, Bauer S, Pénicaud L, Benani A. PLoS One. 2013 Aug 13;8(8):e72029.

Un autre projet du laboratoire a consisté à rechercher les mécanismes moléculaires permettant la surexpression de PSA, à l'échelle de la chromatine. Mon rôle dans cette étude a été d'inhiber par injection centrale de lentivirus via stéréotaxie l'acétyl-transférase MOF et d'aider au phénotypage des souris. Ces travaux seront valorisés prochainement dans une publication :

Article 2 : The histone H4 lysine 16 acetyltransferase hMOF is involved in the hypothalamic regulation of energy homeostasis. Rigault C., **Brenachot X.**, Nedelec E., Chaudy S., Gascuel J., Pénicaud L., Benani A.

Au sein du laboratoire du Pr. Philippe Valet, j'ai participé au projet du Pr. Claude Knauf sur la régulation centrale de l'homéostasie glucidique par l'apeline et les ROS. Mon rôle dans cette étude a été de mettre en place le protocole de mesure des ROS de l'hypothalamus *ex vivo* par Amplex Red au cours de mon M2R, et de surexprimer l'apeline dans l'hypothalamus par injection de vecteurs recombinant pendant ma thèse. Ces travaux ont été valorisés dans la publication suivante :

Article 3: Hypothalamic Apelin/ROS signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes. Drougard A, Duparc T, **Brenachot X**, Carneiro L, Gouazé A, Fournel A, Geurts L, Cadoudal T, Prats AC, Pénicaud L, Vieau D, Lesage J, Leloup C, Benani A, Cani PD, Valet P, Knauf C. Antioxid Redox Signal. 2013 Jul 23

Enfin, au sein du laboratoire du Dr. Pierre Fafournoux, j'ai participé au projet du Dr. Anne-Catherine Maurin sur la détection centrale de la carence en acides aminés plasmatiques et des mécanismes moléculaires sous-jacents. Mon rôle dans cette étude a été d'inhiber par injection central de lentivirus via stéréotaxie le facteur de transcription eIF2 alpha, d'inhiber ou d'activer *in vivo* la voie de signalisation hypothalamique de GCN2 par injection centrale sur animal vigile et de suivre la prise alimentaire des animaux. Ces travaux seront valorisés prochainement dans une publication :



Article 4: Hypothalamic eIF2 alpha signaling regulates food intake. Maurin AC, Benani A, Lorsignol A, **Brenachot X**, Parry L, Carraro V, Guissard C, Averous J, Jousse C, Bruhat A, Chaveroux C, B'Chir W, Muranishi Y, Ron D, Pénicaud L, Fafournoux P. *en reviewing à Cell reports*.

## Références

1. Berthoud, H.-R. Mind versus metabolism in the control of food intake and energy balance. *Physiol. Behav.* **81**, 781–93 (2004).
2. Berthoud, H.-R. & Morrison, C. The brain, appetite, and obesity. *Annu. Rev. Psychol.* **59**, 55–92 (2008).
3. Lemaire, J.-J. *et al.* White matter connectivity of human hypothalamus. *Brain Res.* **1371**, 43–64 (2011).
4. Saper, C. B. Hypothalamic connections with the cerebral cortex. *Prog. Brain Res.* **126**, 39–48 (2000).
5. Bray, G. a & York, D. a. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: an autonomic and endocrine hypothesis. *Physiol. Rev.* **59**, 719–809 (1979).
6. Elmquist, J. K., Elias, C. F. & Saper, C. B. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* **22**, 221–32 (1999).
7. Berthoud, H.-R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **26**, 393–428 (2002).
8. Johnstone, L. E., Fong, T. M. & Leng, G. Neuronal activation in the hypothalamus and brainstem during feeding in rats. *Cell Metab.* **4**, 313–21 (2006).
9. Berthoud, H.-R., Sutton, G. M., Townsend, R. L., Patterson, L. M. & Zheng, H. Brainstem mechanisms integrating gut-derived satiety signals and descending forebrain information in the control of meal size. *Physiol. Behav.* **89**, 517–24 (2006).
10. Moran, T. H., Ladenheim, E. E. & Schwartz, G. J. Within-meal gut feedback signaling. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **25 Suppl 5**, S39–41 (2001).
11. Canteras, N. S., Simerly, R. B. & Swanson, L. W. Organization of projections from the ventromedial nucleus of the hypothalamus: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin study in the rat. *J. Comp. Neurol.* **348**, 41–79 (1994).
12. McClellan, K. M., Parker, K. L. & Tobet, S. Development of the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.* **27**, 193–209 (2006).
13. Sclafani, A., Berner, C. N. & Maul, G. Multiple knife cuts between the medial and lateral hypothalamus in the rat: a reevaluation of hypothalamic feeding circuitry. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **88**, 201–7 (1975).
14. Majdic, G. *et al.* Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* **143**, 607–14 (2002).
15. Unger, T. J., Calderon, G. A., Bradley, L. C., Sena-Esteves, M. & Rios, M. Selective deletion of Bdnf in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus of adult mice results in hyperphagic behavior and obesity. *J. Neurosci.* **27**, 14265–74 (2007).

16. Wang, C., Bomberg, E., Levine, A., Billington, C. & Kotz, C. M. Brain-derived neurotrophic factor in the ventromedial nucleus of the hypothalamus reduces energy intake. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R1037–45 (2007).
17. Sakurai, T. *et al.* Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**, 573–85 (1998).
18. Muroya, S. *et al.* Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca<sup>2+</sup> signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 1524–34 (2004).
19. Van den Top, M., Lee, K., Whyment, A. D., Blanks, A. M. & Spanswick, D. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci* **7**, 493–4 ST – Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker (2004).
20. Ma, X., Zubcevic, L., Brüning, J. C., Ashcroft, F. M. & Burdakov, D. Electrical inhibition of identified anorexigenic POMC neurons by orexin/hypocretin. *J. Neurosci.* **27**, 1529–33 (2007).
21. Abbott, C. R. Identification of Hypothalamic Nuclei Involved in the Orexigenic Effect of Melanin-Concentrating Hormone. *Endocrinology* **144**, 3943–3949 (2003).
22. Ludwig, D. S. *et al.* Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **107**, 379–86 (2001).
23. Segal-Lieberman, G. *et al.* Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10085–90 (2003).
24. Zheng, H. *et al.* Melanin concentrating hormone innervation of caudal brainstem areas involved in gastrointestinal functions and energy balance. *Neuroscience* **135**, 611–25 (2005).
25. Blouet, C. & Schwartz, G. J. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav. Brain Res.* **209**, 1–12 (2010).
26. Cone, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* **8**, 571–8 (2005).
27. Balthasar, N. *et al.* Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* **123**, 493–505 (2005).
28. Rossi, J. *et al.* Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab.* **13**, 195–204 (2011).
29. Fekete, C. *et al.* alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene. *J. Neurosci.* **20**, 1550–8 (2000).
30. Fan, W., Boston, B. A., Kesterson, R. A., Hruby, V. J. & Cone, R. D. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* **385**, 165–8 (1997).
31. Barsh, G. S. & Schwartz, M. W. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 589–600 (2002).

32. Lee, Y. S., Poh, L. K. S., Kek, B. L. K. & Loke, K. Y. The role of melanocortin 3 receptor gene in childhood obesity. *Diabetes* **56**, 2622–30 (2007).
33. Huszar, D. *et al.* Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* **88**, 131–41 (1997).
34. Chen, A. S. *et al.* Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat. Genet.* **26**, 97–102 (2000).
35. Atalayer, D., Robertson, K. L., Haskell-Luevano, C., Andreasen, A. & Rowland, N. E. Food demand and meal size in mice with single or combined disruption of melanocortin type 3 and 4 receptors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R1667–74 (2010).
36. Simpson, K. A., Martin, N. M. & Bloom, S. R. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **53**, 120–8 (2009).
37. Kristensen, P. *et al.* Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* **393**, 72–6 (1998).
38. Abbott, C. R. *et al.* Evidence of an orexigenic role for cocaine- and amphetamine-regulated transcript after administration into discrete hypothalamic nuclei. *Endocrinology* **142**, 3457–63 (2001).
39. Hentges, S. T., Otero-Corchon, V., Pennock, R. L., King, C. M. & Low, M. J. Proopiomelanocortin expression in both GABA and glutamate neurons. *J. Neurosci.* **29**, 13684–90 (2009).
40. Jarvie, B. C. & Hentges, S. T. Expression of GABAergic and glutamatergic phenotypic markers in hypothalamic proopiomelanocortin neurons. *J. Comp. Neurol.* **520**, 3863–76 (2012).
41. Vong, L. *et al.* Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron* **71**, 142–54 (2011).
42. Lu, D. *et al.* Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* **371**, 799–802 (1994).
43. Ollmann, M. M. *et al.* Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* **278**, 135–8 (1997).
44. Ebihara, K. *et al.* Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. *Diabetes* **48**, 2028–33 (1999).
45. Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M. & Hökfelt, T. The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15043–8 (1998).
46. Cowley, M. A. *et al.* Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* **411**, 480–4 (2001).
47. Lin, S., Boey, D. & Herzog, H. NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides* **38**, 189–200 (2004).
48. Stanley, B. G. & Leibowitz, S. F. Neuropeptide Y: stimulation of feeding and drinking by injection into the paraventricular nucleus. *Life Sci.* **35**, 2635–42 (1984).

49. Billington, C. J., Briggs, J. E., Grace, M. & Levine, A. S. Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am. J. Physiol.* **260**, R321–7 (1991).
50. Nguyen, A. D. et al. Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. *PLoS One* **7**, e40191 (2012).
51. Wettstein, J. G., Earley, B. & Junien, J. L. Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. *Pharmacol. Ther.* **65**, 397–414 (1995).
52. Parker, S. L., Kalra, S. P. & Crowley, W. R. Neuropeptide Y modulates the binding of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analog to anterior pituitary GnRH receptor sites. *Endocrinology* **128**, 2309–16 (1991).
53. White, J. D. Neuropeptide Y: a central regulator of energy homeostasis. *Regul. Pept.* **49**, 93–107 (1993).
54. Adan, R. a H. et al. The MC4 receptor and control of appetite. *Br. J. Pharmacol.* **149**, 815–27 (2006).
55. Schiöth, H. B., Chhajlani, V., Muceniece, R., Klusa, V. & Wikberg, J. E. Major pharmacological distinction of the ACTH receptor from other melanocortin receptors. *Life Sci.* **59**, 797–801 (1996).
56. Adan, R. A. & Gispen, W. H. Brain melanocortin receptors: from cloning to function. *Peptides* **18**, 1279–87 (1997).
57. Yang, Y. K. et al. Effects of recombinant agouti-signaling protein on melanocortin action. *Mol. Endocrinol.* **11**, 274–80 (1997).
58. Roselli-Reh fuss, L. et al. Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8856–60 (1993).
59. Griffon, N. et al. Molecular cloning and characterization of the rat fifth melanocortin receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200**, 1007–14 (1994).
60. Mountjoy, K. G., Mortrud, M. T., Low, M. J., Simerly, R. B. & Cone, R. D. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* **8**, 1298–308 (1994).
61. Fathi, Z., Iben, L. G. & Parker, E. M. Cloning, expression, and tissue distribution of a fifth melanocortin receptor subtype. *Neurochem. Res.* **20**, 107–13 (1995).
62. Xia, Y., Wikberg, J. E. & Chhajlani, V. Expression of melanocortin 1 receptor in periaqueductal gray matter. *Neuroreport* **6**, 2193–6 (1995).
63. Getting, S. J., Gibbs, L., Clark, A. J., Flower, R. J. & Perretti, M. POMC gene-derived peptides activate melanocortin type 3 receptor on murine macrophages, suppress cytokine release, and inhibit neutrophil migration in acute experimental inflammation. *J. Immunol.* **162**, 7446–53 (1999).
64. Wikberg, J. E. Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **375**, 295–310 (1999).

65. Wikberg, J. E. *et al.* New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol. Res.* **42**, 393–420 (2000).
66. Andersen, G. N. *et al.* Quantitative measurement of the levels of melanocortin receptor subtype 1, 2, 3 and 5 and pro-opio-melanocortin peptide gene expression in subsets of human peripheral blood leucocytes. *Scand. J. Immunol.* **61**, 279–84 (2005).
67. Gispen, W. H., Wiegant, V. M., Greven, H. M. & de Wied, D. The induction of excessive grooming in the rat by intraventricular application of peptides derived from ACTH: structure-activity studies. *Life Sci.* **17**, 645–52 (1975).
68. Hirsch, M. D. *et al.* Structural and conformational modifications of alpha-MSH/ACTH4-10 provide melanotropin analogues with highly potent behavioral activities. *Peptides* **5**, 1197–201
69. Muceniece, R. *et al.* The MC3 receptor binding affinity of melanocortins correlates with the nitric oxide production inhibition in mice brain inflammation model. *Peptides* **27**, 1443–50 (2006).
70. Thody, A. J., Cooper, M. F., Bowden, P. E., Meddis, D. & Shuster, S. Effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone and testosterone on cutaneous and modified sebaceous glands in the rat. *J. Endocrinol.* **71**, 279–88 (1976).
71. Leiba, H. *et al.* The melanocortin receptor in the rat lacrimal gland: a model system for the study of MSH (melanocyte stimulating hormone) as a potential neurotransmitter. *Eur. J. Pharmacol.* **181**, 71–82 (1990).
72. Robbins, L. S. *et al.* Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* **72**, 827–34 (1993).
73. Bhardwaj, R. *et al.* Evidence for the differential expression of the functional alpha-melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes. *J. Immunol.* **158**, 3378–84 (1997).
74. Lipton, J. M. & Catania, A. Mechanisms of antiinflammatory action of the neuroimmunomodulatory peptide alpha-MSH. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **840**, 373–80 (1998).
75. Boston, B. A. The role of melanocortins in adipocyte function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **885**, 75–84 (1999).
76. Gantz, I. & Fong, T. M. The melanocortin system. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, E468–74 (2003).
77. Garfield, A. S., Lam, D. D., Marston, O. J., Przydzial, M. J. & Heisler, L. K. Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 203–15 (2009).
78. Butler, A. A. *et al.* A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* **141**, 3518–21 (2000).
79. Butler, A. A. The melanocortin system and energy balance. *Peptides* **27**, 281–90 (2006).
80. Chen, A. S. *et al.* Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res.* **9**, 145–54 (2000).

81. Butler, a a *et al.* Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nat. Neurosci.* **4**, 605–11 (2001).
82. Sutton, G. M. *et al.* Diet-genotype interactions in the development of the obese, insulin-resistant phenotype of C57BL/6J mice lacking melanocortin-3 or -4 receptors. *Endocrinology* **147**, 2183–96 (2006).
83. Challis, B. G. *et al.* Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4695–700 (2004).
84. Tung, Y. C. L., Rimmington, D., O’Rahilly, S. & Coll, A. P. Pro-opiomelanocortin modulates the thermogenic and physical activity responses to high-fat feeding and markedly influences dietary fat preference. *Endocrinology* **148**, 5331–8 (2007).
85. Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M. B. & Hochgeschwender, U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.* **5**, 1066–70 (1999).
86. Smart, J. L., Tolle, V. & Low, M. J. Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **116**, 495–505 (2006).
87. Mizuno, T. M., Kelley, K. A., Pasinetti, G. M., Roberts, J. L. & Mobbs, C. V. Transgenic neuronal expression of proopiomelanocortin attenuates hyperphagic response to fasting and reverses metabolic impairments in leptin-deficient obese mice. *Diabetes* **52**, 2675–83 (2003).
88. Li, G. *et al.* Melanocortin activation of nucleus of the solitary tract avoids anorectic tachyphylaxis and induces prolonged weight loss. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **293**, E252–8 (2007).
89. Savontaus, E. *et al.* Metabolic effects of transgenic melanocyte-stimulating hormone overexpression in lean and obese mice. *Endocrinology* **145**, 3881–91 (2004).
90. Qian, S. *et al.* Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 5027–35 (2002).
91. Wortley, K. E. *et al.* Agouti-related protein-deficient mice display an age-related lean phenotype. *Cell Metab.* **2**, 421–7 (2005).
92. Bewick, G. A. *et al.* Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J.* **19**, 1680–2 (2005).
93. Luquet, S., Perez, F. A., Hnasko, T. S. & Palmiter, R. D. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* **310**, 683–5 (2005).
94. Gropp, E. *et al.* Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat. Neurosci.* **8**, 1289–91 (2005).
95. Graham, M., Shutter, J. R., Sarmiento, U., Sarosi, I. & Stark, K. L. Overexpression of AgRP leads to obesity in transgenic mice. *Nat. Genet.* **17**, 273–4 (1997).

96. Klebig, M. L., Wilkinson, J. E., Geisler, J. G. & Woychik, R. P. Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4728–32 (1995).
97. Jacobowitz, D. M. & O'Donohue, T. L. alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 6300–4 (1978).
98. Joseph, S. A., Pilcher, W. H. & Bennett-Clarke, C. Immunocytochemical localization of ACTH perikarya in nucleus tractus solitarius: evidence for a second opiocortin neuronal system. *Neurosci. Lett.* **38**, 221–5 (1983).
99. McGowan, M. K., Andrews, K. M., Kelly, J. & Grossman, S. P. Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat. *Behav. Neurosci.* **104**, 373–85 (1990).
100. McGowan, M. K., Andrews, K. M. & Grossman, S. P. Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiol. Behav.* **51**, 753–66 (1992).
101. Schwartz, M. W. *et al.* Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* **130**, 3608–16 (1992).
102. Könnert, a C. *et al.* Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. *Cell Metab.* **5**, 438–49 (2007).
103. Benoit, S. C. *et al.* The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.* **22**, 9048–52 (2002).
104. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–32 (1994).
105. Campfield, L. a, Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R. & Burn, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* **269**, 546–9 (1995).
106. Tartaglia, L. a *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**, 1263–71 (1995).
107. Halaas, J. L. *et al.* Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 8878–83 (1997).
108. Elmquist, J. K., Bjørbaek, C., Ahima, R. S., Flier, J. S. & Saper, C. B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **395**, 535–47 (1998).
109. Schwartz, M. W. *et al.* Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* **45**, 531–5 (1996).
110. Morrison, C. D., Morton, G. J., Niswender, K. D., Gelling, R. W. & Schwartz, M. W. Leptin inhibits hypothalamic Npy and Agrp gene expression via a mechanism that requires phosphatidylinositol 3-OH-kinase signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **289**, E1051–7 (2005).
111. Cheung, C. C., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinology* **138**, 4489–92 (1997).



112. Hill, J. W. *et al.* Acute effects of leptin require PI3K signaling in hypothalamic proopiomelanocortin neurons in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 1796–805 (2008).
113. Kojima, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656–60 (1999).
114. Ariyasu, H. *et al.* Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immunoreactivity levels in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **86**, 4753–8 (2001).
115. Cummings, D. E., Frayo, R. S., Marmonier, C., Aubert, R. & Chapelot, D. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **287**, E297–304 (2004).
116. Willesen, M. G., Kristensen, P. & Rømer, J. Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* **70**, 306–16 (1999).
117. Tschöp, M., Smiley, D. L. & Heiman, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**, 908–13 (2000).
118. Wren, A. M. *et al.* The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* **141**, 4325–8 (2000).
119. Cowley, M. A. *et al.* The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**, 649–61 ST – The distribution and mechanism of act (2003).
120. Shintani, M. *et al.* Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* **50**, 227–32 (2001).
121. Smith, M. A. *et al.* Melanocortins and agouti-related protein modulate the excitability of two arcuate nucleus neuron populations by alteration of resting potassium conductances. *J. Physiol.* **578**, 425–38 (2007).
122. Batterham, R. L. *et al.* Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* **418**, 650–4 (2002).
123. Halatchev, I. G., Ellacott, K. L. J., Fan, W. & Cone, R. D. Peptide YY3-36 inhibits food intake in mice through a melanocortin-4 receptor-independent mechanism. *Endocrinology* **145**, 2585–90 (2004).
124. Zilles, K. Neuronal plasticity as an adaptive property of the central nervous system. *Ann. Anat.* **174**, 383–91 (1992).
125. Frotscher, M. Specificity of interneuronal connections. *Ann. Anat.* **174**, 377–82 (1992).
126. Pinto, S. *et al.* Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* **304**, 110–5 (2004).
127. Coupe, B. & Bouret, S. G. Development of the hypothalamic melanocortin system. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **4**, 38 (2013).

128. Bouret, S. G., Draper, S. J. & Simerly, R. B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* **304**, 108–10 (2004).
129. Wade, G. N., Gray, J. M. & Bartness, T. J. Gonadal influences on adiposity. *Int. J. Obes.* **9 Suppl 1**, 83–92 (1985).
130. Dubuc, P. U. Effects of estrogen on food intake, body weight, and temperature of male and female obese mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **180**, 468–73 (1985).
131. Gao, Q. *et al.* Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat. Med.* **13**, 89–94 (2007).
132. Horvath, T. L., Bechmann, I., Naftolin, F., Kalra, S. P. & Leranth, C. Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Res.* **756**, 283–6 (1997).
133. Andrews, Z. B. *et al.* UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* **454**, 846–51 (2008).
134. Gyengesi, E. *et al.* Corticosterone regulates synaptic input organization of POMC and NPY/AgRP neurons in adult mice. *Endocrinology* **151**, 5395–402 (2010).
135. Drazen, D. L., Vahl, T. P., D'Alessio, D. A., Seeley, R. J. & Woods, S. C. Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. *Endocrinology* **147**, 23–30 (2006).
136. Berthoud, H. R., Bereiter, D. A., Trimble, E. R., Siegel, E. G. & Jeanrenaud, B. Cephalic phase, reflex insulin secretion. Neuroanatomical and physiological characterization. *Diabetologia* **20 Suppl**, 393–401 (1981).
137. Teff, K. L., Mattes, R. D. & Engelman, K. Cephalic phase insulin release in normal weight males: verification and reliability. *Am. J. Physiol.* **261**, E430–6 (1991).
138. Begg, D. P. & Woods, S. C. The endocrinology of food intake. *Nat. Rev. Endocrinol.* (2013). doi:10.1038/nrendo.2013.136
139. Balthasar, N. *et al.* Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* **42**, 983–91 ST – Leptin receptor signaling in POMC neu (2004).
140. Van de Wall, E. *et al.* Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* **149**, 1773–85 (2008).
141. Tong, Q., Ye, C.-P., Jones, J. E., Elmquist, J. K. & Lowell, B. B. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nat. Neurosci.* **11**, 998–1000 (2008).
142. Yang, Y., Atasoy, D., Su, H. H. & Sternson, S. M. Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* **146**, 992–1003 (2011).
143. Liu, T. *et al.* Fasting Activation of AgRP Neurons Requires NMDA Receptors and Involves Spinogenesis and Increased Excitatory Tone. *Neuron* **73**, 511–22 (2012).

144. Dietrich, M. O. & Horvath, T. L. Synaptic plasticity of feeding circuits: hormones and hysteresis. *Cell* **146**, 863–5 (2011).
145. Spanswick, D. C., Simonds, S. E. & Cowley, M. a. Transmitter time: synaptic plasticity and metabolic memory in the hypothalamus. *Cell Metab.* **15**, 275–6 (2012).
146. Zeltser, L. M., Seeley, R. J. & Tschöp, M. H. Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance. *Nat. Neurosci.* **15**, 1336–42 (2012).
147. Goridis, C. & Brunet, J. F. NCAM: structural diversity, function and regulation of expression. *Semin. Cell Biol.* **3**, 189–97 (1992).
148. Edelman, G. M. & Crossin, K. L. Cell adhesion molecules: implications for a molecular histology. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 155–90 (1991).
149. Cole, G. J., Loewy, A. & Glaser, L. Neuronal cell-cell adhesion depends on interactions of N-CAM with heparin-like molecules. *Nature* **320**, 445–7 (1986).
150. Eckhardt, M. *et al.* Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. *Nature* **373**, 715–8 (1995).
151. Kojima, N., Yoshida, Y., Kurosawa, N., Lee, Y. C. & Tsuji, S. Enzymatic activity of a developmentally regulated member of the sialyltransferase family (STX): evidence for alpha 2,8-sialyltransferase activity toward N-linked oligosaccharides. *FEBS Lett.* **360**, 1–4 (1995).
152. Nakayama, J., Fukuda, M. N., Fredette, B., Ranscht, B. & Fukuda, M. Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7031–5 (1995).
153. Scheidegger, E. P., Sternberg, L. R., Roth, J. & Lowe, J. B. A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 22685–8 (1995).
154. Ong, E. *et al.* Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology* **8**, 415–24 (1998).
155. Hildebrandt, H., Becker, C., Müräu, M., Gerardy-Schahn, R. & Rahmann, H. Heterogeneous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J. Neurochem.* **71**, 2339–48 (1998).
156. Moran, N. M., Breen, K. C. & Regan, C. M. Characterization and cellular localization of a developmentally regulated rat neural sialidase. *J. Neurochem.* **47**, 18–22 (1986).
157. Regan, C. M. Regulation of neural cell adhesion molecule sialylation state. *Int. J. Biochem.* **23**, 513–23 (1991).
158. Yang, P., Yin, X. & Rutishauser, U. Intercellular space is affected by the polysialic acid content of NCAM. *J. Cell Biol.* **116**, 1487–96 (1992).
159. Yang, P., Major, D. & Rutishauser, U. Role of charge and hydration in effects of polysialic acid on molecular interactions on and between cell membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 23039–44 (1994).
160. Fujimoto, I., Bruses, J. L. & Rutishauser, U. Regulation of cell adhesion by polysialic acid. Effects on cadherin, immunoglobulin cell adhesion molecule, and integrin function and

- independence from neural cell adhesion molecule binding or signaling activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 31745–51 (2001).
161. Rutishauser, U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 26–35 (2008).
  162. Kiss, J. Z. & Rougon, G. Cell biology of polysialic acid. *Curr. Opin. Neurobiol.* **7**, 640–6 (1997).
  163. Rønn, L. C., Berezin, V. & Bock, E. The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int. J. Dev. Neurosci.* **18**, 193–9
  164. Ben-Hur, T., Rogister, B., Murray, K., Rougon, G. & Dubois-Dalcq, M. Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain. *J. Neurosci.* **18**, 5777–88 (1998).
  165. Benson, D. L., Schnapp, L. M., Shapiro, L. & Huntley, G. W. Making memories stick: cell-adhesion molecules in synaptic plasticity. *Trends Cell Biol.* **10**, 473–82 (2000).
  166. Nacher, J., Lanuza, E. & McEwen, B. S. Distribution of PSA-NCAM expression in the amygdala of the adult rat. *Neuroscience* **113**, 479–84 (2002).
  167. Varea, E. et al. PSA-NCAM expression in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroscience* **136**, 435–43 (2005).
  168. Seki, T. & Arai, Y. Different polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression patterns in distinct types of mossy fiber boutons in the adult hippocampus. *J. Comp. Neurol.* **410**, 115–25 (1999).
  169. Nacher, J., Alonso-Llosa, G., Rosell, D. & McEwen, B. PSA-NCAM expression in the piriform cortex of the adult rat. Modulation by NMDA receptor antagonist administration. *Brain Res.* **927**, 111–21 (2002).
  170. Theodosis, D. T., Bonfanti, L., Olive, S., Rougon, G. & Poulain, D. A. Adhesion molecules and structural plasticity of the adult hypothalamo-neurohypophysial system. *Psychoneuroendocrinology* **19**, 455–62 (1994).
  171. Bouzioukh, F., Tell, F., Jean, a & Rougon, G. NMDA receptor and nitric oxide synthase activation regulate polysialylated neural cell adhesion molecule expression in adult brainstem synapses. *J. Neurosci.* **21**, 4721–30 (2001).
  172. Schuster, T. et al. Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM, and its isoform NCAM180, the NCAM-associated polysialic acid, beta1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J. Neurobiol.* **49**, 142–58 (2001).
  173. Arellano, J. I., DeFelipe, J. & Muñoz, A. PSA-NCAM immunoreactivity in chandelier cell axon terminals of the human temporal cortex. *Cereb. Cortex* **12**, 617–24 (2002).
  174. Bonfanti, L. PSA-NCAM in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Prog. Neurobiol.* **80**, 129–64 (2006).
  175. Becker, C. G. et al. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.* **45**, 143–52 (1996).

176. Murphy, K. J., O'Connell, A. W. & Regan, C. M. Repetitive and transient increases in hippocampal neural cell adhesion molecule polysialylation state following multitrial spatial training. *J. Neurochem.* **67**, 1268–74 (1996).
177. Bliss, T. V & Lomo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* **232**, 331–56 (1973).
178. Lüscher, C., Nicoll, R. a, Malenka, R. C. & Muller, D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nat. Neurosci.* **3**, 545–50 (2000).
179. Carlisle, H. J. & Kennedy, M. B. Spine architecture and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* **28**, 182–7 (2005).
180. Engert, F. & Bonhoeffer, T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* **399**, 66–70 (1999).
181. Toni, N., Buchs, P. A., Nikonenko, I., Bron, C. R. & Muller, D. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* **402**, 421–5 (1999).
182. Eckhardt, M. *et al.* Mice Deficient in the Polysialyltransferase ST8SiaIV/PST-1 Allow Discrimination of the Roles of Neural Cell Adhesion Molecule Protein and Polysialic Acid in Neural Development and Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* **20**, 5234–5244 (2000).
183. Fazeli, M. S., Breen, K., Errington, M. L. & Bliss, T. V. Increase in extracellular NCAM and amyloid precursor protein following induction of long-term potentiation in the dentate gyrus of anaesthetized rats. *Neurosci. Lett.* **169**, 77–80 (1994).
184. El Maarouf, A., Kolesnikov, Y., Pasternak, G. & Rutishauser, U. Polysialic acid-induced plasticity reduces neuropathic insult to the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11516–20 (2005).
185. Theodosis, D. T., Montagnese, C., Rodriguez, F., Vincent, J. D. & Poulain, D. A. Oxytocin induces morphological plasticity in the adult hypothalamo-neurohypophysial system. *Nature* **322**, 738–40
186. Hatton, G. I. Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophysial system. *Prog. Neurobiol.* **34**, 437–504 (1990).
187. Nothias, F., Vernier, P., von Boxberg, Y., Mirman, S. & Vincent, J. D. Modulation of NCAM polysialylation is associated with morphofunctional modifications in the hypothalamo-neurohypophysial system during lactation. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 1553–65 (1997).
188. Theodosis, D. T. Oxytocin-secreting neurons: A physiological model of morphological neuronal and glial plasticity in the adult hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.* **23**, 101–35 (2002).
189. Oliet, S. H., Piet, R. & Poulain, D. A. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* **292**, 923–6 (2001).
190. Olmos, G., Naftolin, F., Perez, J., Tranque, P. A. & Garcia-Segura, L. M. Synaptic remodeling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience* **32**, 663–7 (1989).

191. Hoyk, Z., Parducz, A. & Theodosis, D. T. The highly sialylated isoform of the neural cell adhesion molecule is required for estradiol-induced morphological synaptic plasticity in the adult arcuate nucleus. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 649–56 (2001).
192. Theodosis, D. T., Poulain, D. A. & Oliet, S. H. R. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol. Rev.* **88**, 983–1008 (2008).
193. Smyth, S. & Heron, A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat. Med.* **12**, 75–80 (2006).
194. Hübener, M. & Bonhoeffer, T. Searching for engrams. *Neuron* **67**, 363–71 (2010).
195. Bramham, C. R. & Wells, D. G. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 776–89 (2007).
196. Cajigas, I. J., Will, T. & Schuman, E. M. Protein homeostasis and synaptic plasticity. *EMBO J.* **29**, 2746–52 (2010).
197. Vimr, E. R. Use of Prokaryotic-Derived Probes to Identify Poly(Sialic Acid) in Neonatal Neuronal Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 1971–1975 (1984).
198. Oliet, S. H. R. Functional consequences of morphological neuroglial changes in the magnocellular nuclei of the hypothalamus. *J Neuroendocr.* **14**, 241–6 ST – Functional consequences of morphologic (2002).
199. Prevot, V. Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J. Neuroendocrinol.* **14**, 247–55 (2002).
200. Ebling, F. J. P. & Barrett, P. The regulation of seasonal changes in food intake and body weight. *J Neuroendocr.* **20**, 827–33 (2008).
201. Pillot, B. *et al.* Role of hypothalamic melanocortin system in adaptation of food intake to food protein increase in mice. *PLoS One* **6**, e19107 ST – Role of hypothalamic melanocortin sys (2011).
202. Ziotopoulou, M., Mantzoros, C. S., Hileman, S. M. & Flier, J. S. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E838–845 (2000).
203. McNay, D. D. E. G., Briançon, N., Kokoeva, M. M. V, Maratos-Flier, E. & Flier, J. S. Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J. Clin. Invest.* **122**, 142–52 (2012).
204. Mountjoy, K. G. Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. *Biochem. J.* **428**, 305–24 (2010).
205. Horvath, T. L. *et al.* Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14875–80 (2010).
206. Enriori, P. J. *et al.* Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell Metab.* **5**, 181–94 (2007).
207. Diano, S. *et al.* Peroxisome proliferation-associated control of reactive oxygen species sets melanocortin tone and feeding in diet-induced obesity. *Nat. Med.* **17**, 1121–7 (2011).

208. Theodosios, D. T. Retention of Embryonic Features by an Adult Neuronal System Capable of Plasticity: Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule in the Hypothalamo-Neurohypophysial System. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 5494–5498 (1991).
209. Strader, A. D., Reizes, O., Woods, S. C., Benoit, S. C. & Seeley, R. J. Mice lacking the syndecan-3 gene are resistant to diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **114**, 1354–60 (2004).
210. Zhang, G. *et al.* Neuropeptide exocytosis involving synaptotagmin-4 and oxytocin in hypothalamic programming of body weight and energy balance. *Neuron* **69**, 523–35 (2011).
211. Abizaid, A. *et al.* Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest.* **116**, 3229–39 (2006).
212. Coppola, A. *et al.* A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab.* **5**, 21–33 (2007).
213. Chiu, S.-L. & Cline, H. T. Insulin receptor signaling in the development of neuronal structure and function. *Neural Dev.* **5**, 7 (2010).
214. Wang, J. *et al.* Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* **50**, 2786–91 (2001).
215. Crosby, K. M., Inoue, W., Pittman, Q. J. & Bains, J. S. Endocannabinoids gate state-dependent plasticity of synaptic inhibition in feeding circuits. *Neuron* **71**, 529–41 (2011).
216. Lafourcade, M. *et al.* Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat. Neurosci.* **14**, 345–50 (2011).
217. Bermudez-Silva, F. J., Cardinal, P. & Cota, D. The role of the endocannabinoid system in the neuroendocrine regulation of energy balance. *J. Psychopharmacol.* **26**, 114–24 (2012).
218. Peinado, J. R. *et al.* Amphibian melanotrophs as a model to analyze the secretory plasticity of endocrine cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* **126**, 4–6 (2002).
219. Appelbaum, L. *et al.* Circadian and homeostatic regulation of structural synaptic plasticity in hypocretin neurons. *Neuron* **68**, 87–98 (2010).
220. Baroncini, M. *et al.* Sex steroid hormones-related structural plasticity in the human hypothalamus. *Neuroimage* **50**, 428–33 (2010).
221. Han, J. C. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N. Engl. J. Med.* **359**, 918–27 (2008).
222. Thorleifsson, G. *et al.* Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet* **41**, 18–24 ST – Genome-wide association yields new seq (2009).
223. Willer, C. J. *et al.* Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat. Genet.* **41**, 25–34 (2009).
224. Benani, A. *et al.* Food Intake Adaptation to Dietary Fat Involves PSA-Dependent Rewiring of the Arcuate Melanocortin System in Mice. *J. Neurosci.* **32**, 11970–9 (2012).

225. Ellacott, K. L. J., Morton, G. J., Woods, S. C., Tso, P. & Schwartz, M. W. Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell Metab.* **12**, 10–7 (2010).
226. Yeo, G. S. H. & Heisler, L. K. Unraveling the brain regulation of appetite: lessons from genetics. *Nat. Neurosci.* **15**, 1343–9 (2012).
227. Markram, K., Lopez Fernandez, M. A., Abrous, D. N. & Sandi, C. Amygdala upregulation of NCAM polysialylation induced by auditory fear conditioning is not required for memory formation, but plays a role in fear extinction. *Neurobiol. Learn. Mem.* **87**, 573–82 (2007).
228. Lopez-Fernandez, M. a *et al.* Upregulation of polysialylated neural cell adhesion molecule in the dorsal hippocampus after contextual fear conditioning is involved in long-term memory formation. *J. Neurosci.* **27**, 4552–61 (2007).
229. McCall, T. *et al.* Depletion of polysialic acid from neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) increases CA3 dendritic arborization and increases vulnerability to excitotoxicity. *Exp. Neurol.* **241**, 5–12 (2013).
230. Barker, J. M., Torregrossa, M. M. & Taylor, J. R. Low prefrontal PSA-NCAM confers risk for alcoholism-related behavior. *Nat. Neurosci.* **15**, 1356–8 (2012).
231. Cristino, L. *et al.* Obesity-driven synaptic remodeling affects endocannabinoid control of orexinergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E2229–38 (2013).
232. Dietrich, M. O. & Horvath, T. L. Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 1–9 (2013). doi:10.1016/j.tins.2012.12.005
233. Darling, J. N., Ross, A. P., Bartness, T. J. & Parent, M. B. Predicting the effects of a high-energy diet on fatty liver and hippocampal-dependent memory in male rats. *Obesity (Silver Spring)*. **21**, 910–7 (2013).
234. Tsoory, M., Guterman, A. & Richter-Levin, G. Exposure to stressors during juvenility disrupts development-related alterations in the PSA-NCAM to NCAM expression ratio: potential relevance for mood and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology* **33**, 378–93 (2008).
235. Sandi, C., Merino, J. J., Cordero, M. I., Touyarot, K. & Venero, C. Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. *Neuroscience* **102**, 329–39 (2001).
236. Karaca, M. *et al.* Exploring functional beta-cell heterogeneity in vivo using PSA-NCAM as a specific marker. *PLoS One* **4**, e5555 (2009).
237. Fan, W. *et al.* Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat. Neurosci.* **7**, 335–6 (2004).
238. Bartness, T. J., Kay Song, C., Shi, H., Bowers, R. R. & Foster, M. T. Brain-adipose tissue cross talk. *Proc. Nutr. Soc.* **64**, 53–64 (2005).
239. Obici, S. *et al.* Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J. Clin. Invest.* **108**, 1079–85 (2001).
240. Voss-Andreae, A. *et al.* Role of the central melanocortin circuitry in adaptive thermogenesis of brown adipose tissue. *Endocrinology* **148**, 1550–60 (2007).



241. Nogueiras, R. *et al.* The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* **117**, 3475–88 (2007).
242. Stafford, J. M. *et al.* Central nervous system neuropeptide Y signaling modulates VLDL triglyceride secretion. *Diabetes* **57**, 1482–90 (2008).
243. Rojas, J. M. *et al.* Central nervous system neuropeptide Y signaling via the Y1 receptor partially dissociates feeding behavior from lipoprotein metabolism in lean rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* (2012). doi:10.1152/ajpendo.00351.2012
244. Bruinstroop, E. *et al.* Hypothalamic Neuropeptide Y (NPY) Controls Hepatic VLDL-Triglyceride Secretion in Rats via the Sympathetic Nervous System. *Diabetes* **1–8** (2012). doi:10.2337/db11-1142
245. Perez-Tilve, D. *et al.* Melanocortin signaling in the CNS directly regulates circulating cholesterol. *Nat. Neurosci.* **13**, 877–82 (2010).
246. Hernández Vallejo, S. J. *et al.* Short-term adaptation of postprandial lipoprotein secretion and intestinal gene expression to a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**, G782–92 (2009).
247. Warne, J. P. *et al.* Impairment of Central Leptin-Mediated PI3K Signaling Manifested as Hepatic Steatosis Independent of Hyperphagia and Obesity. *Cell Metab.* **14**, 791–803 (2011).