



HAL
open science

Exploration de la plasticité neuronale et gliale dans le système à mélanocortine à l'échelle des repas dans un modèle murin.

Danaé Nuzzaci

► To cite this version:

Danaé Nuzzaci. Exploration de la plasticité neuronale et gliale dans le système à mélanocortine à l'échelle des repas dans un modèle murin.. Physiologie [q-bio.TO]. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCK037 . tel-01781293

HAL Id: tel-01781293

<https://theses.hal.science/tel-01781293>

Submitted on 30 Apr 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.



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation

UMR 6265 CNRS – UBFC – UMR 1324 INRA

THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : **Sciences de la Vie (Physiologie)**

Par

Mademoiselle Danaé Nuzzaci

Exploration de la plasticité neuronale et gliale dans le système à mélanocortine à l'échelle des repas dans un modèle murin.

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 12 Décembre 2017

Composition du Jury :

Mr Yaël Grosjean	Directeur de Recherche	<i>Président du jury</i>
Mme Daniela Cota	Chargée de Recherche	<i>Rapporteur</i>
Mme Ariane Sharif	Maitre de Conférences	<i>Rapporteur</i>
Mr Jean-Louis Nahon	Directeur de Recherche	<i>Examineur</i>
Mme Carole Rovère	Chargée de Recherche	<i>Examineur</i>
Mr Michel Narce	Professeur des Universités	<i>Examineur</i>
Mr Etienne Audinat	Directeur de Recherche	<i>Examineur</i>
Mr Alexandre Benani	Chargé de Recherche	<i>Directeur de thèse</i>

A ma famille,

A Victor.

« Imagination is more important than knowledge. For knowledge is limited, whereas imagination embraces the entire world, stimulating progress, giving birth to evolution. »

Albert Einstein

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier tout d'abord les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de recherche. Je remercie Daniela Cota et Ariane Sharif d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce projet, Jean-Louis Nahon, Carole Rovère, Etienne Audinat et Yaël Grosjean d'examiner ce projet, ainsi que Michel Narce d'avoir accepté de présider ce jury.

Je souhaite remercier également Isabelle Niot et Valérie Messent d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse pour ces trois ans, pour tous vos conseils et nos discussions, avec un merci tout particulier à Valérie, tu as su me donner le goût pour les neurosciences et la microscopie électronique, merci infiniment !

Je remercie Luc Pénicaud et Lionel Bretillon de m'avoir accueillie au sein du CSGA et pour leur soutien durant ces trois années.

Alexandre, merci de m'avoir fait confiance tout au long de ce projet, tant d'un point de vue scientifique que d'un point de vue humain. Tes grandes connaissances, ta patience, ton soutien sans faille et tes grandes qualités humaines (humour y compris), même dans les moments les plus difficiles, ont rendu cette thèse particulièrement plaisante et tu as su me faire garder la motivation pour poursuivre ma carrière dans la recherche. Merci infiniment !

Merci Amélie pour ton aide, ton professionnalisme et ton amitié sincère et sans faille durant ces trois années. Ton soutien au quotidien a été un vrai atout pour mon projet. Je te souhaite plein de bonnes choses pour le futur !

Emmanuelle, tes grandes connaissances et ton expertise en biologie moléculaire mais aussi ta gentillesse et ton empathie ont rendu ces trois années d'autant plus agréables, merci pour tout !

Aleth, tu as toujours su trouver les mots pour me soutenir et me conseiller dans les moments les plus compliqués de mon projet, merci infiniment !

Selma, merci pour ton implication au sein de mon projet dès ton arrivée, pour nos beaux moments de complicité et d'amitié, tu as été un vrai soutien pendant ma dernière année de thèse ! Bonne continuation pour la suite de ta thèse !

Je voudrais à présent remercier Fabienne Liénard et Xavier Fioramonti de l'équipe 5 du CSGA d'avoir accepté de collaborer sur mon projet, pour leurs expertises en électrophysiologie et pour tous les bons moments !

Je souhaite remercier vivement Céline Cansell d'avoir collaborer sur mon projet, pour son implication et pour son expertise en pharmacogénétique mais aussi pour tous les moments d'amitiés passés ensemble notamment en congrès !

Je remercie également Virginie Tolle et Dominique Grouselle pour avoir participé activement à ce projet.

Je souhaite remercier également David Lebrun-Mougeot et Julie Malaurent pour leur travail de mise au point technique pendant leurs stages et leur compagnie extrêmement agréable ! Bonne continuation dans vos études !

Je remercie l'équipe Animalerie du CSGA, Anne Lefranc, Martin Bertomeu, Alexia Vuillemand, Laurence Decocq et Elise Lalarme d'avoir pris soin de mes animaux durant ces trois ans et pour toutes les discussions d'ordre professionnel et personnel que nous avons pu avoir au détour d'un couloir et pendant le déjeuner! Je remercie également Alexia Mathou, responsable de l'équipe Animalerie pour sa compréhension, pour nos discussions professionnelles et amicales, mais aussi pour son soutien et sa bonne humeur !

Un remerciement tout particulier à Jeannine Lherminier, Christine Arnould, Véronique Aubert, Elodie Noiroit et Aline Bonotte de la plateforme Dimacell : merci pour vos expertises, votre implication dans mon projet et votre enthousiasme!

Je souhaite à présent remercier Michel Tavan et Cédric Serrano, les deux hommes « à tout faire » du labo pour leur bonne humeur, leur efficacité et leurs amitiés !

Je remercie également mes collègues gestionnaires et secrétaires Véronique Bue, Patricia Laurent, Christine Chabert, Sabine Duchesne et Daniela Genet pour leur travail impeccable pendant ces 3 ans.

Je souhaite remercier mes collègues doctorants et ex-doctorants: Sébastien Rivière, Laurie Cazalé-Debat, Karen Rihani, Laëtitia Merle, Sawssan Saffiedine, Bisma Abed et Magali Tassone, merci pour votre amitié et votre soutien !

Je souhaite finir ces remerciements sur une note plus personnelle. Je remercie ma famille et surtout mes parents pour leur soutien inconditionnel, leur compréhension et leur implication dans ce beau projet !

SOMMAIRE

Sommaire.....	1
Résumé	5
Abstract	6
Liste des publications	7
Listes des communications scientifiques.....	8
Communications orales	8
Communications par affiches	8
Liste des abréviations	9
Introduction.....	11
1. L'homéostasie énergétique.....	12
2. L'hypothalamus, principal centre intégrateur des signaux métaboliques.....	13
3. Le noyau arqué	15
4. Le système à mélanocortine.....	16
1) Les récepteurs MC3R et MC4R et la balance énergétique	18
2) Les neurones du système à mélanocortine du noyau arqué.....	19
5. Plasticité du système à mélanocortine adulte.....	27
1) Plasticité en réponse aux hormones	28
2) Plasticité en réponse à un changement de l'état nutritionnel.....	30
3) Le rôle physiologique de la plasticité synaptique du système à mélanocortine	33
4) Autres mécanismes de plasticité neurale provoqués par un désordre	
métabolique	34
6. Les cellules gliales, acteurs dans le contrôle de la balance énergétique.....	36
1) Les astrocytes régulent la connectivité des neurones du système à	
mélanocortine	36
2) Rôle des autres cellules gliales dans le métabolisme énergétique.....	42
Problématique	47
Stratégies	49
1. Visualiser les neurones du système à mélanocortine.	49

2. Mettre en œuvre des approches fonctionnelles et anatomiques ciblées sur les neurones POMC et les neurones AgRP	53
1) Exploration fonctionnelle des phénomènes de plasticité synaptique	53
2) Exploration structurale des phénomènes de plasticité synaptique.....	53
3. Modéliser l'état prandial chez la souris	55
Etude 1 : Modélisation de l'état prandial chez la souris	59
1. Objectifs.....	59
2. Matériel et méthodes	59
1) Animaux	59
2) Prélèvements sanguins.....	60
3) Dosage des hormones plasmatiques.....	61
4) Analyses statistiques	62
3. Résultats	63
1) Paramètres métaboliques généraux.....	63
2) Dosages hormonaux	65
4. Interprétation	67
Etude 2 : Activité et connectivité des neurones du système à mélanocortine du noyau arqué en fonction de l'état prandial	69
1. Objectifs.....	69
2. Matériel et méthodes	69
1) Animaux	69
2) Electrophysiologie.....	70
3) Immunohistochimie associée à la Microscopie Electronique à Transmission	72
4) Microscopie confocale.....	84
5) Analyse d'images.....	84
3. Résultats	86
1) Activité électrique des neurones AgRP et POMC en fonction de l'état prandial.	86
2) Tonus inhibiteur reçu par les neurones POMC	88
3) Densité synaptique sur les neurones POMC en fonction de l'état prandial.	90
4) Configuration synaptique et état prandial.....	92
4. Interprétation	94
Etude 3 : Plasticité astrocytaire du noyau arqué en fonction de l'état prandial	97
1. Objectifs.....	97

2. Matériel et méthodes	97
5) Animaux	97
1) Microscopie à fluorescence.....	98
2) Immunohistochimie associée à la Microscopie Electronique à Transmission	98
3) Analyse d'images.....	98
3. Résultats	100
1) Réactivité astrocytaire dans le noyau arqué et état prandial.....	100
2) Relation astrocyte-neurone POMC : exploration de la couverture astrocytaire.	102
4. Interprétation	104
Etude 4 : Le glucose, un signal possible de plasticité astrocytaire dans le système à mélanocortine.....	107
1. Objectifs.....	107
2. Matériel et Méthodes	108
1) Animaux	108
2) Agent pharmacologique utilisé	109
3) Immunohistochimie associée à la microscopie électronique à transmission et analyse d'image	109
3. Résultats	110
1) Evolution temporelle de la glycémie post-prandiale sous régime standard.	110
2) Le LX4211 inhibe le pic post-prandial de glucose	112
3) Blocage périphérique du glucose et couverture gliale sur les neurones POMC	114
4. Interprétation	116
Etude 5 : Rôle des astrocytes sur la régulation de la prise alimentaire	119
1. Objectifs.....	119
2. Matériel et Méthodes	119
1) Animaux	119
2) Mesure de la prise alimentaire par le système BioDaq.....	119
3) Pharmacogénétique.....	120
4) Microscopie électronique	123
3. Résultats	124
1) Inactivation des astrocytes via les DREADD et comportement alimentaire .	124

2) Inactivation des astrocytes et plasticité astrocytaire et neuronale en périphérie des neurones POMC.....	126
3) Nature du régime et comportement alimentaire	128
4. Interprétation	130
Conclusion générale	133
1. Le système à mélanocortine présente des modifications à l'échelle des repas sans mettre en œuvre une plasticité synaptique	133
2. Les astrocytes du noyau arqué présentent une plasticité en fonction de l'état prandial, liée à l'hyperglycémie post-prandiale.....	133
3. Un repas hyper-lipidique ne modifie pas l'activité du neurone POMC et ne déclenche pas de retraction gliale post-prandial mais induit une plasticité synaptique	134
4. La manipulation pharmacogénétique des astrocytes du noyau arqué modifie le comportement alimentaire et les interactions neurone POMC-astrocyte	135
Discussion.....	139
Perspectives.....	147
Bibliographie.....	151
Annexes	167

RESUME

En 2015, la revue Nature a publié la plus grande étude d'association pangénomique à ce jour reliant des variants génétiques à l'indice de masse corporelle. Cette étude a mis en avant le rôle du système nerveux central dans la vulnérabilité à l'obésité, et soutient un concept original selon lequel la plasticité cérébrale jouerait un rôle important dans le contrôle de la balance énergétique. Ainsi, des capacités de plasticité cérébrale réduites pourraient favoriser des comportements alimentaires inadaptés, ce qui augmenterait le risque de prise de poids sous pression calorique. Les neurones anorexigènes POMC et les neurones orexigènes AgRP qui composent le système à mélanocortine et qui contrôlent la balance énergétique, conservent effectivement des propriétés de plasticité synaptique dans le cerveau adulte. Celles-ci se manifestent en réponse à des fluctuations hormonales intenses, induites par des manipulations génétiques, chirurgicales ou nutritionnelles drastiques. Cependant le rôle physiologique de cette plasticité synaptique au sein du système à mélanocortine n'a pas encore été démontré. Nos résultats montrent que des phénomènes de plasticité cérébrale sont récapitulés à l'échelle des repas chez la souris, en fonction de l'état prandial, en réponse à des changements métaboliques et hormonaux modérés. En effet, une exposition à 1h de régime standard augmente l'activité électrique des neurones POMC, ce qui est corrélé à une rétractation de la couverture astrocytaire autour des somas POMC, sans changement de configuration synaptique par rapport à l'état préprandial. A l'opposé, une exposition à 1h de régime riche en lipides ne modifie pas l'activité électrique des neurones POMC et n'entraîne pas de rétractation de la couverture astrocytaire. De plus, par blocage pharmacologique de l'hyperglycémie post-prandiale, nous avons montré que le glucose était nécessaire pour initier la rétractation gliale post-prandiale. Enfin, par une approche pharmacogénétique, nous avons montré que l'inactivation des astrocytes modifie le comportement alimentaire et diminue la couverture astrocytaire autour des neurones POMC. Ces résultats suggèrent que l'astrocyte jouerait un rôle inhibiteur sur l'activité électrique des neurones POMC et que la rétractation astrocytaire post-prandiale, autour des somas POMC leverait l'inhibition des neurones POMC et favoriserait la sensation de satiété. Ce mode de régulation ne serait pas déclenché lors d'un repas riche en graisses, ce qui expliquerait le faible pouvoir satiétogène de ce type de repas.

Mots-clés : système à mélanocortine, plasticité, rythme des repas

ABSTRACT

In 2015, Nature published the largest pangenomic association study to date linking genetic variants to body mass index. This study highlighted the role of the central nervous system in vulnerability to obesity and supports an original concept that cerebral plasticity plays an important role in the control of energy balance. Thus, reduced cerebral plasticity capacities could lead to inadequate dietary behaviors, which would increase the risk of weight gain under caloric pressure. The anorectic neurons POMC and the orexigenic neurons AgRP of the melanocortin system, which control the energy balance, actually show synaptic plasticity properties in the adult brain. These phenomena are shown in response to intense hormonal fluctuations induced by drastic genetic, surgical or nutritional manipulations. However, the physiological role of this synaptic plasticity within the melanocortin system has not been demonstrated yet. This study shows that cerebral plasticity phenomena are recapitulated at the meal scale in mice, depending on the prandial state, in response to moderate metabolic and hormonal changes. Indeed, 1h standard diet exposure increases the electrical activity of the POMC neurons, which is correlated with a retraction of the astrocytic coverage around the POMC somas, with no change in synaptic configuration compared to the preprandial state. In contrast, 1 hour of high fat diet exposure does not modify the electrical activity of the POMC neurons and does not involve retraction of the astrocytic coverage. In addition, by pharmacological blockade of postprandial hyperglycemia, we showed that glucose is required for postprandial glial retraction. Finally, by a pharmacogenetic approach, we have shown that the inactivation of astrocytes modifies the feeding behavior and decreases the astrocytic coverage around the POMC neurons. These results suggest i) that astrocytes would play an inhibitory role on the electrical activity of POMC neurons ii) and that the post-prandial astrocytic retraction around POMC somas might remove inhibition of POMC neurons and might promote the sensation of satiety. This mode of regulation would not be activated during a high-fat meal, which would explain the low satietogenic properties of this type of meal.

Keywords: melanocortin system, plasticity, meal pattern

LISTE DES PUBLICATIONS

1.

Nuzzaci D, Laderrière A, Lemoine A, Nédélec E, Pénicaud L, Rigault C, Benani A. *Plasticity of the Melanocortin System: Determinants and Possible Consequences on Food Intake*. Front Endocrinol (Lausanne). 2015 Sep 14;6:143. doi: 10.3389/fendo.2015.00143. eCollection 2015.

2.

Brenachot X, Gautier T, Nédélec E, Deckert V, Laderrière A, Nuzzaci D, Rigault C, Lemoine A, Pénicaud L, Lagrost L, Benani A. *Brain Control of Plasma Cholesterol Involves Polysialic Acid Molecules in the Hypothalamus*. Front Neurosci. 2017 May 3;11:245. doi: 10.3389/fnins.2017.00245. eCollection 2017.

LISTES DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Communications orales

- Dijon, 20 Septembre 2017, 42^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie (SNE), **Changes in neuroglial interaction on POMC neurons at the meal scale.** *Prix de la communication orale.*
- Dijon, 11 Avril 2017, Tour des Sciences, Conférence Grand Public, **Notre comportement alimentaire est-il lié à la plasticité cérébrale ?** Conférencière invitée
- Corte, 5-8 Octobre 2016, 41^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie (SNE), **Plasticité des circuits neuronaux de la prise alimentaire chez la souris à l'échelle des repas.**
- Besançon, 16-17 juin 2016, 22^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs , **Plasticité des circuits neuronaux de la prise alimentaire chez la souris à l'échelle des repas.**

Communications par affiches

- Nuzzaci D, Nedelec E, Laderrière A, Liénard F, Gigot V, Lemoine A, Fioramonti X, Pénicaud L, Benani A. **Changes in neuroglial interactions on POMC neurons at the meal scale.** Conférence Jacques Monod (CNRS), "Les cellules gliales au carrefour de l'immunité innée et des fonctions cérébrales", Roscoff, 12-16 Juin 2017
- Nuzzaci D, Liénard F, Goyon S, Leloup C, Pénicaud L, Benani A, Fioramonti X. **Recurrent episodes of insulin-hypoglycemia alter the hypothalamic neuropeptide Y (NPY) network controlling food intake.** NeuroFrance 2017, Bordeaux, 17-19 Mai 2017
- Nuzzaci D, Nedelec E, Laderrière A, Liénard F, Gigot V, Lemoine A, Fioramonti X, Pénicaud L, Benani A. **Changes in neuroglial interactions on POMC neurons at the meal scale.** Keystone Symposia "Neuronal Control of Appetite, Metabolism and Weight", Copenhague, 9-13 Mai 2017
- Brenachot X, Gautier G, Nédélec E, Deckert E, Laderrière A, Nuzzaci D, Rigault C, Lemoine A, Pénicaud L, Lagrost L, Benani A. **L'acide polysialique situé dans l'hypothalamus contrôle le métabolisme du cholestérol circulant.** 41^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie (SNE), Corte, 5-8 Octobre 2016
- Patris B, Laderrière A, Nuzzaci D, Nédélec E, Lemoine A, Schaal B, Benani A. **Une alimentation maternelle enrichie en gras pendant la gestation et l'allaitement oriente le nouveau-né vers un lait produit sous régime gras (modèle murin).** 41^{ème} Colloque de la Société de Neuroendocrinologie (SNE), Corte, 5-8 Octobre 2016

LISTE DES ABREVIATIONS

3V Troisième ventricule cérébral	NMDA N-methyl-D-aspartate receptor
AgRP Agouti Related Peptide	NTS Noyau du tractus solitaire
AMPK AMP-activated protein kinase	NPY Neuropeptide Y
ARC Noyau arqué	PB Tampon phosphate
ApoE Apolipoprotéine E	PBN Noyau parabrachial
ARN Acide ribo nucléique	PFA Paraformaldéhyde
CART Cocaine amphetamine-related peptide	PI3K Phosphoinositide 3-kinase
CBR Récepteur aux cannabinoïdes	POMC Poopiomélanocortine
DAB Diaminobenzidine	PPAR Peroxisome proliferator-activated receptor
DREADD Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs	PRE Etat préprandial
EM Eminence médiane	PSA Acide polysialique
GABA Acide γ -aminobutyrique	PVN Noyau paraventriculaire
GAD Glutamate decarboxylase	PYY peptide YY
GFAP Glial Fibrillary Acidic Protein	ROS Dérivés oxydatifs de l'oxygène
GLP-1 Glucagon like peptide 1	SD Standard diet
GLUT Transporteur du glucose	SGLT Transporteur sodium-glucose
HFD High fat diet	STAT3 Signal transducer and activator of transcription 3
Hsp72 Heat shock protein	TNF Facteur de nécrose tumorale
Jak Janus kinase	TRPC Transient Receptor Potential Channel
K_{atp} ATP sensitive potassium channel	TTX Tetrodotoxine
LepR Récepteur à la leptine	VGAT Vesicular GABA transporter
LHA Aire latérale de l'hypothalamus	VGluT Vesicular glutamate transporter
LX4211 Sotagliflozine	VMN Noyau ventromédian
MCR Récepteur des mélanocortines	VTA Aire ventrale tegmentale
MET Microscopie électronique à transmission	
MSH Melanocyte stimulating hormone	
NFκB Nuclear factor kappa B	

INTRODUCTION

Dans cette introduction, nous allons aborder les différents concepts relatifs au projet de recherche. Il s'agit ainsi de présenter la notion d'homéostasie énergétique, de présenter aussi les caractéristiques de l'hypothalamus, zone cérébrale impliquée le maintien de cette homéostasie énergétique, et de faire le point sur les connaissances actuelles concernant le circuit neuronal hypothalamique appelé système à mélanocortine, au cœur de la régulation de l'homéostasie énergétique et sur lequel nous avons réalisé le projet de recherche. Nous présenterons ensuite précisément une propriété essentielle de ce circuit : sa plasticité, et indiquerons finalement les grands défis scientifiques qui restent à relever pour bien comprendre l'importance de cette propriété de plasticité d'un point de vue intégré.

1. L'homéostasie énergétique

Au cours de sa vie, un individu en bonne santé va ingérer de grandes quantités de nourriture. Malgré cette ingestion cumulée massive, atteignant plusieurs dizaines de tonnes pour un être humain, le poids corporel reste stable tout au long de la vie adulte. Ceci est la manifestation de l'homéostasie énergétique, correspondant au maintien d'un équilibre finement contrôlé entre les apports énergétiques liés à l'alimentation et les dépenses énergétiques issues du fonctionnement de l'organisme et de l'activité de l'individu.

En cas d'écarts entre les apports et les dépenses, un système adaptatif est activé. Au cours d'un déficit énergétique, la prise alimentaire est stimulée et l'utilisation des réserves énergétiques déjà disponibles est favorisée à travers l'activation de la glycogénolyse hépatique ou de la lipolyse adipeuse notamment. En parallèle, les dépenses énergétiques sont freinées et le stockage d'énergie est ralenti. A contrario, lorsque les apports sont trop importants, l'organisme s'adapte en inhibant la prise alimentaire et en favorisant les dépenses. Chez la souris par exemple, l'introduction d'un régime plus calorique, comme un régime riche en lipides va déclencher une réponse comportementale adaptée. En effet, l'apport calorique excessif durant les premières heures va être perçu et en retour l'animal va réduire sa ration quotidienne en masse pour retrouver une prise énergétique équivalente.

Le centre régulateur du poids corporel et de la prise alimentaire à la base de cette coordination remarquable est situé au dans le cerveau. Le cerveau est capable d'intégrer toutes les informations de la périphérie faisant état du statut métabolique de l'organisme. Ces informations transitent par voie sanguine ou nerveuse. Leur intégration au niveau cérébral déclenche alors des mécanismes nerveux, autonomes, ayant pour résultante une réponse physiologique (gestion des flux de nutriments) et comportementale adaptée (prise alimentaire).

2. L'hypothalamus, principal centre intégrateur des signaux métaboliques

L'hypothalamus occupe une place importante dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (Berthoud 2005). Cette structure cérébrale d'encéphale est constituée d'une quarantaine de noyaux regroupant des populations neuronales spécifiques et contrôle de façon globale toutes les fonctions visant à maintenir l'organisme à l'équilibre : fonction de reproduction, thermogénèse, métabolisme, croissance. L'hypothalamus est le centre intégrateur des informations métaboliques le mieux connu et le plus étudié. Il présente de nombreuses connexions afférentes et efférentes avec d'autres régions cérébrales (l'hippocampe, l'amygdale, le tronc cérébral) (Lemaire et al. 2011; Saper 2000). Parmi les noyaux qui composent l'hypothalamus, certains possèdent parmi leurs fonctions un rôle dans la régulation de la prise alimentaire comme le noyau arqué (ARC), l'aire hypothalamique latérale (LHA), le noyau paraventriculaire (PVN) ou le noyau ventromédian (VMN) (Berthoud 2002)(Figure1).

L'implication des noyaux hypothalamiques dans le contrôle de la balance énergétique et du comportement alimentaire a été démontrée dans les années 1940 par des expériences de lésions chirurgicales et de stimulations électriques. Une lésion du noyau arqué et du noyau ventromédian conduit à une hyperphagie qui à long terme induit le développement de l'obésité (Bray and York 1979). La partie ventromédiane de l'hypothalamus était alors appelée « centre de la satiété ». A contrario, une lésion de l'hypothalamus latéral induit une hypophagie. L'hypothalamus latéral était alors appelé « centre de la faim » (Elmquist, Elias, and Saper 1999). A ce jour, le rôle de chaque noyau hypothalamique, les réseaux neuronaux les composants et leurs projections ont été bien caractérisés. Par exemple, la LHA comprend les neurones à orexine qui lorsqu'ils sont actifs stimulent la prise alimentaire (Imperatore, Palomba, and Cristino 2017). Le noyau arqué comprend, quant à lui, différentes populations neuronales antagonistes, qui stimulent ou freinent la prise alimentaire (Cone 2005).

La capacité de ces neurones à contrôler la balance énergétique repose sur leur sensibilité aux signaux métaboliques. Ces signaux sont nombreux et de nature très diverse. Il s'agit de signaux humoraux tels que les nutriments ou les hormones, et de signaux nerveux véhiculés par les afférences innervant les organes périphériques et faisant relai notamment dans le tronc cérébral.

Dans cette revue bibliographique, nous nous concentrerons sur un seul des noyaux hypothalamiques impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique : le noyau arqué. Il comprend le système à mélanocortine, le système neuronal le mieux caractérisé à ce jour en ce qui concerne le contrôle de la balance énergétique. C'est précisément ce système neuronal particulier que nous avons étudié dans le projet de recherche présenté.

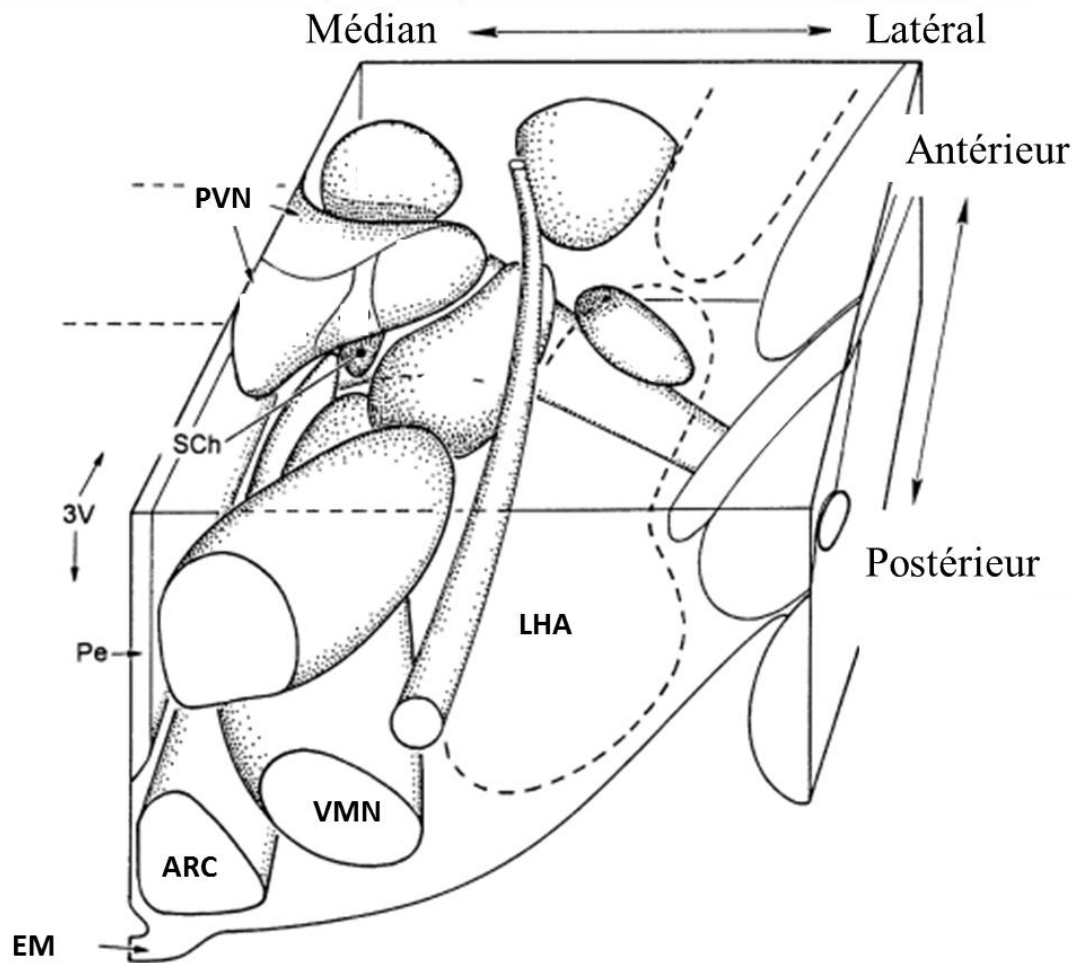


Figure 1: Représentation schématique des noyaux hypothalamiques impliqués dans le contrôle de la balance énergétique (adapté d'après Berthoud, 2002) ; ARC : noyau arqué ; EM : éminence médiane ; PVN : noyau paraventriculaire ; LHA : Aire hypothalamique latérale ; VMN : noyau ventro-médian

3. Le noyau arqué

Situé dans la partie ventro-médiane de l'hypothalamus, le noyau arqué est considéré aujourd'hui comme l'un des sites neuroanatomiques majeurs du contrôle de la balance énergétique. Il comprend notamment deux populations de neurones qui ont une action antagoniste sur la prise alimentaire: les neurones anorexigènes exprimant la proopiomélanocortine (POMC) qui inhibent la prise alimentaire et les neurones orexigènes exprimant le peptide AgRP (Agouti Related Peptide) qui stimulent la prise alimentaire. Ces deux types neuronaux ont longtemps été considérés comme des neurones de « premier ordre », car on considérait que ces deux populations recevaient en premier les informations métaboliques de la périphérie. Nous savons aujourd'hui que ces deux populations majeures dans l'homéostasie énergétique reçoivent également des informations de la part d'autres neurones non identifiés, présents dans le noyau arqué pour une partie d'entre eux, et eux aussi sensibles aux signaux métaboliques (Krashes et al. 2011). La séquence de détection des signaux métaboliques *in situ* dans le temps et dans l'espace n'est donc pas complètement élucidée à ce jour, et semble se produire au niveau de différents acteurs cellulaires et selon différentes modalités. La réception de ces informations au niveau du noyau arqué est facilitée par la présence dans cette structure du troisième ventricule cérébral (V3) et des capillaires cérébraux fenestrés de l'éminence médiane qui facilitent le passage des molécules sanguines vers le parenchyme cérébral et le fluide cérébro-spinal (Ciofi 2011).

4. Le système à mélanocortine

Le comportement alimentaire est contrôlé par de nombreux circuits qui stimulent ou inhibent la prise alimentaire. Ces circuits considèrent les besoins énergétiques mais sont aussi influencés par les structures cognitives impliquées dans le plaisir, les habitudes alimentaires et l'état émotionnel, avec lesquelles ils sont en relation.

Le système à mélanocortine de l'hypothalamus est le système le plus étudié et le mieux caractérisé des circuits neuronaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Cone 2005). Ce circuit inclut (i) les neurones exprimant le récepteur de la mélanocortine (MCR), en particulier les sous-types MC3R et MC4R, (ii) les neurones exprimant les agonistes du MCR, comme l' α -melanocyte-stimulating hormone (MSH) qui dérive de la protéine précurseur proopiomelanocortin (POMC), et (iii) les neurones exprimant les antagonistes du MCR, comme le ligand de haute affinité agouti-related peptide (AgRP).

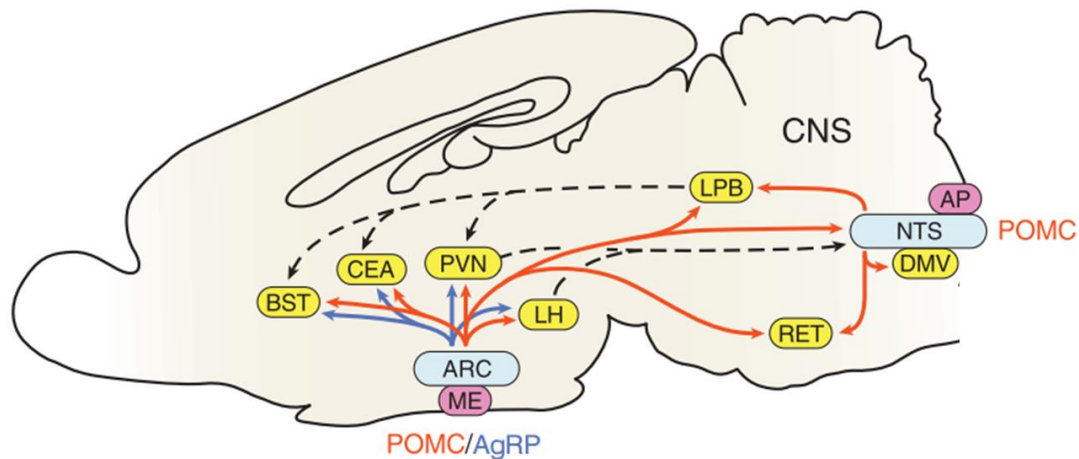


Figure 2: Représentation schématique des projections des neurones POMC et des neurones AgRP au niveau du système nerveux central (d'après Cone 2005). **ME** : éminence médiane ; **ARC** : noyau arqué ; **BST** : noyau du lit de la strie terminale, **CEA** : amygdale centrale, **PVN** : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus ; **LH** : noyau de l'hypothalamus latéral ; **LPB** : noyau parabrachial latéral ; **RET** : noyau réticulaire ; **AP** : area postrema ; **NTS** : noyau du tractus solitaire ; **DMV** : noyau moteur du nerf vague.

1) Les récepteurs MC3R et MC4R et la balance énergétique

Les régions cérébrales contrôlant la balance énergétique sont particulièrement riches en récepteurs MC3R et MC4R qui sont largement distribués au sein du cerveau, notamment dans l'amygdale et dans l'hypothalamus péri-ventriculaire, en particulier le noyau paraventriculaire (PVN) (Kishi et al. 2003; Mountjoy et al. 1994). Dans le système à mélanocortine, ces récepteurs ont un agoniste, l' α MSH, sécrétée par les neurones POMC du noyau arqué, et un antagoniste, le peptide AgRP, sécrété par les neurones AgRP du noyau arqué. Dans le PVN, les neurones exprimant le MC4R reçoivent une innervation mixte de fibres POMC stimulatrices et de fibres AgRP inhibitrices, suggérant que le système à mélanocortine est finement régulé afin de maintenir l'homéostasie énergétique (Bagnol et al. 1999; Cowley et al. 1999).

Le rôle du récepteur MC3R dans la balance énergétique est encore mal connu. Récemment, il a été montré que l'administration centrale et périphérique d'un agoniste du MC3R, le D-Trp⁸- γ MSH, induit une hyperphagie chez la souris (Marks et al. 2006). Le MC3R aurait également un rôle en tant que régulateur de l'activité du neurone POMC par sa capacité à hyperpolariser ces neurones (Cowley et al. 2001). Le mutant MC3R-null présente une augmentation de son adiposité mais est sans effet sur la prise alimentaire (Butler et al. 2000; Chen et al. 2000). Toutefois, l'invalidation du MC3R induit un comportement hyperphagique diurne après introduction d'un régime riche en lipides (Butler 2006). Enfin, le récepteur MC3R jouerait un rôle dans le comportement alimentaire anticipatoire précédant une mise à disposition temporaire de nourriture (Sutton et al. 2008).

Le rôle du récepteur MC4R dans la balance énergétique est bien caractérisé. Le MC4R est impliqué dans l'adaptation à un changement de régime (Butler et al. 2001). Le mutant MC4R^{-/-} est hyperphagique quel que soit le régime (Chen et al. 2000; Huszar et al. 1997; Sutton et al. 2006) et ce comportement hyperphagique est amplifié sous régime riche en lipides (Butler et al. 2001; Sutton et al. 2006). De plus, ce mutant présente une augmentation de l'adiposité, du poids corporel et cet effet apparaît à 5 semaines post-natal par rapport aux souris contrôle (Chen et al. 2000; Huszar et al. 1997). L'obésité du mutant MC4R^{-/-} est liée à une augmentation de la prise alimentaire mais pas exclusivement (Chen et al. 2000; Ste Marie et al. 2000). Par ailleurs, la restauration de l'expression du MC4R dans l'hypothalamus péri-ventriculaire et dans l'amygdale permet

uniquement un retour à une prise alimentaire semblable au contrôle (Balthasar et al. 2005), suggérant que les structures cérébrales exprimant MC4R ont des fonctions spécifiques divergentes sur la balance énergétique. Enfin, une ablation du récepteur MC4R en post-natal dans l'hypothalamus péri-ventriculaire induit une hyperphagie seulement sous régime riche en lipides chez le rat (Garza et al. 2008), confortant l'importance de MC4R dans le PVN dans le maintien de l'homéostasie énergétique.

2) Les neurones du système à mélanocortine du noyau arqué

Les neurones POMC et les neurones AgRP sont présents dans le noyau arqué de l'hypothalamus. Un petit groupe de neurones POMC est également présent dans le noyau du tractus solitaire (*nucleus tractus solitarii*, NTS) dans le tronc cérébral. La position dans le parenchyme cérébral des neurones du noyau arqué leur permet de faire contact avec des facteurs sanguins délivrés par les capillaires fenêtrés de l'éminence médiane et de facteurs cérébrospinaux délivrés par les tanocytes qui bordent le troisième ventricule (Cowley et al. 2001). La capacité des neurones POMC et des neurones AgRP d'être régulés par des hormones circulantes telles que la leptine, la ghréline, l'insuline, les œstrogènes, les glucocorticoïdes, le peptide glucagon-like peptide 1 et le peptide YY, et par les nutriments rend le système à mélanocortine sensible aux changements de statut hormonal et nutritionnel de l'organisme (Nuzzaci et al. 2015). Ainsi, la nature chimique, l'anatomie et la sensibilité de ces neurones rendent compte de particularités propres au système à mélanocortine.

a) Les neurones POMC, « neurones de la satiété »

Les neurones POMC sont des neurones anorexigènes qui inhibent la prise alimentaire lorsqu'ils sont activés. Chez la souris adulte, il y a environ 3000 neurones POMC situés en grande majorité dans le noyau arqué de l'hypothalamus (Cowley et al. 2001). Des études plus récentes, comprenant un comptage sur un grand nombre de coupes stéréologiques du cerveau montrent en fait que le nombre des neurones POMC dans le noyau arqué s'élève à 9000 neurones (Lemus et al. 2015). Les corps cellulaires des neurones sont situés dans les parties les plus antérieures du noyau arqué (Cowley et al. 2001). Une petite population est également présente au niveau du NTS.

Ils expriment le précurseur proopiomélanocortine qui peut ensuite être maturé en peptides mélanocortines tels que le peptide anorexigène α -MSH, en

adrénocorticotropines ou encore en β -endorphines. Les neurones POMC se situent le long de l'axe antéro-postérieur du noyau arqué de l'hypothalamus. Ces neurones émettent des projections vers le noyau du lit de la strie terminale, le noyau central de l'amygdale, le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus, l'hypothalamus latéral, le noyau parabrachial latéral, le noyau du tractus solitaire et le noyau réticulaire (Cone 2005).

Les neurones POMC du noyau arqué sont hétérogènes (Lam et al. 2017). Ils présentent des phénotypes GABAergiques, glutamatergiques et cholinergiques mais le rôle de cette hétérogénéité reste mal connu (Mercer et al. 2013). En effet, des courants GABAergiques ont été identifiés dans des neurones POMC in vitro (Hentges et al. 2004). Une partie des neurones POMC expriment l'ARN messager pour l'enzyme glutamic acid decarboxylase (GAD) qui permet la synthèse de GABA à partir du glutamate. De plus, le transporteur au glutamate EAT3 est également exprimé dans des cellules POMC positives (Collin et al. 2003). Ces données indiquent que les neurones POMC semblent présenter la machinerie cellulaire et moléculaire pour être à la fois glutamatergiques et GABAergiques, bien que la nature GABAergique des neurones POMC soit encore sujet à débat (Vong et al. 2011). Les neurones POMC montrent également une hétérogénéité en termes de réponse à d'autres neurotransmetteurs et aux hormones. Par exemple, il existe deux sous populations de neurones POMC physiquement distinctes au sein du noyau arqué qui répondent soit à la leptine soit à l'insuline (Williams et al. 2010). Par ailleurs, les neurones POMC sont dépolarisés par la leptine et la sérotonine (Sohn et al. 2011; Williams et al. 2010), mais en revanche les neurones POMC dépolarisés par la sérotonine sont incapables de répondre à un stimulus de leptine (Sohn et al. 2011).

Afin de décoder le rôle des neurones POMC, des modèles génétiques ont été étudiés. Ces études ont montré que la délétion de l'exon 3 du gène codant pour le peptide POMC dans le modèle POMC^{-/-} induit une augmentation du poids corporel et une hyperphagie sous nourriture standard et que cette hyperphagie est exacerbée sous nourriture riche en lipides (Challis et al. 2004; Tung et al. 2007; Yaswen et al. 1999). La fonction des neurones POMC a également été étudiée par des techniques d'optogénétique. Ainsi, la photoactivation des neurones POMC via un canal rhodopsine chez la souris diminue la prise alimentaire (Aponte, Atasoy, and Sternson 2011). En fait, l'activation lumineuse des neurones POMC chez la souris nourrie *ad libitum*, ne modifie pas la prise alimentaire

sur les deux premières heures de la période nocturne. Mais si l'on prolonge cette photoactivation sur 24h, la prise alimentaire globale est réduite de 39% et le poids corporel est réduit de 7% (Aponte et al. 2011).

Les neurones POMC expriment les récepteurs d'hormones métaboliques ce qui les rend sensibles aux signaux sanguins de la périphérie. Cette caractéristique permet d'adapter l'activité des neurones POMC en fonction de l'état nutritionnel de l'individu et ainsi permettre une réponse comportementale adaptée. En effet, la liaison des hormones anorexigènes, comme l'insuline et la leptine, à leurs récepteurs au niveau des neurones POMC entraîne une augmentation de l'expression du pro-peptide POMC et du peptide anorexigène α -MSH (Benoit et al. 2002; Cheung, Clifton, and Steiner 1997; Cowley et al. 2001; Hill et al. 2008).

La leptine contrôle l'activité des neurones POMC

La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes, connue pour ses propriétés anorexigènes (Zhang et al. 1994). Dans l'hypothalamus, la leptine agit à travers la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) et l'inhibition de l'AMPK est un pré-requis indispensable pour que la leptine agisse sur le poids corporel et la prise alimentaire (Dagon et al. 2012; Minokoshi et al. 2004). De plus, la leptine active la voie de signalisation de mTOR (Cota et al. 2006). En effet, le traitement à la leptine augmente la phosphorylation de S6K1 et de S6, deux cibles de mTOR, et l'administration de rapamycine, un inhibiteur de mTOR, antagonise l'action anorexigène de la leptine (Cota et al. 2006). La leptine peut agir directement sur les neurones POMC, dont une sous population dans le noyau arqué exprime son récepteur LepRb (Williams et al. 2010). La liaison de la leptine sur son récepteur active dans les neurones POMC la voie de signalisation LepRb-STAT3 et la voie du Jak2-PI3K-TRPC. Cela induit une augmentation des niveaux des ARN messagers POMC et une activation des neurones POMC menant à une diminution de la prise alimentaire (Levin and Lutz 2017).

Différents modèles présentant des mutations du récepteur à la leptine ont été étudiés, comme par exemple la souris db/db, mutante totale pour le récepteur à la leptine. La réexpression du récepteur à la leptine dans les neurones POMC dans ce modèle induit une réduction modeste du poids corporel, due à une adaptation de la dépense énergétique sans effet sur la prise alimentaire (Berglund et al. 2012; Huo et al. 2009). De plus, cette réexpression semble avoir un effet positif sur la condition diabétique de ces

souris (Berglund et al. 2012; Huo et al. 2009), ce qui suggère que la leptine agit directement sur les neurones POMC pour contrôler l'homéostasie glucidique. Finalement, les effets anorexigènes de la leptine seraient liés majoritairement à une action sur des neurones GABAergiques du noyau arqué qui n'expriment pas POMC (Vong et al. 2011).

Le glucose contrôle l'activité des neurones POMC

Le glucose est un modulateur important de l'activité des neurones POMC. En effet, l'augmentation du glucose sanguin est corrélée à une activation des neurones POMC, ce qui est cohérent avec le rôle anorexigène de ces neurones et permet une réponse physiologique adaptée tel que la régulation de la glycémie (Parton et al. 2007). L'oxydation du glucose par les mitochondries produit de l'ATP qui en se liant au canal potassium ATP-dépendant (K_{ATP}) permet une dépolarisation des neurones POMC et une augmentation de leur activité électrique. De plus, la mutation du canal K_{ATP} dans les neurones POMC les rend insensibles au glucose qui n'est plus capable de réguler leur activité (Parton et al. 2007). L'oxydation du glucose par les mitochondries permet également la production de ROS (dérivés réactifs de l'oxygène). En effet, les hauts niveaux de glucose augmentent la production de ROS dans les neurones POMC et le jeûne prolongé entraîne une réduction de la production ROS dans les neurones POMC et une inactivation de ces neurones (Andrews et al. 2008; Dagon et al. 2012; Diano and Horvath 2012). Ainsi, les ROS peuvent agir de façon directe sur l'activité électrique des neurones POMC (Diano and Horvath 2012).

Le rôle controversé de l'insuline sur l'activité des neurones POMC

L'insuline est une hormone anorexigène produite par les îlots β du pancréas qui permet de réguler la glycémie. Cette hormone module l'activité des neurones POMC (Könner et al. 2007; Lin et al. 2010). Cependant la nature de cette modulation est controversée. En effet, des études montrent que l'insuline inhiberait l'activité électrique des neurones POMC (Plum et al. 2006; Williams et al. 2010), alors que d'autres montrent que l'insuline activerait les neurones POMC (Qiu et al. 2014). Cette discordance semble être due à la nature de l'insuline utilisée. En effet, Williams et ses collaborateurs ont utilisé une formulation d'insuline contenant du zinc, qui pourrait faciliter l'activation des neurones POMC (Williams et al. 2010) alors que Qiu et ses collaborateurs ont travaillé avec de l'insuline purifiée, sans ions zinc, et ont trouvé que l'insuline dépolarise les neurones POMC via les canaux TRPC5 (Qiu et al. 2014).

L'étude d'un modèle mutant pour le récepteur à l'insuline dans l'hypothalamus pour lequel la réexpression du récepteur est induite uniquement dans les neurones POMC montre que les contacts synaptiques inhibiteurs sur les neurones POMC sont réduits en corrélation avec une augmentation de la dépense énergétique, une résistance à l'insuline exacerbée et une augmentation de la production hépatique de glucose (Lin et al. 2010). Cependant l'ablation du récepteur à l'insuline spécifiquement dans les neurones ne semble pas avoir d'effet sur la prise alimentaire et le métabolisme du glucose (Hill et al. 2010). L'ensemble de ces résultats ne permet pas de dresser un modèle simple sur le rôle de l'insuline sur les neurones POMC mais indiquent dans tous les cas une modulation probable de l'activité de ces neurones par l'insuline.

Le système endocannabinoïde, un modulateur de l'activité des neurones POMC

Les endocannabinoïdes qui incluent le 2-arachidonylglycérol (2-AG) et l'anandamide (AEA), modulent la transmission synaptique via des récepteurs couplés à une protéine G, appelés récepteurs aux cannabinoïdes de type 1 (CB1R) et de type 2 (CB2R). L'importance de ce système dans le contrôle de la balance énergétique ne fait plus de doute. Ce système jouerait d'ailleurs un rôle à la fois dans le contrôle homéostatique de la prise alimentaire et dans ses aspects hédoniques et motivationnels (Lau et al. 2017). Au niveau hypothalamique, une colocalisation entre les ARN messagers de CB1R et de neuropeptides impliqués dans les circuits de la prise alimentaire tels que CRH, CART, prepro-orexine et MCH a montré pour la première fois la présence de ce système au sein des circuits contrôlant la balance énergétique (Cota et al. 2003). Puis la présence de CB1R a été montrée dans différents types de neurones : les neurones à orexines (Cristino et al. 2013), les neurones SF-1 (Cardinal et al. 2014), les neurones Sim-1 (Cardinal et al. 2015) et les neurones POMC ((Koch et al. 2015a; Morello et al. 2016). Les agonistes CB1R peuvent stimuler la prise alimentaire, même chez la souris rassasiée (Koch et al. 2015a). De manière surprenante, ce traitement active les neurones POMC et cette activation est même nécessaire pour stimuler la prise alimentaire. Cette fonction inhabituelle pour les neurones POMC serait liée à une plasticité « neurochimique » de ces neurones. En effet, l'activation du CB1R sur les neurones POMC inhibe la formation d' α -MSH et sa libération au profit d'une synthèse et d'une libération accrues de β -endorphine qui serait impliquée dans la réponse comportementale.

Les neurones POMC sont également sous contrôle de neurones à orexines, localisés dans l'aire hypothalamique latérale. Le contrôle des orexines sur les neurones POMC implique une production d'endocannabinoïdes par les neurones POMC et une autorégulation via les récepteurs CB1R ce qui réduit *in fine* l'expression et la libération d' α -MSH (Morello et al. 2016).

Si les endocannabinoïdes peuvent médier les effets morphogènes de la leptine qui provoque une réorganisation synaptique au niveau des neurones à orexines (Cristino et al. 2013), on ne sait pas actuellement si un tel mécanisme endocannabinoïdes-dépendant est aussi impliqué dans le remodelage synaptique du système à mélanocortine sous action de la leptine.

b) Les neurones AgRP, « neurones de la faim »

Les neurones orexigènes AgRP stimulent la prise alimentaire lorsqu'ils sont activés (Aponte et al. 2011). Ils expriment le peptide AgRP qui présente une haute affinité pour le récepteur MC4R dont il est l'antagoniste (Cone 2005). Le peptide AgRP est exprimé uniquement dans le noyau arqué de l'hypothalamus (Hahn et al. 1998). Dans la grande majorité des neurones, il est exprimé en même temps que le neuropeptide Y (NPY) qui présente de nombreuses fonctions au niveau cérébral dont celle d'être orexigène. Chez la souris, il y a environ 450 neurones AgRP tous situés au niveau du noyau arqué (Hahn et al. 1998). Ces neurones expriment en grande majorité le peptide NPY et le nombre de cellules NPY positives dans le noyau arqué s'élève à 8000 cellules (Lemus et al. 2015). Des études en immunohistochimie ont montré que ces neurones se situent de part et d'autre du troisième ventricule de façon plus proximale que les neurones POMC qui sont plus latéraux (Cowley et al. 2001). Les neurones AgRP projettent vers le noyau du lit de la strie terminale, le noyau central de l'amygdale, le noyau paraventriculaire et l'aire latérale de l'hypothalamus et innervent également les neurones POMC au sein du noyau arqué (Cone 2005).

Les neurones AgRP sont de nature GABAergique (Pu et al. 1999). Jusqu'à présent, le rôle orexigène des neurones AgRP était résumé à leur action directe sur les neurones POMC via une inhibition GABA- et NPY-dépendante et une action antagoniste compétitive sur les neurones MC4R via le peptide AgRP (Cone 2005; Morton et al. 2006). Des études pharmacologiques, anatomiques et optogénétiques récentes ont permis de mettre en évidence d'autres modes d'action des neurones POMC et des neurones AgRP du noyau arqué sur la régulation de la prise alimentaire. En effet, le signaling MCR n'est pas systématiquement requis par les neurones AgRP pour médier leur effet orexigène, ce qui a été illustré dans deux différents modèles. Le premier modèle est une ablation sélective des neurones AgRP chez l'adulte. Cette procédure réduit le tonus GABAergique provenant des neurones AgRP dans une région impliquée dans la sensorialité du goût, le noyau parabrachial (PBN) dans le tronc cérébral, ce qui cause une inhibition totale de la prise alimentaire et à long terme une mort par famine (Luquet 2005; Wu et al. 2008; Wu, Boyle, and Palmiter 2009). Dans ce circuit, l'innervation AgRP du PBN maintient la prise alimentaire chez la souris d'une manière mélanocortine indépendante (Wu et al. 2008). Le second modèle comprend une activation chimique en pharmacogénétique ou

lumineuse en optogénétique des neurones du système à mélanocortine chez la souris. Ces expériences montrent qu'une activation spécifique des neurones AgRP est suffisante pour stimuler rapidement une prise alimentaire vorace chez l'animal nourri (Aponte et al. 2011; Krashes et al. 2011). Le mutant *Lethal yellow* présente une inhibition constitutive des récepteurs MCR par une expression ectopique de l'antagoniste Agouti. Or, chez ce mutant, l'activation lumineuse des neurones AgRP induit toujours une prise alimentaire vorace lors de l'activation lumineuse des AgRP malgré le blocage de la voie de signalisation de la mélanocortine par Agouti. La voie de signalisation du MCR n'est donc pas nécessaire aux neurones AgRP pour initier la prise alimentaire (Aponte et al. 2011). A l'inverse, la photo-activation des neurones POMC réduit la prise alimentaire, mais cet effet anorexigène est bloqué chez le mutant *Lethal yellow* (Aponte et al. 2011). L'inhibition de la prise alimentaire par les neurones POMC requiert donc le signaling de la mélanocortine. D'autres études révèlent que les neurones AgRP contrôlent différentes phases de la prise alimentaire. Les neurotransmetteurs GABA et NPY sont impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire à très court terme tandis qu'à l'instar des neurones POMC du noyau arqué, le peptide AgRP contrôle la prise alimentaire sur des durées plus longues en agissant sur MC4R (Aponte et al. 2011; Atasoy et al. 2012; Krashes et al. 2013; Zhan et al. 2013). Un nombre croissant de résultats suggère que les neurones POMC et les neurones AgRP ne contrôlent pas uniquement la prise alimentaire adaptative mais aussi les comportements motivationnels de la prise alimentaire (Krashes et al. 2013), la préférence pour les saveurs (Betley et al. 2015), l'anorexie due à un malaise viscéral (Carter et al. 2013) et les comportements relatifs à la récompense (Dietrich et al. 2012). De plus, ces neurones contribuent à la régulation anticipée du comportement alimentaire en prenant en compte la valeur nutritionnelle et la disponibilité de la nourriture en parallèle de l'état physiologique interne (Chen et al. 2015). Il semble que le contrôle de ces différents aspects du comportement alimentaire repose sur l'existence de différents circuits parallèles issus des différentes sous-populations de neurones AgRP (Betley et al. 2013).

5. Plasticité du système à mélanocortine adulte

La plasticité neurale désigne la capacité du tissu nerveux à modifier sa structure et sa fonction en fonction de l'expérience. Cette caractéristique repose sur la propriété du neurone à pouvoir modifier son activité en adaptant sa réactivité, son contenu moléculaire et ses connections. Au niveau synaptique, la plasticité inclue des processus fonctionnels qui renforcent ou inhibent les synapses déjà existantes, en modulant la probabilité de relargage des neurotransmetteurs, la quantité et la conductance des récepteurs post synaptiques, mais elle inclue aussi des modifications structurales qui consistent en la formation ou l'élimination de synapses. L'hypothalamus, qui assure la stabilité du milieu interne, est une région cérébrale propice à la plasticité synaptique (Theodosis and Poulain 1993).

Le concept selon lequel l'hypothalamus mature est capable de plasticité morphologique en réponse aux variations de l'état physiologique et aux signaux hormonaux n'est pas récent. Dans les années 80, la réorganisation synaptique dans le système à ocytocine a été mise en évidence pendant la lactation et en réponse à des changements dans l'homéostasie hydrique (Theodosis and Poulain 1993). Dans la même période, un remodelage synaptique a été découvert dans l'hypothalamus en réponse aux hormones stéroïdes sexuelles et durant le cycle estrien. Ce mécanisme hormono-dépendent de plasticité synaptique affecte les neurones à GnRH impliqués dans le contrôle central de la reproduction (Garcia-Segura, Lorenz, and DonCarlos 2008; Hung et al. 2003; Lehman et al. 1988; Witkin et al. 1991).

1) Plasticité en réponse aux hormones

Durant les deux dernières décennies, Tamas Horvath et ses collaborateurs ont clairement établi que le système à mélanocortine est un réseau hypothalamique dont la connectivité est affectée par les variations des taux d'hormones circulantes. Ces études convaincantes sont basées sur des paradigmes de déplétion-supplémentation hormonale *in vivo* combinés à des explorations approfondies de l'organisation synaptique des neurones POMC et des neurones NPY du noyau arqué. Dans la première étude, la situation synaptique du mutant *ob/ob*, qui présente une mutation sur le gène de la leptine générant une déficience en leptine, a été comparée à celle de la souris sauvage, saine, et de la souris *ob/ob* supplémentée en leptine. Des études en microscopie électronique sur des sections de cerveau fixé combinées à des enregistrements en électrophysiologie sur des tranches de cerveaux *ex vivo* ont révélé i) que la composition des synapses apposées sur les neurones du système à mélanocortine chez le mutant *ob/ob* diffère de la souris contrôle et ii) que l'apport de leptine exogène induit un changement de composition des afférences synaptiques reçues par les neurones POMC dans l'hypothalamus adulte, en augmentant notamment les synapses excitatrices apposées sur les neurones POMC 6h après injection en intrapéritonéale. Des effets opposés ont été montrés sur les neurones NPY/AgRP (Pinto et al. 2004). Les changements synaptiques induits par la leptine sont cohérents avec l'effet anorexigène de cette hormone et suggèrent qu'une relation de cause à effet doit exister entre l'effet morphogène et le comportement alimentaire (Figure 2).

Des stratégies similaires ont été utilisées pour mettre en évidence les propriétés remodelantes de l'estradiol et de la corticostérone. Le traitement à l'estradiol chez la rate ovariectomisée provoque une augmentation des synapses excitatrices sur les neurones POMC, corrélée à une augmentation de leur activité électrique et de leur tonus exciteur, en accord avec l'effet anorexigène de l'estradiol (Gao et al. 2007). L'adrénalectomie et la diminution de corticostérone circulante associée provoquent un remodelage sur les neurones POMC et les neurones AgRP/NPY (Gyengesi et al. 2010). Les synapses inhibitrices contactant les neurones POMC sont diminuées et les synapses excitatrices contactant les neurones AgRP/NPY sont diminuées, ce qui est cohérent avec l'effet anorexigène de la corticostérone. Le nombre de synapses revient au niveau de la souris intacte après traitement exogène à la corticostérone (Gyengesi et al. 2010). Les

effets de ces hormones sur l'organisation du système à mélanocortine du noyau arqué sont donc systématiquement cohérents avec leurs actions physiologiques.

D'autres études ont également montré que l'injection de ghréline chez des souris sauvages induisait également un remodelage synaptique sur les neurones POMC et les neurones AgRP/NPY (Andrews et al. 2008; Pinto et al. 2004). Toutes ces observations indiquent que le système à mélanocortine conserve une capacité de plasticité synaptique chez l'adulte en réponse à des signaux métaboliques et en particulier aux hormones, telles que la leptine, la ghréline, la corticostérone ou l'estradiol.

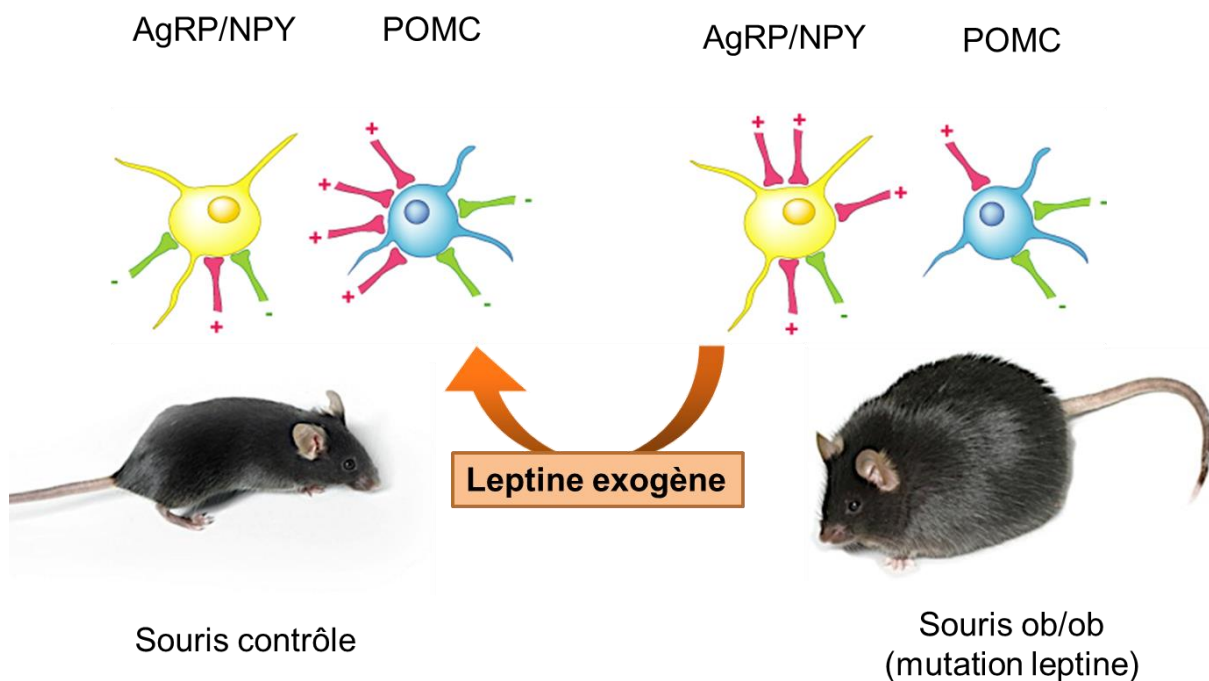


Figure 3: Représentation schématique de la plasticité synaptique du système à mélanocortine due à l'hormone leptine (d'après Pinto et al, 2004) Chez la souris ob/ob, les synapses apposées sur les neurones AgRP/NPY et les neurones POMC diffèrent en termes de nombre et de type de synapses de ceux rencontrés chez la souris contrôle. Les synapses excitatrices sont plus nombreuses sur les neurones AgRP/NPY et moins nombreuses sur les neurones POMC. Les synapses inhibitrices sont diminuées sur les neurones AgRP/NPY et augmentées sur les neurones POMC. Ces configurations synaptiques sont corrélées avec une hyperphagie dans ce modèle. L'injection de leptine en intrapéritonéale chez la souris ob/ob entraîne en 6h un rétablissement de la connectivité dans le système à mélanocortine vers une configuration semblable à celle rencontrée chez la souris contrôle.

2) Plasticité en réponse à un changement de l'état nutritionnel

La plasticité du système à mélanocortine dans le cerveau a été initialement mise en évidence en réponse à un traitement hormonal de substitution lors d'une perte de fonction génétique comme chez le mutant *ob/ob*, ou lors d'une ablation chirurgicale de glandes endocrines comme chez la rate ovariectomisée ou chez la souris adrenalectomisée. Ces résultats ont changé notre compréhension du mode de régulation des hormones sur le système à mélanocortine en révélant une propriété fondamentale de ce système : sa plasticité.

Une seconde avancée a eu lieu dans les années 2010 lorsqu'il a été montré un réarrangement synaptique sur les neurones POMC et AgRP en réponse à un changement de l'état nutritionnel chez la souris intacte « normale », en dehors de tout désordre génétique ou manipulation chirurgicale.

On sait depuis longtemps qu'en condition de balance énergétique positive, les hauts niveaux de leptine circulante peuvent stimuler les neurones POMC du noyau arqué et activer la voie du MC4R en aval (Cowley et al. 2001; Vong et al. 2011; Yang et al. 2011). On a découvert récemment que la leptine pouvait exercer son rôle anorexigène via une signalisation indirecte complexe impliquant les neurones POMC. En effet, la leptine peut inhiber le tonus AgRP en réduisant le tonus excitateur appliqué sur ces neurones et ce mécanisme implique une signalisation par le récepteur aux opioïdes. Dans le détail, la leptine favorise le relargage de β -endorphine issues des neurones POMC ce qui inhibe finalement l'activité glutamatergique de neurones inconnus (dont le neuropeptide n'a pas été caractérisé) qui innervent les neurones AgRP (Yang et al. 2011).

A l'opposé, la privation de nourriture induit un remodelage synaptique sur les neurones POMC et les neurones AgRP (Liu et al. 2012a; Vong et al. 2011; Yang et al. 2011). La ghréline orexigène, dont les niveaux sont élevés après une mise à jeun (Tschöp, Smiley, and Heiman 2000), favorise un relargage glutamatergique et cela est lié à l'apposition de nouveaux contacts synaptiques excitateurs sur les neurones AgRP (Yang et al. 2011). Les voies intracellulaire du Ca^{2+} et de l'AMPK sont nécessaires pour déclencher ce phénomène dans les neurones glutamatergiques présynaptiques (Yang et al. 2011). Les récepteurs au N-méthyl-d-aspartate (NMDA) et l'activation de la spinogénèse dans les neurones AgRP sont également requis pour augmenter l'activité AgRP pendant le jeûne

(Liu et al. 2012b). De plus, la chute des taux de leptine circulante durant le jeûne augmente le tonus inhibiteur sur les neurones POMC (Vong et al. 2011; Yang et al. 2011). Cette inhibition pourrait provenir de l'innervation des neurones POMC par les neurones AgRP GABAergiques activés par la ghréline (Atasoy et al. 2012; Cowley et al. 2001; Tong et al. 2008; Vong et al. 2011) mais aussi et surtout de l'apparition de nouveaux contacts inhibiteurs sur les neurones POMC provenant de neurones GABAergiques non-AgRP (Vong et al. 2011) (Figure 3).

Le modèle de reconnexion neuronale induit par la privation de nourriture implique deux signaux opposés opérant sur plusieurs cibles cellulaires. La ghréline, dont les taux s'élèvent, favorise l'apparition de nouvelles synapses excitatrices sur les neurones POMC, tandis que l'effondrement de la leptine permet l'apparition de nouvelles synapses inhibitrices sur les neurones POMC. Par ailleurs, la suralimentation constitue également une situation métabolique particulière qui stimule la plasticité du système à mélanocortine.

En effet, l'application d'un régime gras pendant 3 jours chez la souris augmente les afférences excitatrices reçues par les neurones POMC (Benani et al. 2012). Cette observation indique que la plasticité synaptique sur les neurones POMC et les neurones AgRP n'est pas une réponse spécifique à la mise à jeun mais est déclenchée lors d'une déviation de la balance énergétique positive ou négative. Les voies moléculaires sous-tendant ces phénomènes diffèrent probablement selon la situation.

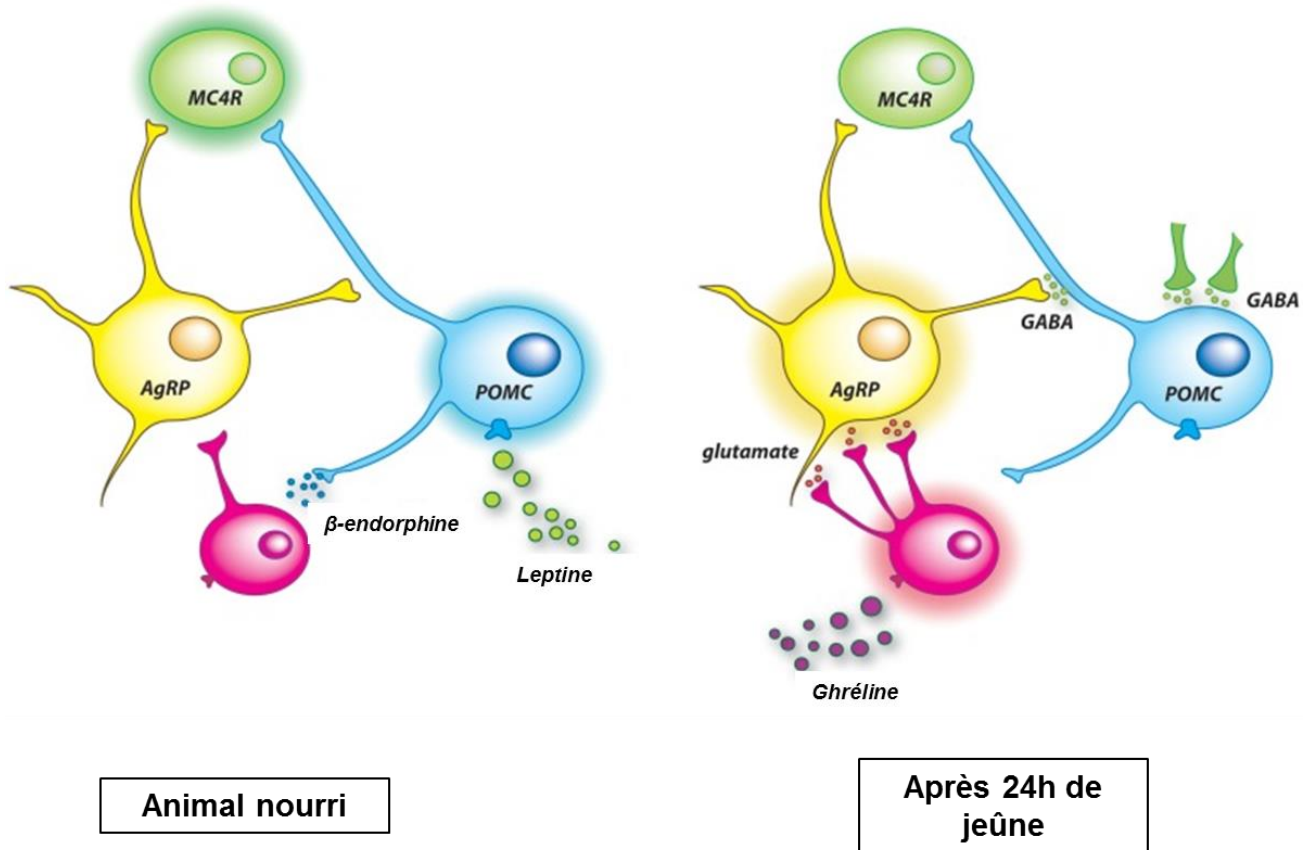


Figure 4 : Représentation schématique de la plasticité synaptique sur les neurones POMC et AgRP en fonction de l'état nutritionnel (adaptée d'après Nuzzaci et al, 2015). Deux états nutritionnels sont comparés : l'état nourri ad libitum et l'état mis à jeûn pendant 24h. Chez l'animal nourri, les taux de leptine circulante permet l'activation des neurones POMC qui agissent sur les neurones MC4R afin d'inhiber la prise alimentaire. En parallèle, ils sécrètent de la β -endorphine qui permet d'inactiver un neurone glutamatergique (en rose). Après 24h de jeûne, les taux élevés de ghréline circulante active le neurone glutamatergique (en rose) qui génère des synapses excitatrices glutamatergiques qui active le neurone AgRP. Le neurone AgRP activé sécrète de l'AgRP qui agit sur les neurones MC4R comme antagoniste. Le neurone AgRP sécrète également du GABA qui va inhiber de façon directe le neurone POMC. De plus, des synapses GABA nouvellement formées provenant d'un neurone GABAergique non identifié renforce l'inhibition directe du neurone POMC par le neurone AgRP.

3) Le rôle physiologique de la plasticité synaptique du système à mélanocortine

La capacité du cerveau à reconfigurer ses réseaux neuronaux selon des modalités structurales et fonctionnelles en fonction de l'expérience montre la faculté d'adaptation de cet organe face à un environnement changeant. Les réarrangements synaptiques sur les neurones POMC et les neurones AgRP en réponse aux signaux métaboliques pourraient être un modulateur de la réactivité du système à mélanocortine dans le but de contrôler le comportement alimentaire en accord avec la disponibilité en énergie. Cet attribut permettrait d'éviter des réponses stéréotypées et des comportements mal adaptés. Par exemple, chez les animaux à jeun, le remodelage synaptique sur les neurones AgRP et les neurones POMC pourrait contribuer à augmenter la sensibilité pour les signaux métaboliques et augmenter le seuil des signaux de satiété afin d'augmenter la prise alimentaire suite à une privation de nourriture. Cependant cette relation de cause à effet n'a jamais été établie formellement. Néanmoins, l'implication de la plasticité du système à mélanocortine dans la régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique est très probable. En effet, le réarrangement synaptique sur les neurones POMC ou AgRP a lieu chez l'adulte en réponse à une déviation positive ou négative d'un état métabolique basal, à savoir des situations qui nécessitent une régulation centrale du métabolisme énergétique et du comportement alimentaire (Benani et al. 2012; Liu et al. 2012; Yang et al. 2011). De plus, le réarrangement synaptique sur les neurones POMC et/ou AgRP causé par un déséquilibre métabolique est cohérent avec l'activation d'une réponse médiée par les changements d'activités neuronales POMC et/ou AgRP à savoir une augmentation du tonus orexigène ou anorexigène de la part de ce système selon les cas. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les hormones affectent la synaptologie des neurones AgRP et des neurones POMC d'une manière cohérente avec leurs effets sur la prise alimentaire et la régulation du poids corporel (Gao et al. 2007; Gyengesi et al. 2010; Pinto et al. 2004; Yang et al. 2011). Enfin, la suppression de PSA, molécule permissive favorisant la plasticité synaptique, inhibe le recablage des neurones POMC durant un régime hypercalorique et surtout altère la normalisation de la prise énergétique qui en découle (Benani et al. 2012). Ces résultats suggèrent que le recablage des neurones POMC induit par le régime gras contribue au contrôle homéostatique de la prise alimentaire. Des études plus approfondies basées sur la manipulation cellule-spécifique de la plasticité synaptique chez l'adulte par opposition

au retrait de PSA non ciblé sont désormais nécessaires pour caractériser les conséquences physiologiques des mécanismes de plasticité induite par des changements de l'état nutritionnel.

4) Autres mécanismes de plasticité neurale provoqués par un désordre métabolique

La plasticité synaptique du système à mélanocortine est considérée comme un processus adaptatif activé par des variations drastiques d'hormones circulantes apparaissant lors de circonstances métaboliques extrêmes. D'autres processus de plasticité sont mis en jeu en réponse à ces challenges métaboliques. Le statut métabolique pourrait ainsi modifier le renouvellement cellulaire dans les circuits neuronaux contrôlant la balance énergétique. Une exposition brève de 3 jours à un régime gras stimule le renouvellement cellulaire dans l'hypothalamus (Gouazé et al. 2013). Cela semble affecter des cellules gliales matures aussi bien que des précurseurs de cellules neuronales. D'ailleurs, une fraction de cellules néoformées adoptent un phénotype POMC à 3 semaines d'exposition au régime gras (Gouazé et al. 2013). Cela indique que le renouvellement cellulaire est accéléré durant un déséquilibre métabolique et suggère que la maturation des cellules nouvellement formées est régulée de façon nutritionnelle dans le but de maintenir l'homéostasie énergétique. A plus long terme, lorsque la pression calorique se poursuit pendant 2 à 6 mois, on ne détecte plus de différences de nombre de neurones POMC dans le noyau arqué (Lemus et al. 2015). Toutefois, une exposition plus longue, de 8 mois, induit une diminution du nombre de neurones POMC dans le noyau arqué précédée d'une augmentation de l'autophagie au sein de ces neurones et d'une augmentation de la protéine chaperonne Hsp72, impliquée dans la régulation négative de l'apoptose (Thaler et al. 2011). Cette perte de neurones POMC à long terme serait donc liée à un processus neurodégénératif favorisé par l'exposition chronique à une diète non physiologique. D'autres processus cellulaires sont déclenchés en parallèle lors de modifications de l'état métabolique. Par exemple, un jeûne de 24h peut induire un remodelage de la barrière tanocytaire et change la perméabilité des capillaires de l'éminence médiane et du noyau arqué de l'hypothalamus (Langlet et al. 2013). Ce mécanisme modifie la diffusion de facteurs sanguins depuis le compartiment sanguin vers le parenchyme du noyau arqué et. Ces remodelages structuraux dans les centres cérébraux de la prise alimentaire pourraient renforcer une plasticité fonctionnelle basée sur des mécanismes pharmacologiques dans

les circuits neuronaux. Ainsi, le régime gras induit une suppression transitoire des neuropeptides orexigènes au profit des neuropeptides anorexigènes (Ziotopoulou et al. 2000). Les neuropeptides sécrétés par les neurones POMC peuvent également varier de façon sélective, ce qui va augmenter la plasticité du système neuronal. En effet, l'activation du récepteur aux endocannabinoïdes CB1R induit un relargage de β -endorphine et non plus de α -MSH dans une fraction de neurones POMC, changeant dans ces conditions la fonction de ces neurones, au départ anorexigènes mais qui deviennent orexigènes (Koch et al. 2015). D'une façon intéressante, la neurotransmission dans le système dopaminergique de la VTA est également régulée par l'état métabolique et par la voie des endocannabinoïdes (Labouebe et al. 2013). Ce mécanisme pourrait réguler l'activité anticipatoire à la consommation d'aliments et la préférence alimentaire. Ainsi la plasticité du système à la mélanocortine pourrait être un élément particulier d'un ensemble de mécanismes variés et nombreux, tous déclenchés lors de déséquilibres métaboliques. Ces mécanismes complémentaires, basés sur des changements structuraux mais aussi fonctionnels, semblent être mis en œuvre au sein de différents circuits homéostatiques et hédoniques.

6. Les cellules gliales, acteurs dans le contrôle de la balance énergétique

1) Les astrocytes régulent la connectivité des neurones du système à mélanocortine

Longtemps considérés comme un support physique des réseaux neuronaux, il est maintenant bien établi que les astrocytes ont également une fonction dans la régulation de l'activité neuronale et de la physiologie cérébrale. En effet, ces cellules en forme d'étoile peuvent réguler le microenvironnement neuronal en agissant au niveau de la barrière hématoencéphalique grâce à leurs prolongements contactant les vaisseaux sanguins (Abbott et al. 2010). Ils peuvent sécréter des facteurs modulant la pression sanguine au niveau local (Metea 2006; Zonta et al. 2002). Ils contrôlent ainsi les molécules délivrées aux neurones. Les astrocytes jouent également un rôle dans l'établissement des réseaux neuronaux en influençant la différenciation et la prolifération des neurones ainsi que la synaptogénèse au cours du développement (Clarke and Barres 2013; Nedergaard, Ransom, and Goldman 2003). Il a également été montré que les astrocytes sous forme de réseau astrocytaire peuvent moduler la transmission synaptique à distance en communiquant via des jonctions cellulaires communicantes (Bennett et al. 2003; Rouach et al. 2008). Les astrocytes peuvent moduler la transmission synaptique directement en recaptant le glutamate, protégeant ainsi les neurones contre l'excitotoxicité glutamatergique provoquée par un excès de neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique (Araque et al. 1999; Nedergaard et al. 2003; Ransom, Behar, and Nedergaard 2003). Enfin, l'astrocyte est capable de sécréter des gliotransmetteurs pouvant moduler la force synaptique tel que l'adénosine, la D-sérine ou encore le glutamate et le facteur TNF α (Gordon et al. 2005, 2009; Halassa et al. 2009; Jourdain et al. 2007; Kang et al. 1998; Panatier et al. 2006; Perea, Navarrete, and Araque 2009; Zhang et al. 2004).

Les astrocytes sont, comme certains neurones, sensibles aux signaux métaboliques sanguins tels que le glucose. En effet, ce sont les premières cellules à capter le glucose sanguin dû à leur place privilégiée au niveau de la barrière hémato-encéphalique (Guzmán and Blázquez 2001). Les pieds astrocytaires contactant les vaisseaux sanguins expriment le transporteur au glucose GLUT-1 (Kacem et al. 1998; Morgello et al. 1995; Vannucci, Maher, and Simpson 1997). Au niveau de ces cellules, le glucose est stocké

sous forme de glycogène ou est métabolisé sous forme de lactate destiné aux neurones (Levin et al. 2011). De plus, l'augmentation du transport du glucose et de sa métabolisation dans les astrocytes est corrélée à une augmentation de l'activité neuronale (Levin et al. 2011).

D'une façon intéressante, les astrocytes présents au niveau des régions impliquées dans le contrôle de la balance énergétique expriment un autre transporteur au glucose, GLUT-2, qui semble être impliqué dans la détection du glucose au niveau cérébral qui permet de réguler la glycémie ainsi que la prise alimentaire (Marty et al. 2005; Stolarczyk et al. 2010). De plus, la perte de capacité de GLUT-2 à détecter le glucose sans modification de sa fonction de transport entraîne une augmentation de la prise alimentaire (Stolarczyk et al, 2010). Les astrocytes sécrètent également des endozépinines, facteurs connus pour leur effet anorexigène (do Rego et al. 2007). Les astrocytes participeraient à l'intégration de fluctuations de glycémie en agissant sur le système à mélanocortine (Lanfray et al. 2013).

Les astrocytes pourraient également participer à la détection et à l'intégration des signaux métaboliques de nature lipidique. Ils peuvent en effet métaboliser des acides gras à longue chaîne (Bouyakdan et al. 2015) et sont d'ailleurs le principal acteur de l'oxydation des acides gras au niveau cérébral (Auestad et al. 1991; Guzmán and Blázquez 2001). L'oxydation des acides gras dans les astrocytes hypothalamiques est modulée par le glucose qui inhibe ce processus par la voie AMPK (Taïb et al. 2013). Les astrocytes expriment également le récepteur PPAR γ qui participe à la détection des lipides au niveau cérébral (Cristiano et al. 2005; Heneka and Landreth 2007) et le transporteur lipidique ApoE (Boyles et al. 1985; Krul and Tang 1992), qui agit comme un facteur anorexigène en médiant les effets de la leptine (Shen et al. 2008). Les corps cétoniques produits par l'oxydation des acides gras dans les astrocytes peuvent être utilisés par les neurones comme source d'énergie en situation de jeûne (Auestad et al. 1991; Blazquez et al. 1999; Panov et al. 2014) mais leur synthèse est également présente lors d'une exposition chronique à un régime riche en lipides, ce qui perturbe l'intégration des signaux lipidiques et le contrôle de la balance énergétique (Le Foll et al. 2014).

Il est également connu que les astrocytes expriment les récepteurs aux hormones pouvant réguler la balance énergétique comme la leptine, l'insuline, la ghréline et les

glucocorticoïdes ce qui renforce le concept d'une régulation énergétique par les astrocytes (Argente-Arizon et al. 2015; García-Cáceres et al. 2011) (Figure 4). Les astrocytes de l'hypothalamus expriment le récepteur à la leptine LepR sous différentes isoformes. Le taux d'expression de LepR semble être région-dépendante avec le plus grand taux d'expression dans l'hypothalamus (García-Cáceres et al. 2011). L'expression de ce récepteur est augmentée chez le rongeur obèse dans les cellules GFAP positives, majoritairement les astrocytes (Diano, Kalra, and Horvath 1998; Hsueh, He, et al. 2009; Hsueh, Pan, et al. 2009; Kim et al. 2014; Pan et al. 2008). De plus la morphologie des astrocytes est modifiée par la leptine (García-Cáceres et al. 2011; Kim et al. 2014) et ces modifications morphologiques pourraient influencer les synapses reçues par les neurones POMC et les neurones NPY qui contrôlent la prise alimentaire (Kim et al. 2014). En effet, la couverture astrocytaire présente à la surface de ces neurones module les configurations synaptiques entre neurones en favorisant les contacts synaptiques par un retrait des prolongements astrocytaires ou à l'inverse en rendant la membrane des corps cellulaires inaccessible aux contacts synaptiques par une augmentation des contacts astrocytaires sur les somas POMC et les somas NPY (Horvath et al, 2010). De plus, la réponse à la leptine au niveau glial provoque une augmentation de la production de cytokines par les astrocytes (García-Cáceres et al. 2011). La leptine modifie également la production de glutamate et de glucose par les astrocytes (Fuente-Martín et al. 2012), et peut modifier le recaptage du glutamate par ces cellules et moduler la transmission synaptique. Ainsi les effets de la leptine sur l'astrocyte sont multiples, i) générant des médiateurs pouvant influencer les circuits neuronaux contrôlant l'appétit et le poids, ii) modifiant la connectivité de ces circuits et iii) agissant sur la transmission synaptique, probablement de ces mêmes circuits.

Récemment, il a été montré que l'ablation en post-natal du récepteur à l'insuline spécifiquement dans les astrocytes influence l'activité des neurones POMC. En effet, la détection du glucose par ces neurones est diminuée, la densité de leur réseau mitochondrial est altérée et leur couverture astrocytaire est diminuée à leur périphérie (García-Cáceres et al. 2016). Cela s'accompagne de dérégulation du contrôle glycémique périphérique.

Concernant la sensibilité astrocytaire à la ghréline, les études sont encore rares. La ghréline peut agir sur les astrocytes hypothalamiques, notamment en modifiant

l'expression des transporteurs du glucose et du glutamate, mais son effet via ces cellules sur la balance énergétique reste finalement inconnu (García-Cáceres et al. 2014).

La sensibilité des astrocytes aux hormones et aux nutriments permet d'émettre l'hypothèse que les astrocytes réguleraient la balance énergétique. De plus en plus d'études décrivent le rôle de ces cellules gliales en relation avec les neurones du système à mélanocortine du noyau arqué. Kim et ses collaborateurs ont montré en 2014 que l'ablation génétique du récepteur à la leptine spécifiquement dans les astrocytes modifie l'activité des neurones POMC et des neurones AgRP ainsi que les contacts astrocytaires présents sur leurs somas et que cela pouvait altérer le comportement alimentaire (Kim et al. 2014). En parallèle, il a été montré que les astrocytes ont un rôle dans le maintien de l'homéostasie énergétique via la voie NF κ B. L'inhibition lors de la suralimentation de cette voie dans les astrocytes conduit à une mauvaise régulation de la prise alimentaire 24h après mise sous régime riche en lipides (Buckman et al. 2015). De plus, les astrocytes modifient leur morphologie après un jeûne prolongé et ces modifications morphologiques sont retrouvées après une activation constitutive de NF κ B (Zhang et al. 2017). Enfin, des études plus récentes utilisant la technologie DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) renforcent le concept selon lequel les astrocytes contrôleraient le comportement alimentaire. Les DREADD sont des récepteurs muscariniques modifiés permettant selon leur couplage aux protéines G inhibitrices ou activatrices, d'inhiber ou d'activer des cellules après liaison au ligand exogène clozapine (CNO). Cette technique est largement utilisée pour manipuler l'activité des neurones et commence à être employée en ce qui concerne la manipulation des astrocytes. Yang et ses collaborateurs ont montré que l'activation des astrocytes par les DREADD couplés à une protéine Gq diminue la prise alimentaire basale en deuxième partie de la période nocturne et diminue la prise alimentaire stimulée par la ghréline. D'un autre côté, l'activation des astrocytes par les DREADD facilite la prise alimentaire lorsque celle-ci est limitée sous l'action de la leptine. A contrario, l'inactivation des astrocytes ne modifie pas la prise alimentaire basale mais augmente la prise alimentaire induite par la ghréline et diminue la régulation de la prise alimentaire par la leptine (Yang, Qi, and Yang 2015). Cette étude montre que l'astrocyte tempère les effets des signaux hormonaux sur la prise alimentaire en stabilisant celle-ci de manière bidirectionnelle. Ces effets pourraient être dépendants d'un relargage astrocytaire d'adénosine sur les neurones AgRP (Yang et al. 2015). Cependant, une autre

étude utilisant les mêmes DREADD montrent un effet inverse sur la prise alimentaire (Chen et al. 2016). En effet, Chen et ses collaborateurs montrent que l'activation DREADD-dépendante des astrocytes du noyau arqué induit i) une augmentation de la prise alimentaire globale en période diurne associée à une augmentation du temps passé à la mangeoire et à une augmentation du comportement de recherche de nourriture, et ii) à une augmentation de la prise alimentaire dans les premières heures de la nuit mais sans augmentation de la prise alimentaire globale (Chen et al. 2016). Cette disparité dans les résultats de ces deux études montre que le rôle des astrocytes dans le contrôle de la prise alimentaire en relation avec les neurones du système à mélanocortine reste encore à élucider.

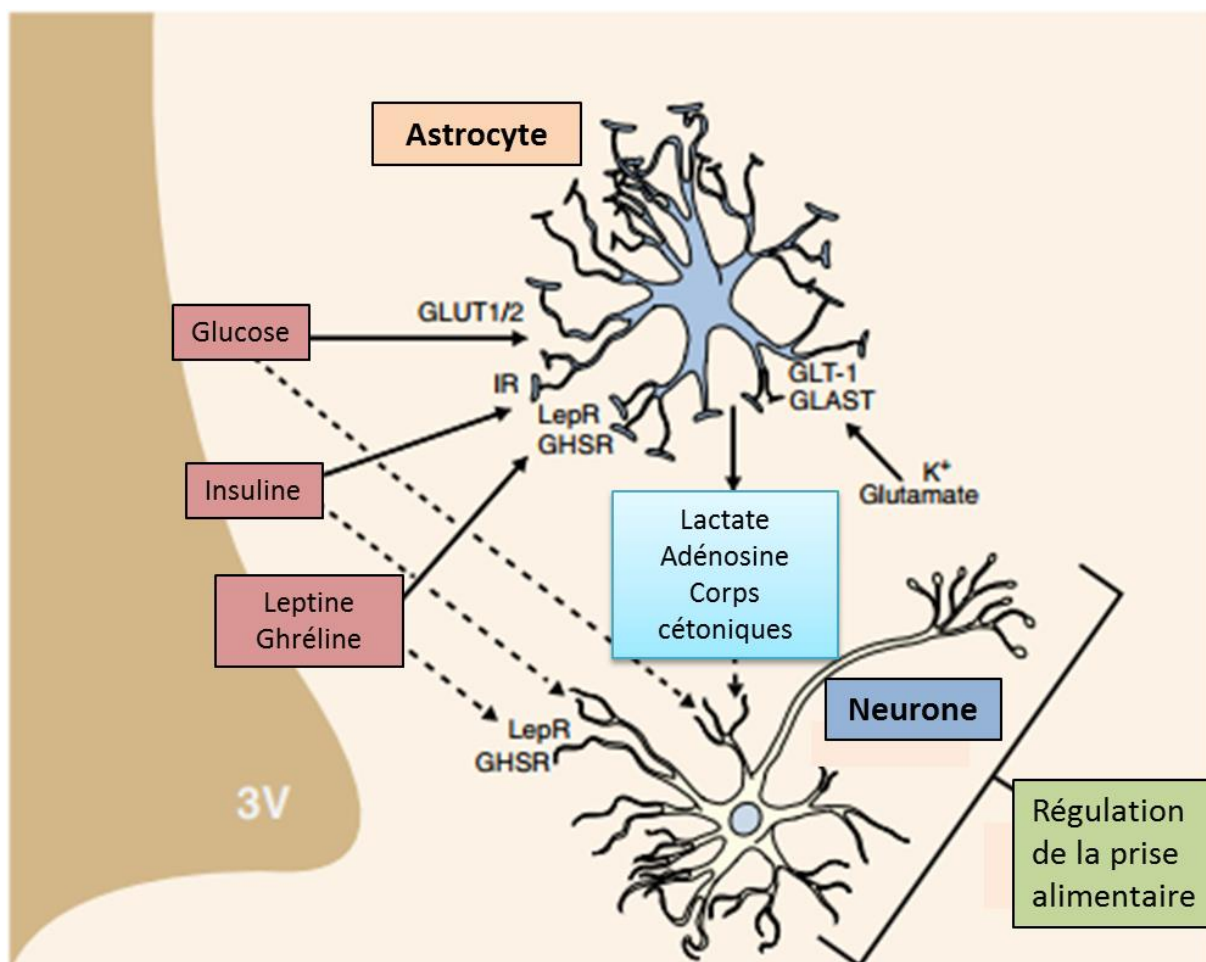


Figure 5 : Représentation schématique d'une régulation indirecte possible des neurones du système à mélanocortine dans le noyau arqué via les astrocytes (adaptée d'après Douglass et al, 2017)

2) Rôle des autres cellules gliales dans le métabolisme énergétique

a) La microglie

Au niveau cérébral, les cellules responsables de la veille immunologique sont des cellules gliales appelées d'une façon générale la microglie. Ces cellules d'origine mésodermale sont capables de s'auto-renouveler au niveau cérébral, sans lien avec les autres lignées myéloïdes -présentes au niveau de la moelle osseuse (Kettenmann et al. 2011). La microglie se distingue en différents sous types cellulaires caractérisés par une morphologie et une fonction particulière, le sous-type microglie au repos versus microglie réactive par exemple (Dalmau et al. 1997).

Lors d'un dommage cérébral, la microglie devient réactive et cette réactivité est notamment due à la libération par la zone endommagée et par la microglie réactive de facteurs amplifiant la réactivité microgliale pouvant conduire à une gliose (Block, Zecca, and Hong 2007). Chez le rongeur, la mise sous régime riche en lipides de façon chronique entraîne au niveau cérébral une inflammation à bas bruit au niveau de l'hypothalamus qui se caractérise par une activation de la microglie. Cela est visible dès 3 jours après introduction du régime gras. Cette inflammation pourrait conduire à des dommages neuronaux (Thaler et al. 2011). Une gliose est aussi retrouvée chez l'homme obèse (Thaler et al. 2011). De plus, une étude récente confirme que l'exposition à un régime gras pendant 3 semaines entraîne une prolifération cellulaire dans le noyau arqué et que ces cellules néoformées seraient de phénotype microglial (André et al. 2017). Cette réactivité microgliale serait délétère car le blocage de la prolifération microgliale entraîne une diminution du gain de poids sous régime gras, une augmentation de la sensibilité à la leptine ainsi qu'une diminution de l'inflammation hypothalamique (André et al. 2017). Pour autant, des résultats opposés ont été également obtenus (Gouazé et al. 2013), suggérant un rôle adaptatif de la prolifération cellulaire induite précocement par la mise sous régime gras. D'autres études sont donc nécessaires pour mieux comprendre le rôle de la microglie dans les phases précoces de l'obésité nutritionnelle.

Ce seraient les acides gras saturés et non les acides gras insaturés qui activent la microglie (Milanski et al. 2009). D'ailleurs, la microglie réactive favorise le stress neuronal et la résistance à la leptine et ce phénomène est dû à la consommation d'acides gras saturés (Valdearcos et al. 2014) . Cette réponse aux acides gras saturés est région

spécifique, puisqu'elle n'a lieu que dans l'hypothalamus (Milanski et al. 2009; Thaler et al. 2011; Valdearcos et al. 2014). De plus, la déplétion conditionnelle de la microglie ou l'atténuation de son activation pendant une exposition à un régime gras a un effet protecteur en limitant l'hyperphagie (Valdearcos et al. 2017). La microglie semble également sensible aux neuropeptides impliqués dans le contrôle de la balance énergétique comme l' α -MSH ou le NPY, qui agissent sur la production de cytokines et d'oxyde nitrique dans ces cellules (Delgado et al. 1998; Ferreira et al. 2012; Gonçalves et al. 2012). La microglie est sensible aux hormones du métabolisme. En effet, la leptine peut activer directement la microglie (Lafrance et al. 2010; Tang et al. 2007) en corrélation avec l'augmentation du poids corporel et du régime appliqué (Gao et al. 2014). La souris ob/ob déplétée pour la leptine présente une activation microgliale moins importante que chez la souris contrôle et l'exposition au régime gras de la souris ob/ob augmente l'activation microgliale mais sans jamais atteindre les niveaux d'activation rencontrés chez la souris contrôle (Gao et al. 2014). De plus, le traitement exogène par la leptine de la souris ob/ob induit une augmentation du nombre de cellules microgliales et un changement morphologique caractérisé par une augmentation de leurs ramifications (Gao et al. 2014).

L'activation microgliale conduit à une production de cytokines pro-inflammatoires. Il a été montré que ces cytokines activent des voies de signalisation telle que la voie NF κ B et que son activation est impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline et dans le diabète de type 2 (Shoelson, Lee, and Goldfine 2006). Au niveau central, l'ablation de l'inhibiteur de la voie NF κ B, IKK β , notamment dans les neurones AgRP, permet de prévenir la résistance à l'insuline chez le rongeur obèse (Purkayastha and Cai 2013; Zhang et al. 2008).

Ces données suggèrent que la microglie et son activation jouent un rôle dans le maintien de l'obésité et le développement de pathologies annexes à un poids corporel trop important comme le diabète de type 2.

b) Les tanocytes

Les tanocytes sont des cellules gliales spécialisées situées en bordure du 3^{ème} ventricule. Leur position dorso-ventrale détermine leur sous-types qui sont au nombre de 4 : suivant l'axe ventro-dorsal, on rencontre les sous types tanocytaires β 2, β 1, α 2 et α 1 (Rodriguez et al, 2005). Ces cellules présentent une morphologie particulière : elles

émettent de longs prolongements en direction du parenchyme cérébral ce qui permet aux tanocytes d'être à la fois au contact du fluide cérébro-spinal et des capillaires fenestrés de l'éminence médiane. De ce fait, les tanocytes les plus ventraux contribuent à l'établissement de la barrière hématoencéphalique (Rodriguez et al, 2007). Leur action sur le passage de molécules vers le parenchyme cérébral semble sélective, mais permet en tout cas le passage des nutriments et des hormones. Les tanocytes sont aussi impliqués dans le contrôle glycémique au niveau central. Les pieds tanocytaires au contact des capillaires fenêtrés expriment le transporteur au glucose GLUT-1 permettant le passage du glucose du sang vers le 3^{ème} ventricule (Morgello et al, 1995). Les tanocytes expriment également le transporteur GLUT-2, impliqué dans la détection centrale du glucose (Garcia et al, 2003 ; Millan et al, 2010). Il a été montré par l'équipe de Vincent Prévot que les tanocytes ont un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique, notamment durant le jeûne. En effet, le passage de nutriments et d'hormones dans le parenchyme cérébral du noyau arqué est facilité après un jeûne prolongé par i) une perméabilité augmentée des vaisseaux sanguins de l'éminence médiane et ii) une re-organisation des jonctions serrées entre tanocytes, empêchant le passage de nutriments ou d'hormones dans le liquide céphalo-rachidien. Cette plasticité de la barrière hémato-encéphalique est médiée par le facteur VEGF. L'inhibition de la voie de signalisation du VEGF induit une mauvaise adaptation comportementale après le jeûne se traduisant par une re-alimentation moins intense (Langlet et al. 2013). Ils présentent également la capacité de réguler le passage de la leptine dans l'hypothalamus en exprimant le récepteur ObR, notamment dans le sous type $\beta 2$ positionné au niveau de l'éminence médiane (Balland et al. 2014).

c) Autres cellules gliales

Les cellules NG2 sont des cellules gliales qui représentent la majorité des cellules nouvellement formées au sein de l'hypothalamus adulte (Kokoeva, Yin, and Flier 2005, 2007). Leur rôle le plus connu est celui d'être les précurseurs des oligodendrocytes (Dimou and Gallo 2015) et de présenter un fort potentiel d'auto-régénération (Hughes et al. 2013). Ces cellules sont impliquées dans la myélinisation pendant et après le développement (Young et al. 2013). Les cellules NG2 reçoivent également des afférences synaptiques d'origine neuronale (Bergles et al. 2000; De Biase, Nishiyama, and Bergles 2010). Récemment, il a été montré que ces cellules NG2 ont un rôle dans le contrôle de la

balance énergétique. En effet, l'ablation pharmacologique et génétique de la glie exprimant NG2 conduit à une obésité, même sous régime standard et les neurones du noyau arqué perdent leur sensibilité à la leptine après cette ablation (Djogo et al. 2016).

PROBLEMATIQUE

L'homéostasie énergétique est sous le contrôle du système à mélanocortine, notamment des neurones POMC et des neurones AgRP du noyau arqué. Les synapses apposées sur ces deux populations neuronales présentent la particularité d'être « plastiques » c'est-à-dire qu'elles peuvent se déplacer et évoluer en nombre et en nature, en fonction de signaux environnementaux. Cela a été montré en réponse à des fluctuations hormonales intenses : après supplémentation hormonale dans un contexte totalement déplété comme chez la souris ob/ob ou lors d'une ablation de glandes endocrines. Cela a aussi été mis en évidence dans des situations métaboliques sévères : après un jeûne de 24h ou lors d'une suralimentation forcée pendant 3 jours. Toutes ces situations présentent des variations hormonales supra-physiologiques et drastiques qui sont corrélées à des « mouvements » de synapses.

Selon ces études, on peut supposer que la plasticité synaptique remplit un rôle de défense face à une situation métabolique extrême, et serait activée afin d'ajuster les réponses autonomes plus efficacement, de retrouver l'équilibre énergétique plus rapidement et donc de conserver l'homéostasie énergétique. Cependant, le rôle physiologique de la plasticité synaptique du système à mélanocortine est encore à élucider. En effet, toutes les études réalisées ont été effectuées avec des modèles caractérisés par des changements métaboliques et hormonaux importants. Dans ce contexte, la question que nous nous posons est de savoir si ce phénomène de plasticité synaptique se met en place, chez le rongeur, uniquement lors de variations métaboliques importantes ou également lors de fluctuations hormonales physiologiques modérées, quotidiennes, comme celles rencontrées avant et après un repas. La plasticité synaptique pourrait donc être non plus simplement un système de défense face à une situation extrême mais un système régulateur qui influencerait le comportement alimentaire au quotidien et permettrait une adaptation à court terme du métabolisme énergétique. Dans les deux cas, l'importance de ces phénomènes dans le déclenchement de la réponse comportementale n'a pas été formellement établie et le lien reste uniquement corrélatif.

Enfin, deux questions demeurent :

- 1) Est-ce que la plasticité synaptique du système à mélanocortine est récapitulée à l'échelle des repas ?
- 2) Quel est le lien de cause à effet entre la plasticité du système à mélanocortine et le comportement alimentaire ?

Dans ce contexte, ma thèse s'articule autour de 3 objectifs :

Objectif 1 : Explorer les mécanismes de plasticité pouvant avoir lieu à court terme dans le système à mélanocortine du noyau arcué.

Objectif 2 : Décrire les mécanismes cellulaires et moléculaires pouvant déclencher une plasticité à court terme dans ce système neuronal.

Objectif 3 : Montrer le lien de cause à effet entre la plasticité du système à mélanocortine et le comportement alimentaire.

STRATEGIES

Pour explorer la plasticité du système à mélanocortine en fonction de l'état prandial, il était nécessaire de :

- Visualiser les neurones du système à mélanocortine,
- Mettre en œuvre des approches fonctionnelles et anatomiques ciblées sur les neurones d'intérêt,
- Modéliser l'état prandial chez la souris.

1. Visualiser les neurones du système à mélanocortine.

Afin d'explorer les phénomènes de plasticité synaptique dans le système à mélanocortine en fonction de l'état prandial, il était nécessaire de pouvoir repérer les neurones POMC et les neurones AgRP au sein du tissu cérébral. Nous avons installé au sein du laboratoire deux lignées de souris double transgéniques, permettant l'expression de la protéine fluorescente Tomato spécifiquement dans les neurones POMC d'une part et les neurones AgRP d'autre part sous la dépendance d'un système cre-lox.

Nous avons utilisé deux lignées transgéniques permettant de moduler l'expression de gènes dans les neurones AgRP et les neurones POMC :

- La lignée *Agrptm1(cre)Lowl/J* ou *AgRP-ires-Cre*, exprimant la Cre recombinase sous le promoteur AgRP,
- La lignée *Tg(Pomc1-cre)16Lowl/J* ou *POMC-Cre*, exprimant la Cre recombinase sous le promoteur POMC.

Nous avons maintenu ces deux lignées à l'état hémizygote pour éviter de perturber le fonctionnement des neurones, de conserver un allèle *Agrp* et un allèle *Pomc* intact et d'éviter la cytotoxicité de la Cre recombinase. De plus, la conservation d'une seule réplique du transgène suffit pour une expression suffisante de la Cre recombinase dans ces neurones.

Afin de visualiser les neurones du système à mélanocortine, nous avons croisé ces lignées avec une autre lignée transgénique : *B6.Cg-Gt(ROSA)26Sortm14(CAG-*

tdTomato)Hze/J, aussi appelée lignée ROSA²⁶-tdTomato. Cette lignée de fond génétique C57BL/6J comporte un transgène codant pour une protéine fluorescente : la Tomato. La séquence codante pour la Tomato comprend une cassette STOP encadrée par deux sites lox-P. En présence de la Cre recombinase, la cassette STOP est excisée ce qui permet l'expression de la Tomato. Cette lignée peut être conservée à l'état homozygote car elle n'exprime la Tomato qu'en présence d'une Cre recombinase.

Nous avons donc pu générer deux lignées doubles transgéniques :

- La lignée AgRP-ires-Cre x ROSA²⁶-tdTomato (AgRP-Tomato), exprimant la Tomato fluorescente dans les neurones AgRP, de génotype cre/+, to/to,
- La lignée POMC-Cre x ROSA²⁶-tdTomato (POMC-Tomato), exprimant la protéine fluorescente Tomato dans les neurones POMC, de génotype cre/+, to/to.

Ces lignées rendent possibles la visualisation des neurones POMC en électrophysiologie ex vivo, ainsi que dans les tissus fixés par des techniques d'histologie. Le peptide précurseur POMC étant exprimé dans d'autres neurones que les neurones sensibles aux signaux métaboliques et pouvant également être de façon transitoire précurseurs des neurones NPY, ayant une action opposée aux neurones POMC sur le comportement alimentaire, notre modèle nécessite une vérification de la nature des neurones exprimant la Tomato dans notre lignée POMC-cre/Tomato. Nous avons effectué un co-marquage en fluorescence dirigé contre le peptide POMC endogène et contre la protéine Tomato (Figure 5). Après comptage, il s'avère que 90% des neurones POMC expriment la Tomato (Fig. 5 A). Cela suggère que cet outil génétique assure un bon recouvrement des neurones POMC. De plus, 50% des neurones Tomato co-expriment le peptide POMC chez la souris mâle adulte ce qui suggère que des cellules Tomato peuvent être des POMC mais leur immunodétection n'a pas été possible (fuite du peptide) ou que certaines cellules Tomato peuvent ne pas être des neurones POMC (fuite de la Cre recombinase). Nous avons ensuite réalisé un contre-marquage dirigé contre le peptide endogène AgRP (Fig. 5 B). Nous remarquerons un marquage ponctiforme du peptide AgRP sans identification de corps cellulaires. Cela est dû à l'exportation rapide de ce peptide hors du soma. De plus le marquage apparaît en périphérie des somas Tomato, avec dans certains cas un co-marquage. Cela suggère que notre immunomarquage pourrait détecter les synapses AgRP apposées sur POMC et que notre observation en microscopie en épifluorescence n'a pas la résolution nécessaire pour discriminer la fluorescence du

marquage contre AgRP et celle de la Tomato native. Nous en avons conclu que ce modèle transgénique était satisfaisant mais présentait des limites. Pour pallier à ces limites, j'ai choisi d'exploiter en histologie uniquement les neurones les plus éloignés du 3^{ème} ventricule au sein du noyau arqué pour éviter un croisement avec des neurones NPY générés via un précurseur POMC.

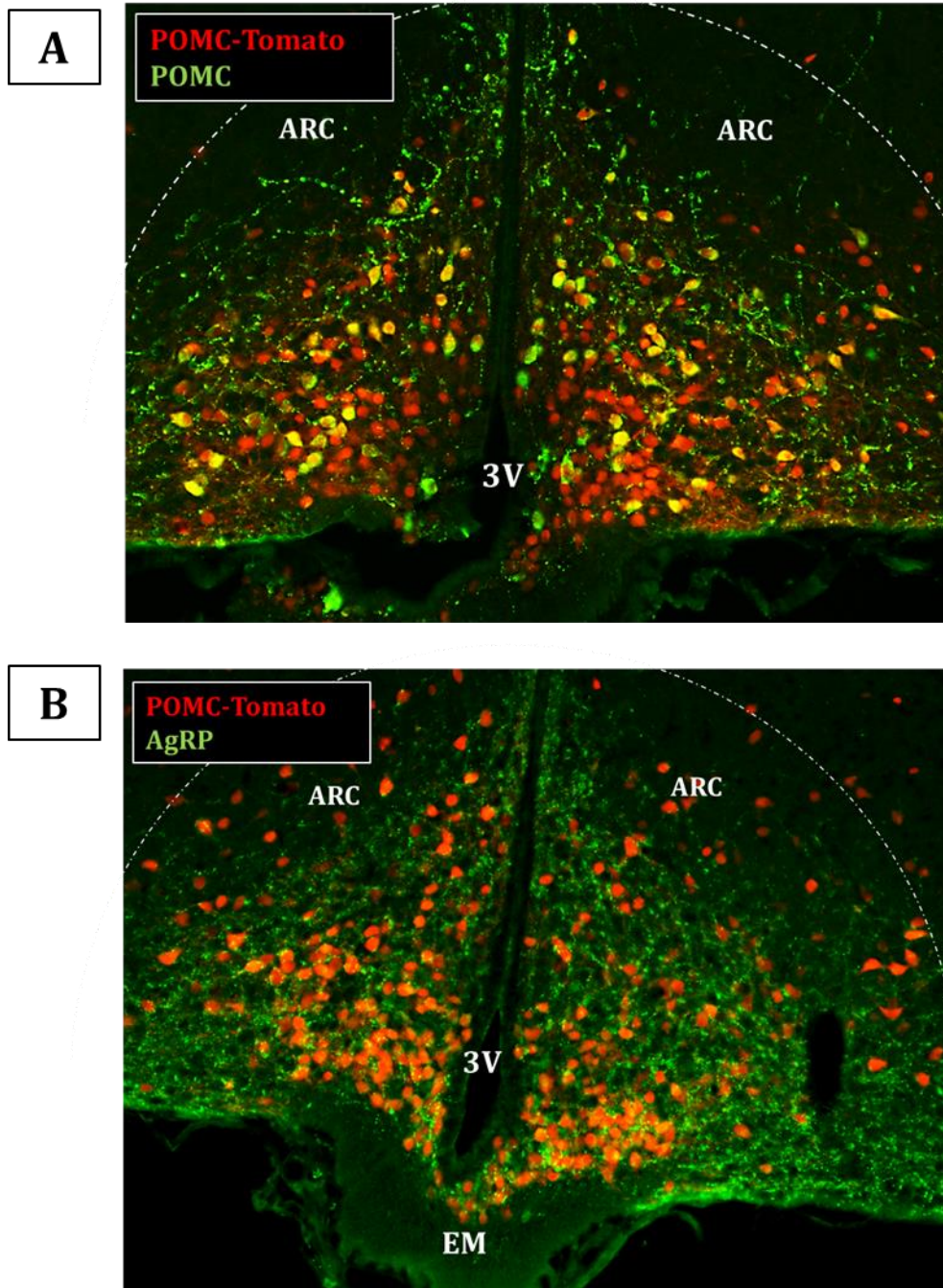


Figure 6 : Microphotographies du noyau arqué de la lignée POMC-Tomato. A : Immunomarquage dirigé contre la protéine Tomato (en rouge) et le peptide POMC (en vert). **B :** Immunomarquage dirigé contre la protéine Tomato (en rouge) et le peptide AgRP (en vert). ARC : noyau arqué, 3V : 3^{ème} ventricule, EM : éminence médiane.

2. Mettre en œuvre des approches fonctionnelles et anatomiques ciblées sur les neurones POMC et les neurones AgRP

Dans la littérature, les techniques d'exploration de la plasticité synaptique peuvent être de deux types :

- d'ordre fonctionnel en enregistrant *ex vivo* l'activité électrique résultant des connexions synaptiques
- d'ordre structural en examinant les interactions cellulaires telles que les interactions synapse-neurone ou astrocyte-neurone.

Les deux types d'exploration *ex vivo* et *in vivo* sont complémentaires, apportant des informations spécifiques, et permettent également de vérifier si les résultats obtenus d'un point de vue fonctionnel sont en concordance avec les données obtenues d'un point neuro-anatomique et structural. Dans tous les cas, le croisement de ces données permet de générer un modèle précis sur la physiologie d'un neurone.

1) Exploration fonctionnelle des phénomènes de plasticité synaptique

Le type d'exploration fonctionnelle la plus adaptée pour répondre à notre problématique est une technique d'enregistrement en électrophysiologie de l'activité électrique d'une cellule unique par patch-clamp. Cette technique nécessite de repérer les neurones d'intérêt, ici par l'utilisation des lignées AgRP-Tomato et POMC-Tomato décrites ci-dessus, dans une tranche fraîchement disséquée de cerveau. Les données recueillies par cette technique permettent d'apprécier les influences présynaptiques exercées sur le neurone d'intérêt. Cependant cette approche reste indirecte, car on ne visualise pas ni ne dénombre les contacts synaptiques.

2) Exploration structurale des phénomènes de plasticité synaptique

L'observation microscopique des interactions cellulaires reste l'approche la plus directe. Mais, l'exploration de la plasticité synaptique au niveau neuro-anatomique nécessite une technique permettant une bonne conservation des tissus cérébraux associée à une détection des cellules et des structures d'intérêt comme les synapses et les contacts astrocyte-neurone, ce qui peut s'avérer contradictoire d'un point de vue technique. Deux techniques d'histologie sont particulièrement adaptées pour visualiser la plasticité :

d) Analyse neuro-anatomique en microscopie électronique à transmission

Cette technique consiste à explorer la morphologie des structures synaptiques et des structures astrocytaires à l'échelle ultrastructurale autour des neurones d'intérêt immunodéTECTÉS grâce à des protéines d'intérêt. Elle nécessite une immunodétection d'une protéine rapporteur dans les neurones d'intérêt (ici la Tomato exprimée dans les neurones AgRP et les neurones POMC) associée à une bonne conservation des structures membranaires. Elle apporte des informations pertinentes sur les phénomènes d'interactions cellulaires grâce à l'échelle ultrastructurale. Selon des critères morphologiques établis, on peut reconnaître et quantifier les contacts synapse-neurone et astrocyte-neurone de façon directe, dans un plan, sans traitement des images. J'ai mis au point et installé au laboratoire une technique de détection en microscopie électronique à transmission durant ma première année de thèse permettant d'apprécier les éventuels phénomènes de plasticité. Cette mise au point technique fait l'objet d'une partie complète dans la section «Etude 2».

e) Analyse neuro-anatomique en microscopie à fluorescence confocale

L'avantage de cette technique par rapport à la microscopie électronique à transmission est qu'elle rend possible les immunodéteCTIONS multiples contre plusieurs antigènes dans le même échantillon de tissu cérébral. Elle permet d'effectuer un criblage sur une plus grande quantité de neurones et de distinguer les structures synaptiques excitatrices des structures synaptiques inhibitrices. Cette distinction entre les différents types de synapses permet d'apporter une information qualitative supplémentaire sur la configuration synaptique autour des neurones POMC et des neurones AgRP.

3. Modéliser l'état prandial chez la souris

Malgré la puissance de l'outil génétique apporté par le modèle murin, la souris reste un modèle difficile à caractériser au niveau de son comportement alimentaire. Ce modèle présente des variations inter et intra individuelles de comportement alimentaire trop importantes qui rendent difficile voire impossible l'évaluation de la durée d'un repas. Pour ce projet, nous avons donc dû modéliser les états prandiaux chez la souris de façon à mimer un état pré-prandial et post-prandial physiologique. Nous avons décidé de nous concentrer sur la première heure de la période nocturne pendant laquelle la souris va consommer près d'un dixième de sa ration quotidienne (environ 0,4g). Afin de synchroniser les animaux, nous avons généré le paradigme expérimental suivant : durant les deux dernières heures de la période diurne, les souris sont en restriction alimentaire ce qui provoque une sensation de « faim » suffisante, puis lors de l'extinction des lumières au début de la période nocturne, la nourriture est remise à disposition *ad libitum*. Nous avons observé que l'entraînement à cette restriction de 2 heures pendant 3 jours permettait de synchroniser convenablement la prise alimentaire de nos animaux. En effet, dès la remise à disposition de la nourriture, toutes les souris se dirigent vers la mangeoire pour commencer à s'alimenter. De cette façon nous avons pu définir un état pré-prandial, basé sur les 2 heures de restriction alimentaire avant la période nocturne et un état post-prandial, basé sur 2 heures de restriction alimentaire avant la période nocturne et une réalimentation pendant la première heure de la nuit. Nous disposons au laboratoire de deux régimes alimentaires distincts pour nos animaux : un régime standard équilibré (SAFE, réf : A04) et un régime riche en lipides, hypercalorique (SAFE, réf : U8954P version 0007). La composition des deux régimes expérimentaux est présentée dans le tableau 1 (page 57). Nous avons donc étudié trois états métaboliques distincts : l'état pré-prandial (PRE), l'état post-prandial standard (1h-SD) et l'état post-prandial « high fat diet » (1h-HFD) (Figure 6).

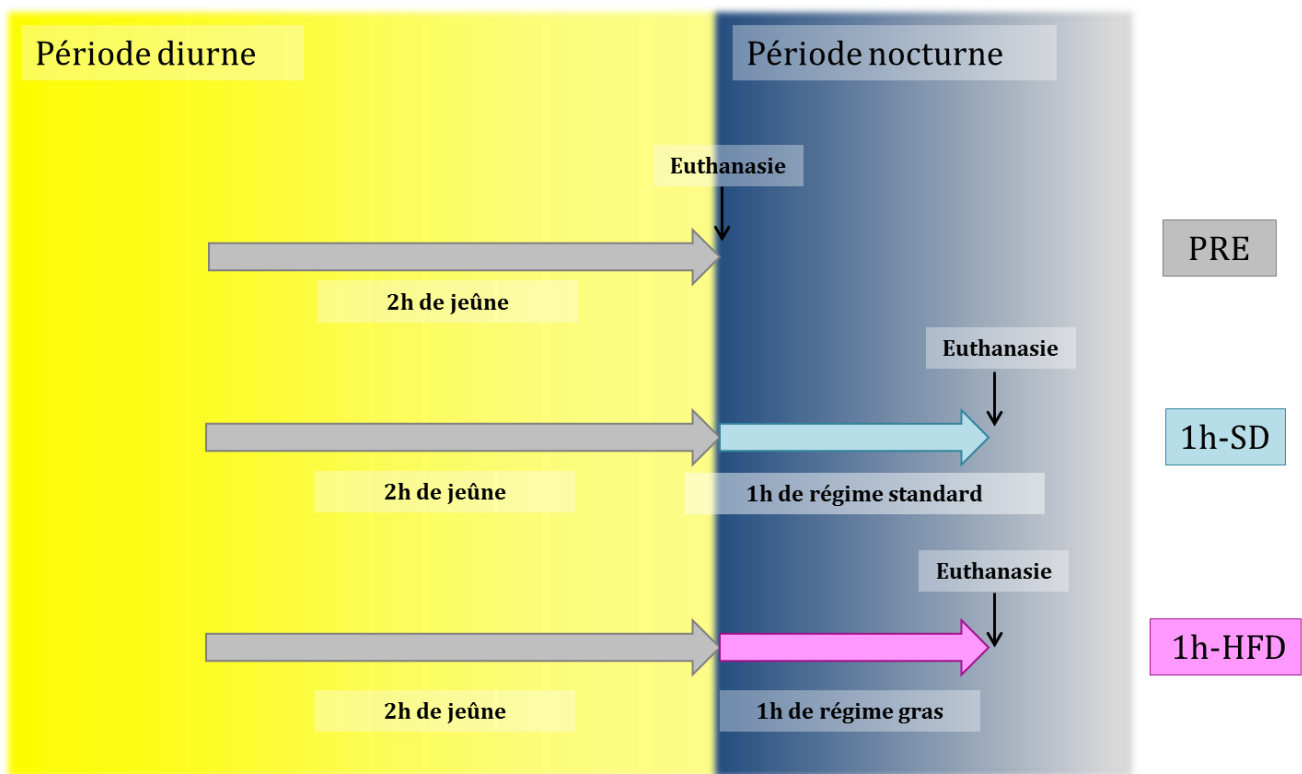


Figure 7 : Schématisation du paradigme expérimental permettant de modéliser l'état prandial. PRE : situation « pré-prandiale », après deux heures de jeûne ; 1h-SD : situation « postprandiale standard », deux heures de jeûne suivies d'une remise à disposition *ad libitum* d'un régime standard pendant 1h ; 1h-HFD ; situation « postprandiale high fat diet », deux heures de jeûne suivies d'une remise à disposition *ad libitum* d'un régime gras.

COMPOSITION NUTRITIVE (%)		
NUTRIMENTS	SD	HFD
Protéines	16.1%	18.1%
Lipides	3.1%	21.3%
Carbohydrates	60.4%	45.4%
Cellulose	3.9%	2.2%
Minéraux	4.6%	5.1%
Humidité	11.9%	7.9%
COMPOSITION ENERGETIQUE (%)		
NUTRIMENTS	SD	HFD
Protéines	19.3%	16.3%
Lipides	8.4%	42.9%
Carbohydrates	72.4%	40.8%
Valeur énergétique	3.3Kcal /g	4.5Kcal/g
COMPOSITION EN ACIDES GRAS (mg/kg d'aliment)		
ACIDES GRAS	SD	HFD
C16 :0	5900	39628
C18 :0	600	17490
C18 :1	4800	48398
ALA	1200	2384
LA	15000	17903

Tableau 1 : Composition nutritive, énergétique et en acides gras des deux régimes expérimentaux utilisés. **C16 :0** acide palmitique (saturé); **C18 :0** acide stéarique (saturé); **C18 :1** acide oléique (mono-insaturé); **ALA** acide α linoléique (oméga 3); **LA** acide linoléique (oméga 6).

ETUDE 1 : MODELISATION DE L'ETAT PRANDIAL CHEZ LA SOURIS

1. Objectifs

Il convenait initialement de caractériser le modèle expérimental utilisé dans cette étude. Nous avons choisi de travailler sur 3 états métaboliques distincts, mimant les changements d'état prandial. Ces 3 situations ont été sélectionnées arbitrairement puisqu'à ce jour, le « repas typique » en termes de durée et de quantité ingérée n'a toujours pas été déterminé chez la souris et ne peut sans doute pas l'être. Le but de cette première étude était donc de vérifier la pertinence du modèle par une caractérisation de paramètres métaboliques externes (poids corporel, prise alimentaire et prise énergétique) et internes (bilan hormonal). En particulier, il a fallu évaluer les niveaux d'hormones circulantes en condition pré-prandiale versus post-prandiale. Pour cela, nous avons dosé dans nos trois conditions expérimentales trois hormones majeures contrôlant le métabolisme énergétique: la leptine, la ghréline et l'insuline et dont les variations peuvent réorganiser les circuits cérébraux.

Notre modèle a été comparé à la situation de jeûne pendant 24h (24h-fast), situation particulièrement impactante chez la souris d'un point de vue métabolique, mais qui fait référence pour les études reliant état métabolique et plasticité cérébrale.

2. Matériel et méthodes

Afin de procéder à ces dosages, nous avons travaillé sur la lignée C57Bl6j, fond génétique commun aux deux lignées transgéniques utilisées dans cette étude, ainsi que sur la lignée transgénique POMC-Tomato.

1) Animaux

Les protocoles expérimentaux utilisant les animaux ont été revus et validés par le comité d'éthique local et sont en accord avec les directives européennes concernant

l'expérimentation animale (directive 86/906). Les protocoles ont tous été soumis à un examen par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche et ont reçu le numéro d'agrément C21231008EA.

Les œstrogènes ayant des effets sur la plasticité synaptique du système à mélanocortine, nous avons choisi de travailler uniquement sur les mâles. Les souris sont acclimatées dès le sevrage à un rythme jour/nuit décalé (10h30 OFF, 22h30 ON) permettant les expérimentations en journée. Cette acclimatation dès le sevrage, qui précède de 4 semaines la période d'expérimentation, permet de s'affranchir de remodelages cérébraux induits par le décalage horaire et permet de maintenir les animaux dans un état physiologique bien stabilisé. Trois jours avant le début de l'expérience, les animaux, âgés de 7 à 8 semaines, sont mis à jeun tous les jours durant les deux dernières heures de la période diurne (de 8h30 à 10h30). Cet entraînement permet de s'affranchir d'un effet stress qui pourrait être provoqué par la privation de nourriture ou par l'intervention de l'expérimentateur tout simplement. Cet entraînement permet également de synchroniser le début de la prise alimentaire des souris. Afin de rendre possible la mesure individuelle du poids corporel et de la consommation de l'aliment, les souris sont individualisées en cage standard pendant une période ne dépassant jamais une semaine, de façon à pallier à un effet de dépression pouvant être causé par l'isolement et pouvant avoir des répercussions sur le métabolisme et le comportement alimentaire. La mesure du poids corporel est effectuée au cours de la mise à jeun, pour ne pas impacter le comportement alimentaire. La prise alimentaire est systématiquement prise pour chaque animal testé avant tout prélèvement. Enfin, les animaux sont tous habitués au nouvel aliment gras 24h avant l'expérience par la présentation d'une croquette grasse pendant 10 minutes afin d'éviter la néophobie vis-à-vis du nouvel aliment du groupe 1h-HFD. Les animaux mangeant en dessous de 0,15g sont écartés de l'étude de manière arbitraire.

2) Prélèvements sanguins

Les dosages d'insuline et de glucose sanguin ont été effectués sur des échantillons sanguins et plasmatiques prélevés à la veine de la queue sur souris vigiles afin de pallier à un effet hyperglycémiant de l'anesthésique. La prise de glycémie a été effectuée à l'aide d'un glucomètre (Accu-Chek, Accuthek). Les autres dosages ont été effectués sur des

échantillons plasmatiques provenant du sang total prélevé par voie intracardiaque sous anesthésie à la kétamine- xylasine (80mg/kg-12mg/kg).

3) Dosage des hormones plasmatiques

Tous les dosages hormonaux ont été effectués grâce à des kits de dosage. Chaque dosage a été effectué en suivant les instructions du fournisseur. Les différentes préparations de plasma en concordance avec ces kits sont décrites dans le tableau ci-dessous (Tableau 2).

Hormone	Préparation des échantillons	Kit et référence
Ghréline acylée	Après prélèvement du sang, 15µl d'EDTA et 6µl de PHMB à 40mM sont ajoutés pour 600µl de sang. Les aliquots sont centrifugés à 3500 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le plasma est ensuite prélevé (surnageant) et est acidifié avec du HCl 1N pour une concentration finale de 0.1N soit 100µl d'HCl 1N pour 1ml de plasma. Les aliquots sont vortexés, centrifugés et conservés à -80°C jusqu'au dosage.	Acylated Ghrelin (mouse, rat) Express EIA kit (Bertin Pharma; Ref: A05117)
Leptine	Le sang est collecté en utilisant l'EDTA comme anticoagulant. Le plasma est récupéré après 10 minutes de centrifugation à 3500 rpm à 4°C. Le surnageant correspondant au plasma est récupéré, aliquoté et congelé à -80°C jusqu'au dosage.	Quantikine ELISA Mouse/Rat Leptin Immunoassay (R&D Systems; Ref : MOB00)
Insuline	Le sang est prélevé sur souris vigile à la veine de la queue et collecté dans des microvettes CB300 (Braintree Scientific, INC.). Le sang est ensuite centrifugé pendant 10 min à 3500 rpm à 4°C. Le plasma est récupéré, aliquoté et conservé à -80°C jusqu'au dosage.	AlphaLISA Insulin Kit (Perkin Elmer; Ref : AL204C)

Tableau 2 : Préparation du plasma et références des kits de dosages d'hormones.

4) Analyses statistiques

Toutes les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism GraphPad. Les données exprimées dans le texte sont les moyennes \pm s.e.m. et les barres d'erreur représentent également les s.e.m.. Les tests utilisés ont été déterminés selon la distribution des données. Les 3 groupes ont été testés par une ANOVA puis, les tests post-hoc adaptés étaient réalisés. Lors d'une distribution non normale, les groupes indépendants ont été comparés deux à deux avec des tests non paramétriques. Des tests appariés ont également été utilisés dans les études de pharmacogénétique (étude 5).

3. Résultats

1) Paramètres métaboliques généraux

La caractérisation métabolique ne montre aucune différence de poids corporel entre les groupes PRE, 1h-SD et 1h-HFD (Figure 7A). En revanche la condition 24h-Fast présente une perte de poids corporel très significative par rapport aux groupes PRE, 1h-SD et 1h-HFD (24h-fast : 19.95 ± 0.26 g *versus* PRE : 24.82 ± 0.74 g ; 1h-SD : 25.69 ± 0.34 g ; 1h-HFD : 25.42 ± 0.82 g, N=9souris par groupe, *** : $p=0.0009$).

La prise alimentaire ne diffère pas entre les deux groupes post-prandiaux 1h-SD et 1h-HFD (1h-SD : 0.39 ± 0.04 g *versus* 1h-HFD : 0.41 ± 0.08 g, N=9 souris par groupe) (Figure 7B). La prise énergétique est légèrement augmentée avec le régime gras, ce qui est lié à la densité énergétique supérieure de cet aliment (1h-SD : 1.28 ± 0.13 kCal *versus* 1h-HFD : 1.82 ± 0.34 kCal, N=9 souris par groupe, $p=0.4254$) (Figure 7C).

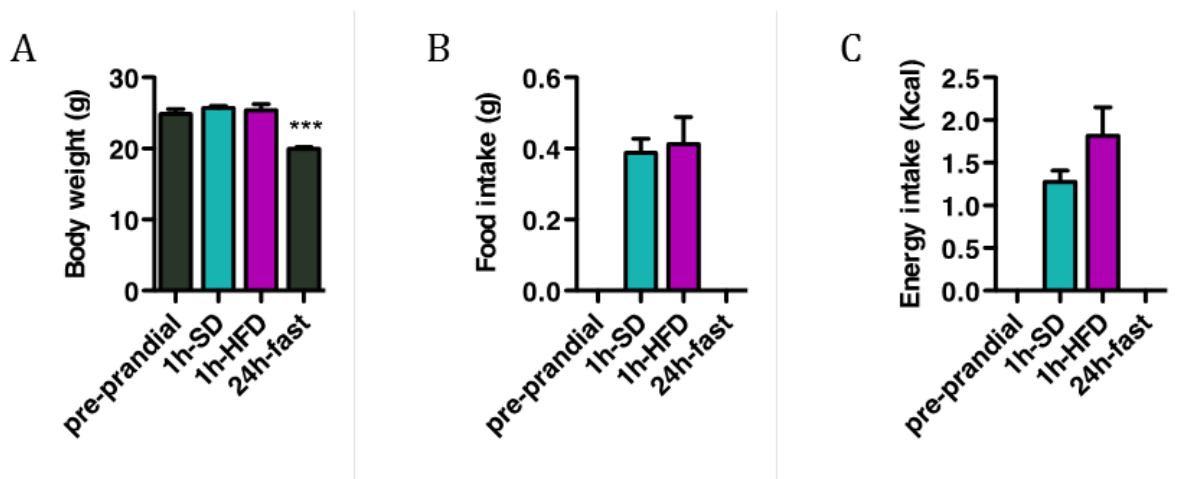


Figure 8 : Caractérisation métabolique générale de notre modèle expérimental. **A** : Poids corporel en grammes des animaux en conditions PRE, 1h-SD, 1h-HFD et 24h-fast. **B** : Prise alimentaire en grammes sur la première heure de la période nocturne. **C** : Prise énergétique en kilocalories sur la première heure nocturne. N= 9 animaux par groupe, *** : p=0.0009.

2) Dosages hormonaux

Les concentrations plasmatiques en hormones circulantes leptine, ghréline et insuline ne présentent aucune différence entre les groupes PRE, 1h-SD et 1h-HFD (Figure 8). En revanche, on observe dans le groupe 24h-fast :

- une diminution significative de la concentration en leptine (24h-fast : 0.4238 ± 0.2634 ng/ml *versus* PRE : 3.451 ± 0.611 ng/ml ; 1h-SD : 2.159 ± 0.701 ng/ml ; 1h-HFD : 3.153 ± 1.650 ng/ml, N=9 souris par groupe, ** : p=0.0012) (Figure 8B),
- une augmentation significative de la concentration en ghréline acylée (24h-fast : 135.4 ± 16.59 pg/ml *versus* PRE : 57.11 ± 4.78 pg/ml, 1h-SD : 60.33 ± 5.528 pg/ml, 1h-HFD : 87.00 ± 12.32 pg/ml, N=9 souris par groupe, ** : p=0.002) (Figure 8C),
- et une diminution significative de la concentration en insuline (24h-fast : 2.125 ± 0.474 μ U/ml *versus* PRE : 11.87 ± 1.153 μ U/ml, 1h-SD : 14.78 ± 2.724 μ U/ml, 1h-HFD : 9.278 ± 3.179 μ U/ml, N=9 souris par groupe, *** : p=0.0006) (Figure 8A).

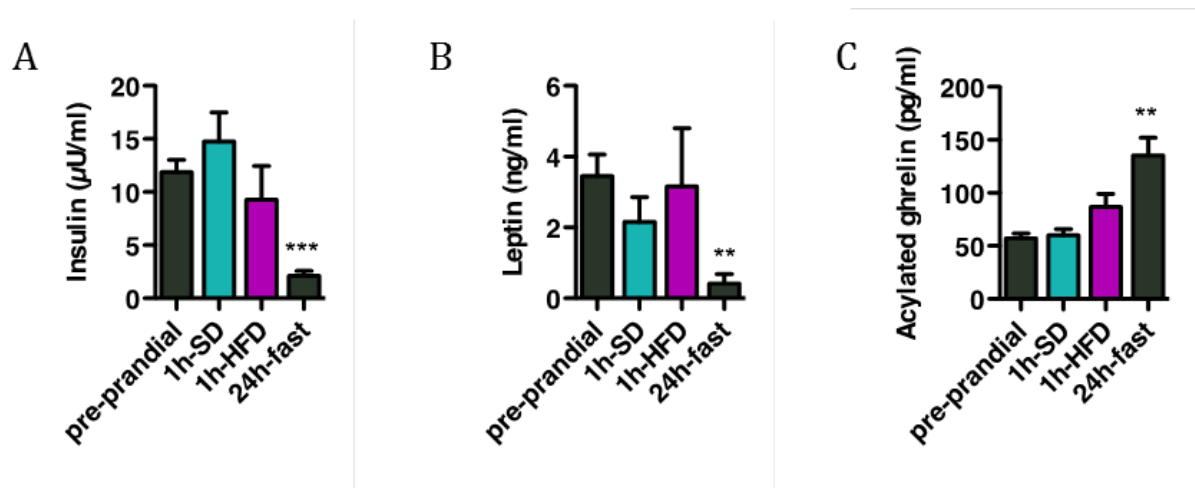


Figure 9 : Taux d'hormones circulantes de notre modèle expérimental. **A** : Niveau d'insuline circulante en $\mu\text{U}/\text{ml}$. **B** : Niveau de leptine circulante en ng/ml . **C** : Niveau de ghréline acylée circulante en pg/ml . N= 9 animaux par groupe, ** : $p < 0.005$; *** : $p = 0.0006$.

4. Interprétation

La caractérisation des conditions expérimentales montre que :

- 1) Le modèle ne présente pas de changement du statut métabolique en ce qui concerne le poids corporel, quel que soit le régime appliqué
- 2) La prise alimentaire pendant une heure correspond à 1/10^{ème} de la consommation sur 24h, ce qui est appréciable d'un point de vue nutritionnel.
- 3) Il n'y a pas de néophobie ou de rejet de l'aliment gras, ce qui permet de comparer les deux situations post-prandiales.
- 4) Les manipulations de restriction alimentaire pendant 2h et d'accès à la nourriture pendant une heure ne changent pas le statut hormonal des animaux en ce qui concerne les 3 principales hormones du métabolisme pouvant agir sur la plasticité du système à mélanocortine, quel que soit le régime utilisé.

ETUDE 2 : ACTIVITE ET CONNECTIVITE DES NEURONES DU SYSTEME A MELANOCORTINE DU NOYAU ARQUE EN FONCTION DE L'ETAT PRANDIAL

1. Objectifs

On sait depuis une quinzaine d'années que des remaniements synaptiques peuvent se produire au sein du système à mélanocortine, en réponse à des fluctuations hormonales intenses (Pinto et al, 2004 ; Gao et al, 2007 ; Gyengesi et al, 2010 ; Vong et al, 2011 ; Yang et al, 2011 ; Liu et al, 2012). Comme nous l'avons indiqué, l'existence d'un tel phénomène dans ce système neuronal n'a jamais été montrée lors de fluctuations hormonales modérées, physiologiques, comme celles rencontrées quotidiennement, par exemple avant ou après un repas.

L'objectif ici était donc de vérifier si des phénomènes de plasticité synaptique pouvaient avoir lieu, en fonction de l'état prandial. L'exploration de ces phénomènes a été réalisée à l'échelle fonctionnelle (*ex vivo*) et à l'échelle neuro-anatomique (*in situ*).

2. Matériel et méthodes

1) Animaux

L'étude de la plasticité cérébrale dans notre paradigme expérimental nécessite un rythme jour/nuit particulier. Les animaux sont placés dès le sevrage dans une pièce d'hébergement ayant un rythme particulier (10h30 OFF ; 22h30 ON), compatible avec les expérimentations. Pour identifier les neurones d'intérêt, nous avons utilisés deux lignées doubles transgéniques : la lignée AgRP-ires-Tomato et et la lignée POMC-Tomato qui permet l'expression de la protéine fluorescente Tomato dans les neurones AgRP d'une part et les neurones POMC d'autre part.

Pour rappel, les souris en condition PRE sont mises à jeun deux heures avant la période nocturne, les souris en condition 1h-SD sont mise à jeun deux heures avant la période nocturne et re-nourries sur la première heure de la période nocturne, les souris en

conditions 1h-HFD sont mises à jeun deux heures avant la période nocturne et re-nourries avec un régime HFD pendant la première heure de la période nocturne.

2) Electrophysiologie

a) Animaux

Les expériences sont réalisées sur des souris transgéniques (AgRp-cre-Tomato ou POMC-cre-Tomato) mâles âgées de 7 à 10 semaines. Les souris sont élevées à l'animalerie, à température constante (22 °C) et sous une photopériode de 12 h (lumière de 22h30 à 10h30). Les animaux sont nourris *ad libitum* avec un régime standard de laboratoire (A04, SAFE).

b) Préparation des tranches de cerveau

Les animaux sont anesthésiés par une injection ip de pentobarbital (5mg/kg de poids corporel). Immédiatement après l'anesthésie, la souris subit une laparotomie : le diaphragme est sectionné et le cœur mis à nu. Après section de l'oreillette droite (afin de permettre l'écoulement du sang puis de la solution de perfusion), une aiguille est introduite dans le ventricule gauche. Cette aiguille est reliée à une seringue de 20 ml remplie d'une solution dite « de coupe » froide et oxygénée (95 % O₂ / 5 % CO₂) contenant (en mM) : 28 NaHCO₃ ; 2,5 KCl ; 10 MgCl₂ ; 1,25 NaH₂PO₄ ; 0,5 CaCl₂ ; 20 Hepes, 5 Ascorbate ; 8 D-glucose ; 3 Na-pyruvate ; 2 Thiourea ; 93 NMDG ; 93 HCl 10N ; 23 saccharose (pH= 7,3-7.4), osmolarité ajustée à 300-310 mOsmol/l avec du saccharose.

L'encéphale est récupéré et immergé le plus rapidement possible dans la solution de coupe oxygénée (5% CO₂ et 95% O₂) et thermostatée à 4 °C (Temperature Controller, Peltier Tissue Baths, WKL 230, Lauda). Des coupes frontales de 250 µm sont alors réalisées à l'aide d'un vibratome (Vibroslice, leica VT1000S). Les coupes ainsi obtenues sont plongées dans une solution maintenue entre 32 et 34°C et oxygénée (95 % O₂ / 5 % CO₂) identique à la solution précédemment décrite pendant une période inférieure à 15 minutes. Ces coupes sont ensuite conservées à température ambiante, jusqu'à enregistrement, dans un récipient en plexiglas contenant 50 ml environ d'une solution saline physiologique oxygénée (« holding solution», contenant (en mM) : 28 NaHCO₃ ; 2,5 KCl, 10 MgCl₂ ; 1,25 NaH₂PO₄ ; 0,5 CaCl₂ ; 20 Hepes ; 5 Ascorbate ; 2.5 D-glucose ; 1 Na-pyruvate ; 2 Thiourea ; 92 NaCl ; 20 saccharose (pH= 7,3-7.4), osmolarité ajustée à 300-310 mOsmol/l avec du saccharose.

Après une période de récupération d'1 heure minimum, les coupes sont placées dans une chambre en plexiglas (Warner instruments) disposée sous un microscope droit (Olympus, France) et immobilisée par une grille de nylon (Warner instruments). La chambre est perfusée à un débit de 3 ml par minute avec le milieu extracellulaire oxygéné : 118 NaCl ; 3 KCl ; 1,2 NaH₂PO₄ ; 1 MgCl₂ ; 25 NaHCO₃ ; 1,5 CaCl₂ ; 5 Hépès ; 2,5 glucose ; pH = 7,3-7,4 ; osmolarité ajustée à 300-310 mOsmol/l avec du sucre. Le noyau arqué est identifié en accord avec l'atlas stéréotaxique de cerveau de souris [Paxinos G, 1997]. Les neurones du NA sont visualisés en utilisant un objectif à immersion x 60 (Olympus) placé sous une caméra infrarouge (Scientifica). Les neurones du noyau arqué fluorescents sont alors repérés à l'aide d'une lampe à fluorescence et d'un filtre mCherry adapté à l'excitation de la protéine Tomato.

Les pipettes mises artificiellement sous pression sont alors descendues lentement dans la tranche à l'aide d'un micromanipulateur (MP 225, sutter instrument).

c) Enregistrements électrophysiologiques

Les électrodes d'enregistrement sont étirées à partir de capillaires de borosilicate (O.D. : 1,5mm, I.D. : 0,86 mm, longueur 10 cm ; Sutter Instrument) grâce à une étireuse (Sutter Instrument, Model P-1000). Seules les électrodes de résistance comprise entre 5 à 7 MΩ sont utilisées. Ces électrodes sont remplies de différentes solutions en fonction des paramètres électrophysiologiques que l'on veut mesurer.

En configuration cellule-attachée, la solution remplissant l'électrode est identique à la solution qui perfuse en permanence la tranche, cette configuration permet d'enregistrer la fréquence de décharge des neurones ou *firing rate*, c'est-à-dire leur activité électrique basale.

En configuration whole-cell, voltage imposé -65mV :

Pour l'enregistrement des EPSCs, une solution saline filtrée (filtre stériles pores 0,2μm) remplissant l'électrode d'enregistrement et contenant en mM : 138 K-gluconate, 4 Na-gluconate, 4 MgCl₂, 10 HEPES, 5 EGTA, 2 Na₂-ATP, 0,4 Na₂-GTP, 4 KOH permet d'étudier les EPSCs ($E_{K^+} = -100.7$ mV, $E_{Cl^-} = -72.0$ mV, osmolarité 290 mOsm, pH=7.2-7.3) en présence de picrotoxine (25μM), et de tétrodontoxine (TTX 500 nM).

Pour les IPSCs, nous utilisons une solution saline filtrée remplissant l'électrode d'enregistrement contenant en mM : 140 CsCl, 3,6 NaCl, 1 MgCl₂-6H₂O, 10 HEPES, 0,1

Na4-EGTA, 2 Na2-ATP, 0,4 Na2-GTP, 7 NaOH, permet de mesurer la fréquence des courants post synaptiques GABAergiques au niveau des neurones (selon l'équation de Nernst, $E_{K^+} = -\infty$, $E_{Cl^-} = 3.68$ mV, osmolarité 280 mOsM, pH=7.2-7.3), en présence de tétradotoxine (TTX 500 nM).

Les enregistrements sont réalisés grâce à un amplificateur EPC10 (Heka Elektronik), connecté à une interface (LIH 8+8, Heka Elektronik). Les données sont acquises grâce au logiciel Patchmaster (Heka Elektronik). Le filtre de l'amplificateur est ajusté à 2 kHz pour les enregistrements en configuration cellule entière en voltage-clamp.

Les mesures de fréquence en cellule attachée ou des courants miniatures excitateurs ou inhibiteurs en whole cell sont effectués à l'aide du logiciel Clampfit (10.3.0.2, Molecular Devices, Inc.)

Pour les enregistrements en cellule attachée, nous avons utilisé le paradigme suivant : 3 à 5 minutes de stabilisation après avoir « sealer » le neurone, puis 10 minutes d'enregistrement. La mesure de fréquence est calculée sur les 2 dernières minutes de l'enregistrement. Pour les enregistrements de courants excitateurs postsynaptiques, nous avons enregistré après stabilisation (3-5 min) 6 minutes en présence de picrotoxine (25 μ M), puis 10 minutes en présence de picrotoxine (25 μ M) et de TTX (500nM), les mesures étant réalisées sur 3 minutes, après au moins 5 minutes d'application de TTX. Pour les enregistrements de courants miniatures inhibiteurs postsynaptiques, nous avons enregistré après stabilisation (3-5 min) 10 minutes en présence de TTX (500nM).

3) Immunohistochimie associée à la Microscopie Electronique à Transmission

d) Mise au point technique

Afin d'explorer la plasticité astrocytaire et synaptique, nous avons utilisé une stratégie qui permet d'observer de façon directe et *in situ* les interactions synapse-neurone et astrocyte-neurone : la microscopie électronique à transmission (MET). Cette technique n'étant pas présente au laboratoire au début de ma thèse, j'ai consacré ma première année de thèse à mettre en place les conditions les plus optimales de détection des neurones AgRP et des neurones POMC en MET couplée à de l'immuno-détection. Cette technique présente l'avantage de déterminer à l'aide de critères morphologiques les contacts entre synapses et neurones, mais également entre astrocytes et neurones. Cette

technique a été utilisée dans le passé par deux autres laboratoires pour explorer les phénomènes de plasticité structurale au sein des réseaux neuronaux de la prise alimentaire (Pinto et al, 2004 ; Horvath et al, 2010 ; Kim et al, 2014 ; Cristino et al, 2013).

Modèles

Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser la souris C57Bl6j comme modèle expérimental. Nous avons donc opté pour un marquage de molécules endogènes (neuropeptides AgRP et POMC) qui peuvent permettre de détecter les neurones d'intérêt. Cependant, la détection de ces marqueurs neuronaux en MET est difficile (bruit de fond, difficulté de criblage des zones à analyser) car les neuropeptides ne s'accumulent pas suffisamment dans les somas. Nous avons donc décidé dans un deuxième temps d'opter pour des lignées transgéniques exprimant par un système Cre-lox une protéine exogène, la Tomato, respectivement dans les neurones POMC et les neurones AgRP, permettant une détection satisfaisante de ces neurones.

Méthode

Cette technique d'exploration des interactions cellulaires consiste à mettre en évidence les compartiments subcellulaires (synapses, prolongements astrocytaires et corps cellulaires des neurones) et leurs interactions (surface de contact, nombre de synapses reçues par un neurone). Afin d'estimer ces interactions, nous avons opté pour une procédure de marquage de ces neurones d'intérêt grâce à une technique de détection en immunocytochimie en pré-enrobage. Cette procédure permet une meilleure conservation de la structure des antigènes utilisés pour repérer les cellules mais peut avoir un effet délétère sur la conservation des membranes cellulaires, indispensable à la reconnaissance visuelle des structures synaptiques et astrocytaires. L'objectif de cette mise au point technique a été de déterminer les conditions assurant conjointement la détection immunologique des neurones, « agressive » pour les tissus mais nécessaire, et la conservation de la morphologie des structures, limitant la pénétration des outils immunologiques mais obligatoire pour quantifier les interactions cellulaires. Nous avons déterminé pour chaque étape clé de cette procédure une condition optimale permettant d'atteindre cet objectif.

Fixation du tissu

Le cerveau est un organe riche en lipides et volumineux. Afin de garantir une bonne conservation des antigènes et de la structure des membranes plasmiques, une fixation chimique est nécessaire. Traditionnellement, les fixations chimiques se font par un polymère de formaldéhyde, le paraformaldéhyde. Il garantit une bonne conservation antigénique mais a une action limitée sur la bonne conservation de la structure des membranes. Pour une meilleure conservation des membranes, l'ajout de glutaraldéhyde au paraformaldéhyde peut favoriser la conservation des structures membranaires.

Le tissu cérébral est fixé par perfusion intracardiaque, ce qui permet de diffuser les fixateurs jusqu'au cœur de l'organe via le système vasculaire. Nous avons déterminé une concentration de fixateur permettant une bonne morphologie des membranes et une bonne conservation de l'antigène, à savoir un mélange de paraformaldéhyde 4% et de glutaraldéhyde 0.5% dilué dans du tampon phosphate 1X.

Immunodétection

a) Perméabilisation

La perméabilisation permet aux anticorps de pénétrer le tissu en créant des ruptures dans les membranes plasmiques. Une perméabilisation trop faible limite l'immunodétection tandis qu'une perméabilisation trop forte dégrade la morphologie et empêche d'estimer correctement les interactions cellulaires. Il existe des détergents qui créent des dommages non réversibles dans les membranes comme le Triton X100 et d'autres détergents plus doux qui créent des dommages réversibles, comme la Saponine. Nous avons déterminé des conditions de perméabilisation douce à base d'un détergent réversible, la Saponine, à une concentration de 0.01%

b) Révélation

Les anticorps utilisés pour identifier les neurones d'intérêt sont:

- Anti POMC precursor polyclonal rabbit (Phoenix Pharm. H02930) pour révéler le peptide POMC
- Anti AgRP polyclonal rabbit (Phoenix Pharm. H00357) pour révéler le peptide AgRP

- Anti DsRed polyclonal rabbit (ClonTech 632496) pour révéler la protéine exogène Tomato (d'après Liu et al, 2012)

Les concentrations en anticorps primaires et secondaires ont toutes été testées en microscopie optique et en microscopie à fluorescence avant d'être utilisées pour la microscopie électronique. Nous avons déterminé les concentrations ayant le meilleur rapport marquage/bruit de fond dans nos conditions de détergent doux. Afin de repérer les neurones d'intérêt dans le tissu à la fois en microscopie optique pour le choix des blocs à étudier et en microscopie électronique pour repérer les clusters de neurones, nous avons révélé la Tomato par une coloration à la diaminobenzidine, qui forme un précipité brun observable en microscopie photonique et qui est également dense aux électrons lors de l'observation en microscopie électronique à transmission.

Inclusion en résine

a) Osmification

L'application d'osmium après marquage immunologique permet de créer des liaisons covalentes entre les lipides des membranes cellulaires. Cette étape équivaut à « post-fixer » les membranes cellulaires et permet de renforcer la conservation de la morphologie cellulaire. L'osmium permet également de faire un premier contraste membranaire dû à sa densité aux électrons. Après avoir testé différentes concentrations d'osmium incubé selon des durées variables et à des températures différentes, nous avons défini une concentration optimale de tetroxyde d'osmium à 0.5% appliqué pendant 2 heures à température ambiante.

b) Déshydratation

Afin d'améliorer la conservation des structures et limiter l'extraction des lipides au cours de l'enrobage en résine, nous avons mis au point un protocole de déshydratation rapide qui repose sur l'immersion des échantillons pendant 3 minutes dans des bains de concentrations croissantes d'éthanol. Des durées d'incubation plus longues altèrent l'histologie des préparations.

c) Résine

Le choix de la résine Durcupan ACM a été effectué en se basant sur les données bibliographiques concernant l'exploration de la plasticité du système à mélanocortine en

MET. Cette résine est bien adaptée à la conservation du tissu cérébral et présente une viscosité qui la rend facile d'utilisation.

Contraste aux métaux lourds

Après inclusion en résine, les blocs sont coupés en ultracoupes de 70nm d'épaisseur. Les coupes sont récupérées sur des grilles de cuivre. Un contraste aux métaux lourds est alors nécessaire afin de mettre en évidence convenablement les membranes lipidiques, et donc les structures cellulaires et sub-cellulaires. Nous avons déterminé quel contraste était le plus adapté pour mettre en valeur les synapses et les astrocytes. Pour cela, nous avons fait varier le temps d'incubation (entre 5 et 15 minutes) et le type de contrastant utilisé. Il s'est avéré que l'uranyl-less, un substitut de l'acétate d'uranyl, appliqué sur les coupes pendant 12 min a permis un contraste maximal et résolutif des structures lipidiques. Ce premier contraste est suivi d'un second contraste au citrate de plomb appliqué en condition air-less pendant deux minutes renforçant les structures et facilitant l'observation.

Résultats

La mise en œuvre de l'ensemble de ces procédures a permis une détection des neurones AgRP et des neurones POMC exprimant la Tomato dans l'hypothalamus de souris. Ainsi, le marquage à la diaminobenzidine dirigé contre la Tomato permet de repérer les neurones dans les blocs de résine dans la région du noyau arqué, avant la réalisation des ultracoupes. Puis, en MET, les neurones sont repérables à faible grossissement (x4000) grâce aux précipités de DAB très denses aux électrons contenus dans le cytoplasme des neurones Tomato positifs (Figure 9). Les neurones marqués apparaissent alors en gris foncé sous le faisceau d'électrons contrairement aux autres neurones qui sont gris clair et ne contiennent pas de précipité de DAB. La bonne conservation des structures membranaires et la limitation de l'extraction lipidique obtenues grâce à la mise au point raffinée de tous les points critiques du protocole technique permettent finalement une reconnaissance visuelle des structures apposées sur la membrane plasmique des neurones marqués, sans détérioration.

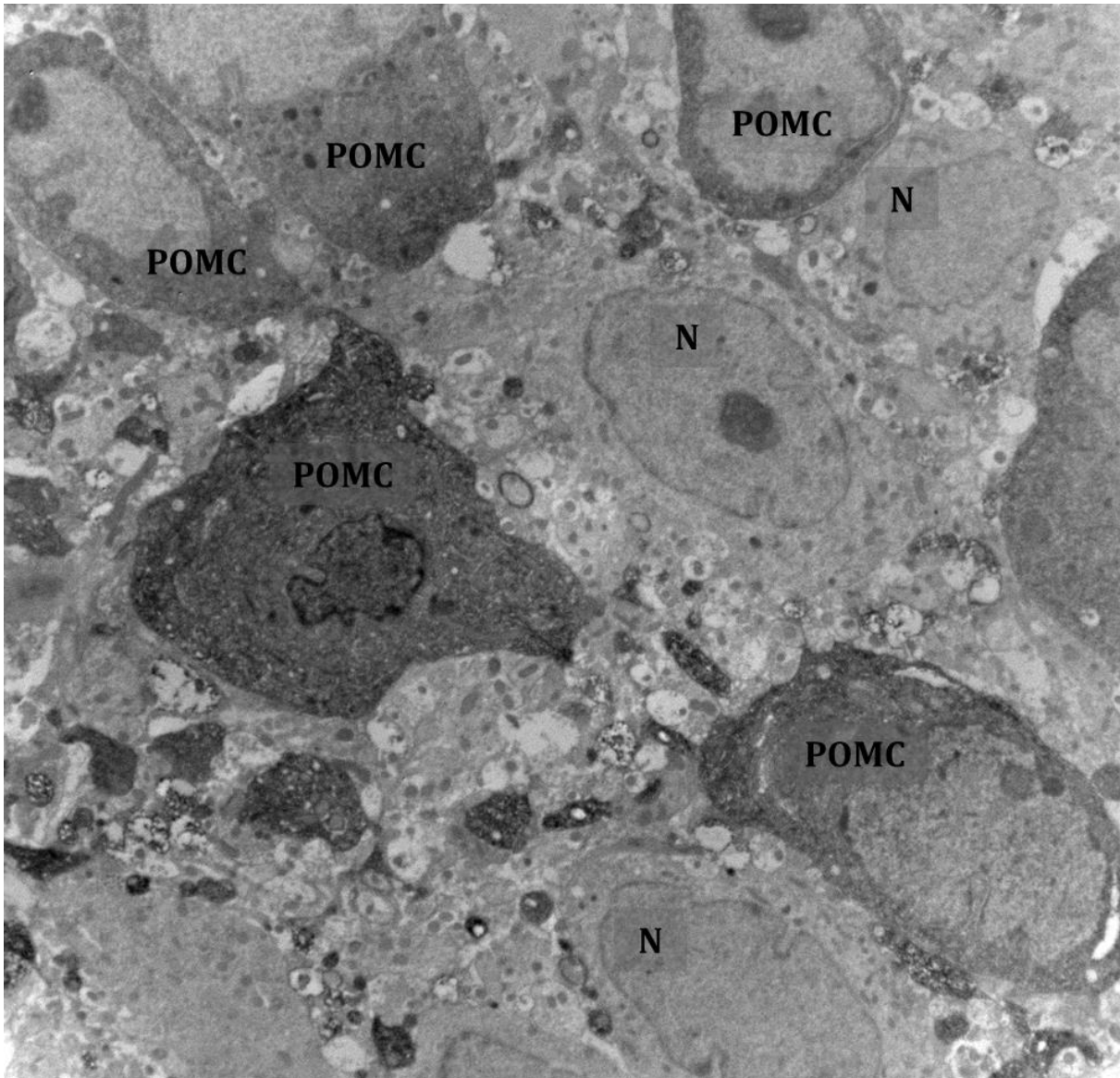


Figure 10 : Microphotographie du noyau arqué après marquage des neurones POMC exprimant la Tomato à la DAB. POMC : neurone POMC-Tomato marqué ; N : autre neurone non identifié ; (x6000)

Reconnaissance des synapses

Les synapses présentent une structure bien particulière à l'échelle électronique. L'identification des synapses en MET, sans immunomarquage, implique une reconnaissance visuelle selon des critères morphologiques bien définis. Ainsi, les synapses sont repérables grâce à plusieurs structures subcellulaires : i) la présence de vésicules de transport des neurotransmetteurs ii) la présence d'un épaissement de la membrane plasmique en postsynaptique ou en pré- et postsynaptique dû à la richesse en protéines de cette structure iii) la forme ovale ou arrondie de l'élément présynaptique ; iv) la présence très fréquente de mitochondries dans l'élément présynaptique. Cependant ces paramètres de reconnaissance peuvent ne pas être présents en même temps au sein de la structure synaptique (Figure 10).

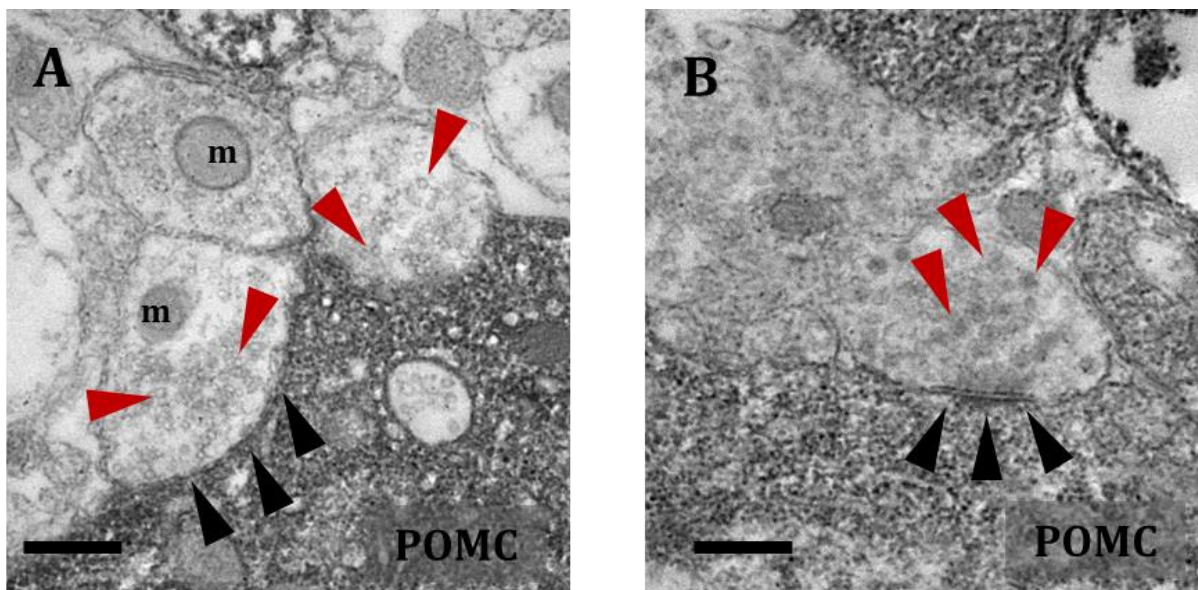


Figure 11 : Microphotographies de différentes structures synaptiques apposées sur les neurones POMC-Tomato marqués à la DAB. Flèches noires : fente synaptique dense aux électrons ; flèches rouges : vésicules contenant les neurotransmetteurs ; m : mitochondries ; barre d'échelle : 500nm

Cette reconnaissance visuelle permet de repérer sur tout le pourtour des somas des neurones marqués les structures synaptiques et permettre leur comptage (Figure 11).

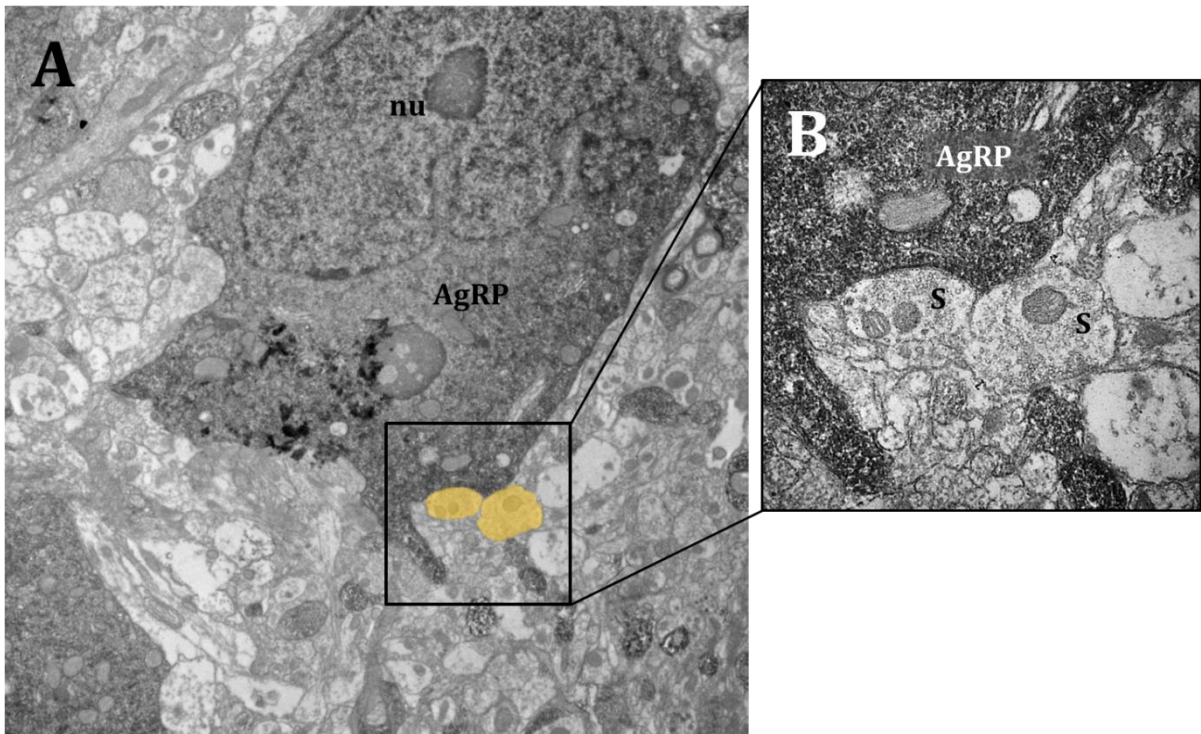


Figure 12 : Microphotographie d'un neurone AgRP exprimant la Tomato révélé à la diaminobenzidine. A : Microphotographie en champ large d'un neurone AgRP-Tomato AgRP : cytoplasme du neurone AgRP contenant des précipités de diaminobenzidine ; nu : noyau cellulaire; pseudocoloré en jaune : structures synaptiques (x10 000) ; B : Zoom sur les structures synaptiques S: synapse ; AgRP : cytoplasme du neurone AgRP (x30 000)

Il convient de remarquer que beaucoup de publications font la distinction entre synapses asymétriques et symétriques. En effet, des expériences de marquage aux billes d'or ont permis de déterminer que les synapses symétriques sont des synapses inhibitrices et que les synapses asymétriques sont des synapses excitatrices (Gray 1969; Pinto 2004). Lors de nos études, nous avons pas fait cette distinction pour des raisons techniques : les précipités très denses de DAB peuvent masquer les densités protéiques en postsynaptique ce qui rend difficile voire impossible la définition du caractère symétrique ou asymétrique des synapses de façon certaine.

Reconnaissance des structures astrocytaires

A l'instar des synapses, les objets astrocytaires peuvent également être reconnus suivant leurs caractéristiques morphologiques. La reconnaissance des astrocytes au sein du tissu à l'échelle électronique est plus difficile et plus subtile que la reconnaissance des synapses et demande un entraînement à l'observation un peu plus long.

Les objets astrocytaires se présentent sous la forme de « couverture astrocytaire » autour des neurones. Celle-ci est constituée de prolongements astrocytaires de formes allongées et étroites, avec un cytoplasme clair d'aspect nuageux et présente des granules de glycogène (Figure 12).

Finalement, le protocole développé permet une reconnaissance efficace de la couverture gliale apposée sur les neurones POMC-Tomato et les neurones AgRP-Tomato. Cette reconnaissance permet de repérer les contacts astrocyte-neurone, de déterminer le pourcentage de couverture astrocytaire, de déterminer le nombre d'objets astrocytaires contactant chaque neurone et de pouvoir mesurer l'aire, le périmètre et la diagonale maximum de chaque objet reconnu comme des éléments de l'astrocyte.

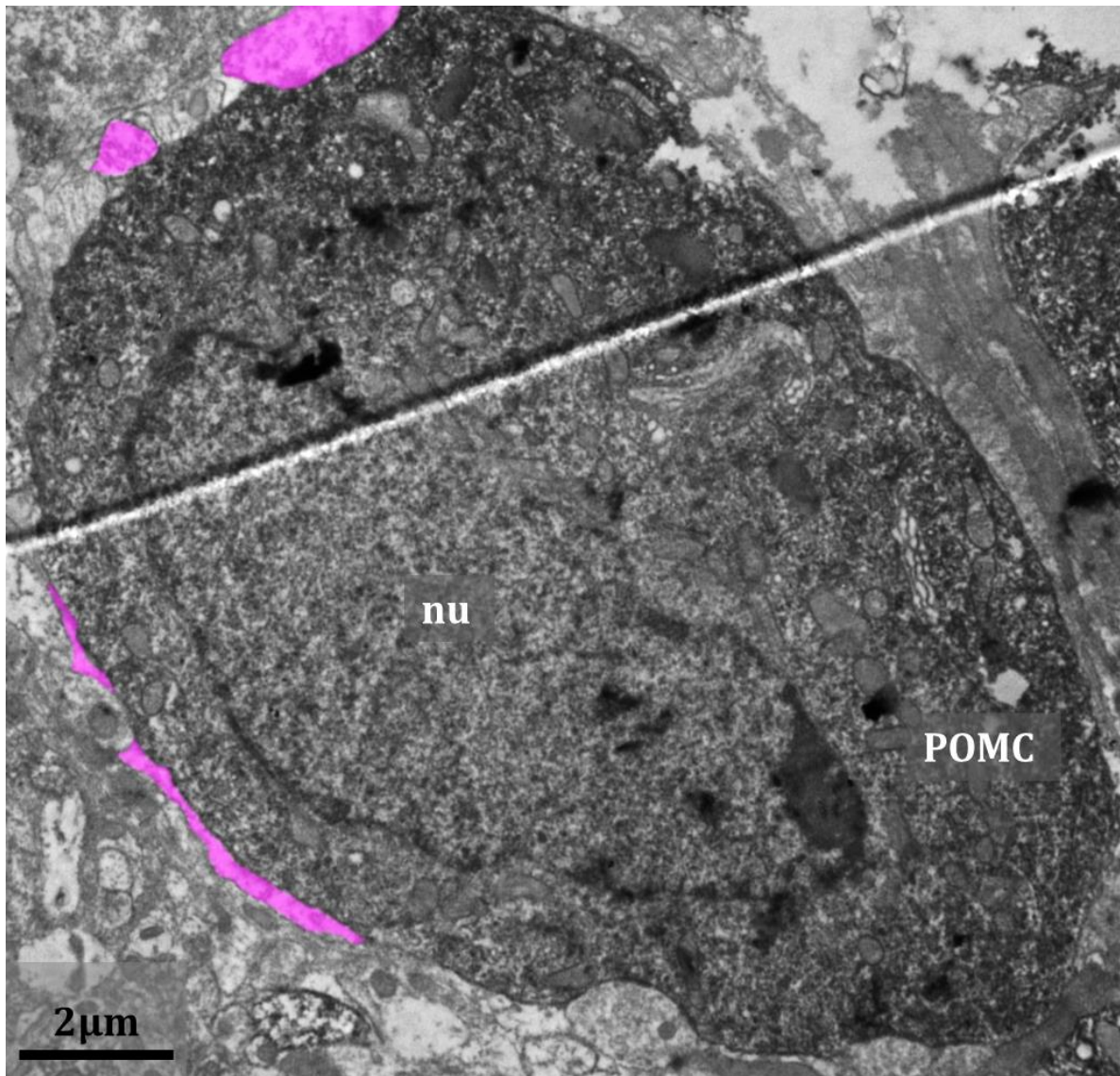


Figure 13 : Microphotographie d'un neurone POMC-Tomato marqué à la DAB. POMC : cytoplasme du neurone POMC contenant les précipités de DAB ; nu : noyau cellulaire du neurone POMC-Tomato ; pseudocoloration rose: couverture astrocytaire ; barre d'échelle : 2µm (x10 000).

Conclusion

Cette mise au point technique a permis de mettre en place une procédure de détection des neurones POMC et des neurones AgRP à l'échelle ultrastructurale associée à une bonne conservation des structures cellulaires environnantes. Elle permet ainsi de détecter les structures synaptiques et les prolongements astrocytaires, reconnaissables visuellement à cette échelle. Par conséquent, cette technique permet d'étudier de façon précise les interactions neurone-neurone et neurone-astrocyte sur les neurones du système à mélanocortine.

e) Procédure finale

Les souris mâles de 8 à 10 semaines sont anesthésiées par une dose létale de kétamine associée à la xylazine (80mg/kg-12mg/kg) pour être ensuite perfusés par voie intracardiaque avec 15 mL de PBS1X, puis avec 40 mL de paraformaldéhyde (PFA) 4% associé à du glutaraldéhyde 0.5%, tous deux dilués dans du tampon phosphate (PB) à une concentration de 0.1M. L'encéphale est ensuite prélevé et placé en post-fixation dans la même solution fixatrice sur la nuit à 4°C. Les cerveaux sont ensuite coupés au Vibratome dans la zone du noyau arqué en tranches de 50µm afin de procéder à l'immunohistochimie des neurones du système à mélanocortine. Les coupes sont récupérées en ordre sériel en alternance pour former deux groupes de coupes. Seul un groupe sera ensuite traité en immunohistochimie. Cette alternance permet d'espacer les coupes afin d'éviter une analyse redondante des mêmes neurones. Les neurones exprimant la Tomato sont révélés à l'aide d'un anticorps primaire anti DsRed produit chez le lapin (Clontech) suivi d'un anticorps secondaire anti lapin biotynilé (Vector). Les coupes sont ensuite incubées avec le kit ABC Elite (Vector) qui permet de créer une arborisation d'avidine peroxydase. Enfin l'incubation avec la diaminobenzidine (DAB), un chromogène dense aux électrons et réactif à l'activité de la peroxydase, permet de révéler les complexes immuns. Les coupes sont ensuite osmifiées à l'aide d'une solution d'osmium à 0.5% pendant 2 heures à température ambiante. Après une déshydratation dans des bains d'alcool de concentration croissante, les coupes sont infiltrées et incluses à plat dans une résine de type araldite (Durcupan, Sigma) entre deux feuillets de film Aclar. Après polymérisation de la résine, les coupes sont collées sur des blocs de résine à l'aide de colle cyanolite. Les ultracoupes de 70nm d'épaisseur sont ensuite réalisées au niveau du noyau arqué et récupérées sur des grilles de cuivre-palladium de 300 mesh. Un contraste aux métaux lourds est ensuite effectué à l'aide d'un substitut d'uranyl

(Uranyl-less, Delta Microscopies) et du citrate de plomb. Les grilles sont observées à l'aide d'un microscope électronique Hitachi 7500. Les neurones sont repérés en champ large et sont photographiés à faible grossissement (x10 000 et x8 000) dans leur totalité. Des zooms sur tout le pourtour du neurone détecté ont été réalisés afin d'obtenir les photographies des structures attenantes aux neurones permettant la reconnaissance visuelle des éléments (x30 000). Seuls les neurones ayant leur noyau apparent ont été photographiés afin d'être certain d'être en présence du corps cellulaire du neurone. Une seule ultracoupe par bloc a été analysée pour éviter de compter deux fois le même neurone issu du même bloc.

4) Microscopie confocale

Les souris mâles de 8 à 10 semaines sont anesthésiées par une dose létale de kétamine-xylazine (80mg/kg-12mg/kg). Ils sont ensuite perfusés par voie intracardiaque avec 15mL de PBS 1X et 40mL de PFA 4% dilué dans du PB 0.1M. Les cerveaux sont ensuite post-fixés sur la nuit à 4°C dans la même solution fixatrice. Les cerveaux sont ensuite cryoprotégés dans une solution de sucrose à 30% pendant 48 à 72h. Après cryoprotection, les cerveaux sont congelés dans un bain d'isopentane maintenu à -65°C et coupés au cryostat en tranches de 16 µm d'épaisseur. La protéine Tomato est amplifiée à l'aide d'un anticorps polyclonal anti DsRed produit chez le lapin (ClonTech). Les synapses inhibitrices sont révélées à l'aide d'un anticorps monoclonal anti VGAT produit chez la souris (Synaptic Systems) et les synapses excitatrices à l'aide d'un anticorps polyclonal anti VGluT1 produit chez le cobaye (Synaptic Systems). Les complexes immuns sont révélés avec des anticorps couplés à des fluorophores : anti lapin Alexa 594, anti souris Alexa 488, anti cobaye Alexa 633 (Life Technologies). Les coupes sont ensuite montées entre lames et lamelles dans un milieu de montage hydrophile et observées à l'aide d'un microscope confocal Leica SP2, à l'objectif x63. Les stacks sont réalisés par pas de 0.5µm au sein de la coupe.

5) Analyse d'images

Les images obtenues en microscopie électronique à transmission sont tout d'abord analysées de façon visuelle afin de repérer les structures synaptiques accolées aux somas des neurones. Les photographies sont ensuite ouvertes sous ImageJ. Le périmètre du neurone, sa diagonale et son aire sont alors mesurés. Les structures synaptiques accolées au neurone sont comptées.

Les images obtenues au microscope confocal sont analysées grâce au logiciel Imaris. Les surfaces des trois marquages sont reconstruites en trois dimensions. Les synapses accolant les neurones POMC sont discriminées des autres synapses à l'aide d'un algorithme permettant de détecter les contacts entre les surfaces des synapses et les surfaces des corps cellulaires marqué à la Tomato. Ces surfaces sont ensuite comptées donnant un nombre de synapses excitatrices et un nombre de synapses inhibitrices. Ces scores sont ramenés à un ratio Synapses VGluT1/Synapses VGAT par soma Tomato.

3. Résultats

1) Activité électrique des neurones AgRP et POMC en fonction de l'état prandial.

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'activité électrique basale des neurones AgRP et des neurones POMC par une technique de patch clamp en configuration cellule attachée en fonction des 3 situations expérimentales. Nous avons mesuré le taux de décharge des neurones correspondant à la fréquence des potentiels d'action émis par les neurones.

Une heure de régime standard provoque une augmentation de la fréquence des potentiels d'action générés par les neurones POMC par rapport à l'état PRE (1h-SD : 2.030 ± 0.538 Hz, N= 4souris ; n=15 neurones *versus* PRE : 0.6298 ± 0.321 Hz, N=4 souris ; n=17 neurones ; ** : p=0.0065) (Figure 13A).

A contrario, la fréquence des potentiels d'action observés après une heure de régime gras ne diffère pas de celle de l'état PRE et est inférieure à celle de l'état 1h-SD (1h-HFD : 0.6120 ± 0.246 Hz ; N=3 souris ; n=15 neurones *versus* 1h-SD ; * : p=0.018) (Figure 13A).

En ce qui concerne l'activité électrique des neurones AgRP, celle-ci n'est pas modifiée en fonction de l'état prandial (PRE : 0.7517 ± 0.2005 Hz, N=4 souris, n=28 neurones *versus* 1h-SD : 0.7474 ± 0.1997 Hz, N=5 souris, n=28 neurones) (Figure 13B). Ce résultat montre également une grande hétérogénéité de fréquence de décharge au sein de la population neuronale AgRP dans nos conditions expérimentales. Aux vues de ces résultats, nous avons poursuivi l'étude sur les neurones POMC uniquement.

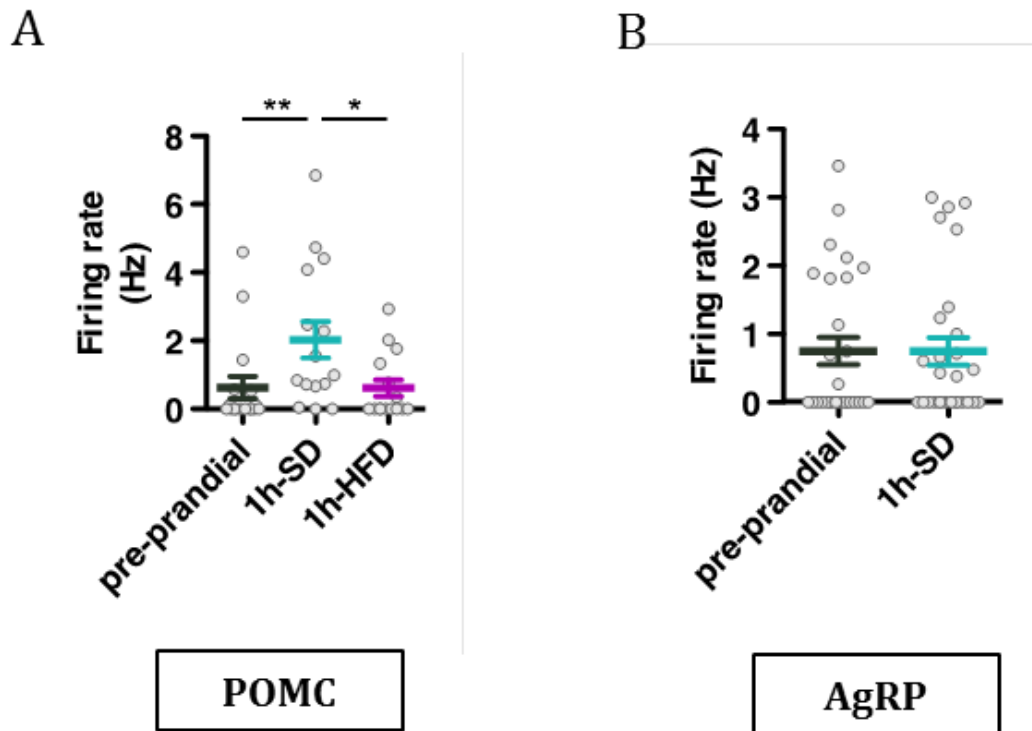


Figure 14 : Activité électrique basale des neurones POMC et des neurones AgRP en fonction de l'état prandial. **A** : Taux de décharge des neurones POMC en fonction de l'état prandial en Hertz ; **B** : Taux de décharge des neurones AgRP en fonction de l'état prandial en Hertz. N=3-4 souris par groupe, n=15-20 neurones par groupe, ** : $p < 0.005$, * : $p < 0.05$.

2) Tonus inhibiteur reçu par les neurones POMC

L'activité neuronale est influencée par différents facteurs intrinsèques (sensibilité, réactivité) et extrinsèques, incluant les activités présynaptiques et les modulations gliales.

Pour déterminer les bases des modifications d'activités électriques des neurones POMC en fonction de l'état prandial, nous avons mesuré le tonus inhibiteur reçu par les neurones POMC. Pour cela, nous avons mesuré les courants miniatures inhibiteurs en s'affranchissant des potentiels d'actions envoyés par d'autres neurones avec l'emploi d'une drogue coupant cette activité électrique, la tétrodotoxine (TTX). Les courants alors observés sont la résultante de fusions spontanées de vésicules chargées en neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique. Des bloqueurs pharmacologiques des courants GABA et des courants Glutamate permettent respectivement d'évaluer le tonus excitateur ou le tonus inhibiteur.

Les résultats montrent que la fréquence des courants miniatures inhibiteurs reçus par les neurones POMC diminue dans l'état 1h-SD par rapport à l'état PRE (1h-SD : 0.5240 ± 0.088 Hz, N= 4souris, n= 10neurones *versus* PRE : 0.8022 ± 0.094 Hz, N= 3souris, n=17 neurones ; * : $p=0.0473$) (Figure 14A). En revanche, la fréquence des courants miniatures inhibiteurs reçus par les neurones POMC dans l'état 1h-HFD ne diffère pas de celle de l'état PRE mais est supérieure à celle de l'état 1h-SD (1h-HFD : 0.9725 ± 0.162 Hz, N=4 souris, n=12 neurones ; * : $p=0.04$) (Figure 14A). De plus, l'amplitude des courants miniatures inhibiteurs ne diffère pas entre les 3 états prandiaux (PRE : -26.38 ± 1.666 pA *versus* 1h-SD : -28.08 ± 3.274 pA *versus* 1h-HFD : -29.52 ± 1.883 pA) (Figure 14B).

Ces résultats indiquent que le tonus inhibiteur reçu par les neurones POMC varie selon l'état prandial et la nature de l'aliment. L'absence de modification d'amplitude des courants suggère une régulation présynaptique uniquement (réorganisation synaptique, influence gliale) et non postsynaptique (sensibilité et réactivité du neurone inchangée).

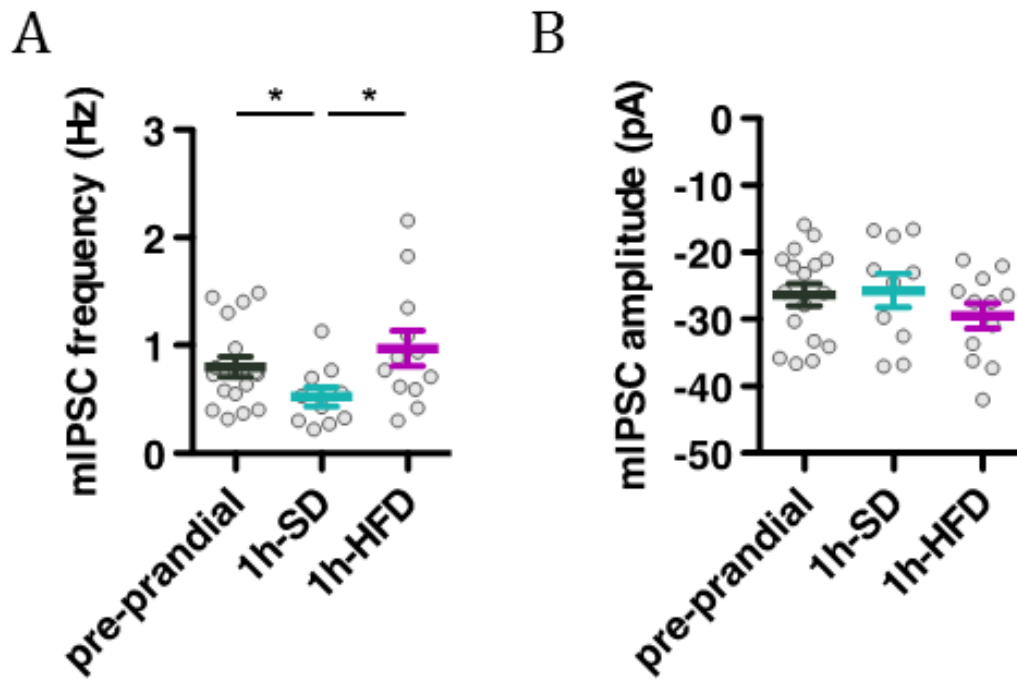


Figure 15 : Fréquence et amplitude des courants miniatures inhibiteurs reçus par les neurones POMC en fonction de l'état prandial. **A** : Fréquence des mIPSC en Hertz ; **B** : Amplitude des mIPSC en pA. N=3-4 souris par groupe, n=15-20 neurones par groupe, * : $p < 0.05$.

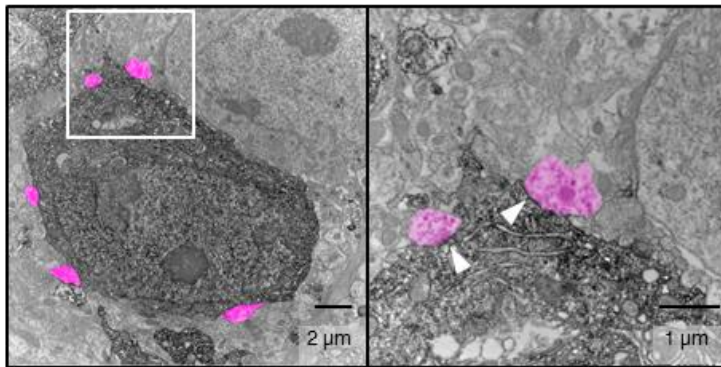
3) Densité synaptique sur les neurones POMC en fonction de l'état prandial.

Pour compléter l'exploration de phénomènes de plasticité synaptique, l'étape indispensable consiste à déterminer au niveau neuro-anatomique et structural la densité synaptique contactant les neurones POMC. La stratégie que nous avons adoptée est la reconnaissance visuelle en microscopie électronique des structures synaptiques directement apposées sur les neurones POMC à l'échelle électronique.

Nous avons effectué un comptage des synapses au niveau ultrastructural sur les neurones POMC dans les trois états prandiaux. Les synapses ont été comptées et la densité synaptique, exprimée en nombre de synapse par 100 μ m de périmètre somatique a été extrapolée afin de standardiser les mesures (Figure 15A).

Les résultats ne montrent aucune différence de densité synaptique contactant les neurones POMC en fonction de l'état prandial (PRE : 8.084 ± 1.085 synapses/100 μ m N=4souris, n=14 neurones *versus* 1h-SD : 6.631 ± 0.792 synapses/100 μ m N=4 souris, n=22 neurones *versus* 1h-HFD : 8.674 ± 1.261 synapses/100 μ m, N=3souris, n=21 neurones) (Figure 15B). Cependant cette densité synaptique prend en compte toutes les synapses, quel que soit leur type (excitatrice ou inhibitrice) et ne permet pas d'estimer une inversion possible dans la nature des synapses présentes.

A



B

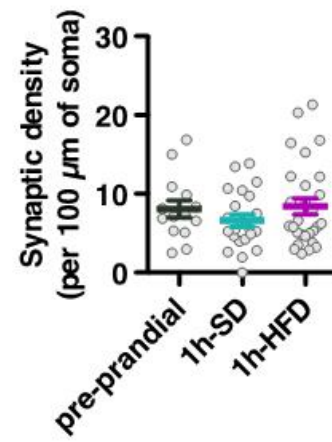


Figure 16 : Densité synaptique sur les corps cellulaires POMC en fonction de l'état prandial. **A** : Microphotographie d'un neurone POMC-Tomato, pseudocoloration rose : structures synaptiques; **B** : Densité synaptique exprimée en nombre de synapses par 100μm de périmètre somatique. N=3-4 souris par groupe, n=15-20 neurones par groupe.

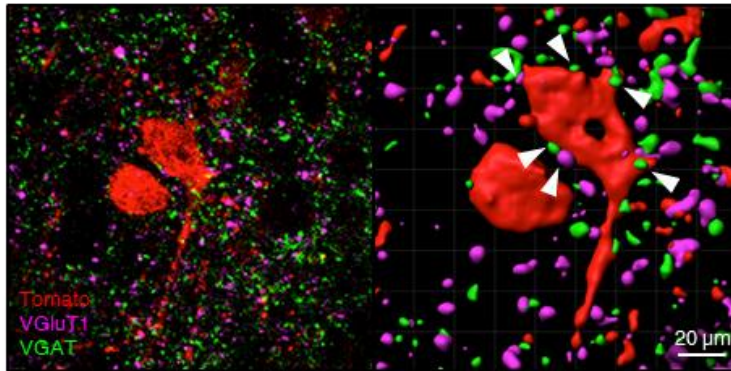
4) Configuration synaptique et état prandial

Afin d'apprécier un éventuel changement dans la nature des synapses contactant les neurones POMC, déclenché lors d'un changement d'état prandial, nous avons identifié et comptabilisé les synapses après immunomarquage et observation en microscopie confocale. Nous avons sélectionné des marqueurs présynaptiques spécifiques soit des synapses inhibitrices soit des synapses excitatrices. Nous avons choisi le marqueur VGAT pour les synapses inhibitrices et VGlut1 pour les synapses excitatrices. Les synapses de chaque type contactant le corps cellulaire des neurones POMC ont été comptées et les scores ramenés à un ratio VGlut1 positif/ VGAT positif afin de standardiser les mesures (Figure 16A).

L'analyse montre que le ratio VGlut1 positif/VGAT positif ne présente pas de différence significative entre l'état PRE et l'état 1h-SD (PRE : 0.491 ± 0.075 , N= 4 souris, n= 68 neurones *versus* 1h-SD : 0.6202 ± 0.057 , N= 4 souris, n= 77 neurones) (Figure 16B).

En revanche, le ratio VGlut1/VGAT est augmenté dans l'état 1h-HFD comparé à l'état PRE et 1h-SD (1h-HFD : 2.047 ± 0.186 , N=3 souris, n= 72 neurones *versus* 1h-SD : *** : $p < 0.0001$ et *versus* PRE : *** : $p < 0.0001$) (Figure 16B).

A



B

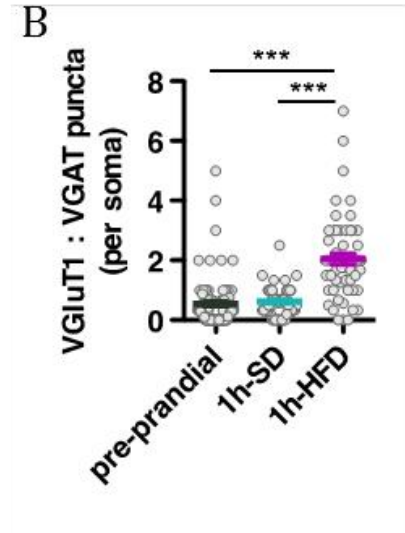


Figure 17 : Configuration synaptique sur les corps cellulaires POMC en fonction de l'état prandial. **A** : Microphotographie de neurones POMC-Tomato, rouge : Détection de la Tomato, vert : Détection du marqueur des synapses inhibitrices VGAT, magenta : Détection du marqueur des synapses excitatrices VGlut1, flèches blanches : boutons synaptiques contactant un corps cellulaire POMC ; **B** : Ratio du nombre de boutons synaptiques VGlut1 positifs sur le nombre de boutons synaptiques VGAT positifs exprimé par soma POMC. N=4 souris par groupe, n=60 à 75 neurones par groupe, *** : $p < 0.0001$.

4. Interprétation

Dans cette étude nous montrons pour la première fois que l'activité des neurones POMC peut être modifiée à court terme (au bout d'une heure) en fonction de l'état prandial.

En effet, la situation post-prandiale, qui ne présente pas de fluctuations hormonales manifestes à une heure, est associée à une augmentation de l'activité des neurones POMC. Et cet effet n'est visible qu'avec le régime standard, consommé habituellement par les souris. L'activation des neurones POMC dans la situation post-prandiale est cohérente avec le rôle anorexigène des neurones POMC suite à une prise alimentaire, et correspond par conséquent à une réponse physiologique adaptée.

Cependant, cette augmentation de l'activité des neurones POMC observée en électrophysiologie n'est pas corrélée à des modifications de configuration synaptique : en effet, la densité synaptique présente à la surface des neurones POMC et la configuration synaptique ne sont pas modifiées en condition 1h-SD par rapport à la condition PRE.

Il faut également relever ici la spécificité de la réponse. En effet, si l'on change la nature du régime pour un régime plus riche en lipides, l'activation des neurones POMC au bout d'une heure de consommation n'est plus présente malgré une consommation de nourriture identique à 1h-SD. La nature du régime semble donc influencer l'activation ou non des neurones POMC à cette échelle de temps. Ainsi un régime gras palatable et qualifié comme non satiétogène n'active pas les neurones POMC à l'échelle des repas, en dépit d'une consommation identique en masse. Pour autant, cette activité POMC qui reste basse est corrélée à une modification de la configuration synaptique: les neurones POMC qui ne s'activent pas suite à 1h d'exposition à un régime gras, présentent un plus grand nombre de synapses excitatrices sur leur soma. Les observations électrophysiologiques ne corroborent pas cette donnée et suggèrent que ce remodelage physique n'est pas encore fonctionnel à cette échelle de temps. Ainsi on peut supposer que la consommation d'un régime riche en lipides induirait à très court terme un recablage synaptique adaptatif autour des neurones POMC en faveur des synapses excitatrices qui viserait à activer les neurones POMC à plus long terme. Ce remodelage synaptique ne semble pas être déclenché lors de la consommation d'un régime standard

et équilibré, ce qui suggère que d'autres éléments interviennent dans la régulation présynaptique des neurones POMC dans cette situation.

Les astrocytes, étant des cellules hautement réactives, modulatrices de la transmission synaptique apparaissent comme des candidats potentiels qui pourraient contribuer à la régulation de l'activité des neurones POMC, dans la condition 1h-SD.

ETUDE 3 : PLASTICITE ASTROCYTAIRE DU NOYAU ARQUE EN FONCTION DE L'ETAT PRANDIAL

1. Objectifs.

Récemment, il a été montré que les astrocytes jouaient un rôle dans le contrôle de la balance énergétique, en relation avec les neurones du système à mélanocortine du noyau arqué (García-Cáceres et al. 2016; Kim et al. 2014). Les astrocytes sont des cellules gliales très labiles pouvant réagir à court terme à des signaux environnementaux. Ces cellules ont la capacité de modifier très rapidement leur morphologie afin de s'adapter aux signaux de l'environnement. Les astrocytes sont également capable de modifier la transmission synaptique en recaptant les neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique et en sécrétant des gliotransmetteurs inhibiteurs tels que l'adénosine, la sérine ou encore le GABA. Il convenait donc d'explorer les modifications morphologiques astrocytaires au niveau du noyau arqué et en périphérie des neurones POMC, comme étant des facteurs potentiels pouvant expliquer les modifications d'activité des neurones POMC en fonction de l'état prandial.

2. Matériel et méthodes

5) Animaux

Les souris mâles sont placées dès le sevrage dans une pièce d'hébergement ayant un rythme décalé (10h30 OFF ; 22h30 ON) permettant de faciliter l'expérimentation. Dans cette étude, nous avons utilisés deux lignées de souris: la lignée C57BL6j et la lignée POMC-Tomato qui exprime la protéine fluorescente Tomato les neurones POMC d'autre part.

La modélisation de l'état prandial a été détaillée dans le chapitre « Stratégies » : les souris en condition PRE sont mises à jeun deux heures avant la période nocturne, les souris en condition 1h-SD sont mise à jeun deux heures avant la période nocturne et re-nourries sur la première heure de la période nocturne, les souris en conditions 1h-HFD sont mises à jeun deux heures avant la période nocturne et re-nourries avec un régime HFD pendant la première heure de la période nocturne.

1) Microscopie à fluorescence

Des souris mâles C57Bl6j de 8 semaines sont anesthésiées par une dose létale de kétamine-xylazine (80mg/kg-12mg/kg). Elles sont ensuite perfusées par voie intracardiaque avec 15mL de PBS 1X et 40mL de PFA 4% dilué dans du PB 0.1M. Les cerveaux sont ensuite post-fixés sur la nuit à 4°C dans la même solution fixatrice. Les cerveaux sont ensuite cryoprotégés dans une solution de sucrose à 30% pendant 48 à 72h. Après cryoprotection, les cerveaux sont congelés dans un bain d'isopentane maintenu à -65°C et coupés au cryostat en tranches de 16 µm d'épaisseur. La protéine GFAP est révélée à l'aide d'un anticorps monoclonal anti GFAP produit chez la souris (1/2000, Sigma). Les complexes immuns sont révélés à l'aide d'un anticorps anti souris couplé à un fluorophore Alexa 488 (Life Technologies). Les coupes sont ensuite montées entre lames et lamelles dans un milieu de montage hydrophile et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence Axio Imager M2 (Zeiss).

2) Immunohistochimie associée à la Microscopie Electronique à Transmission

Cette procédure est détaillée dans l'étude 1.

3) Analyse d'images

Les images obtenues en microscopie électronique à transmission sont tout d'abord analysées de façon visuelle afin de repérer les différentes structures astrocytaires accolées aux somas des neurones. Les photographies sont ensuite ouvertes sous ImageJ. Le périmètre du neurone, sa diagonale maximum et son aire sont mesurés. Les structures astrocytaires sont mesurées (aire, périmètre, diagonale maximum) ainsi que leur distance de contact avec le neurone, ramenée à un pourcentage de couverture astrocytaire.

3. Résultats

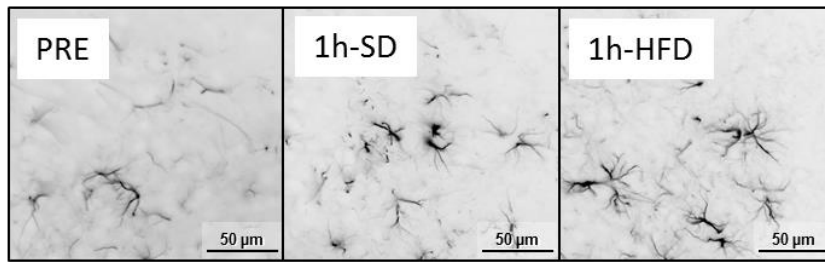
1) Réactivité astrocytaire dans le noyau arqué et état prandial.

Les astrocytes peuvent changer rapidement de forme lors de leur activation: ils émettent des prolongements plus longs et plus épais ou se rétractent. Le marquage de la protéine GFAP permet de mettre en valeur le cytosquelette de cellules GFAP positives qui sont en majorité des astrocytes. Une première approche d'exploration de la plasticité astrocytaire dans le noyau arqué est de détecter par immunomarquage la surface occupée par la protéine GFAP. Dans cette étude nous avons effectué un immunomarquage de la GFAP dans le noyau arqué dans nos trois états prandiaux expérimentaux : l'état PRE, l'état 1h-SD et l'état 1h-HFD (Figure 17A).

La surface de l'immunoréactivité pour la protéine GFAP est augmentée dans les deux états post-prandiaux 1h-SD et 1h-HFD (Figure 17B). Dans la situation 1h-SD la surface de marquage contre la GFAP montre une forte tendance à l'augmentation (+41%) par rapport à la situation PRE (PRE : 100.0 ± 12.51 u.a. N=12 souris *versus* 1h-SD : 141.7 ± 15.08 u.a. N=12 souris ; $p=0.054$). Dans la situation 1h-HFD, la surface de marquage augmente significativement par rapport à la situation PRE (1h-HFD : 168.0 ± 22.89 u.a., N=12 souris, * : $p=0.0161$). Aucune différence est détectée entre la surface de marquage GFAP dans la situation 1h-SD par rapport à la situation 1h-HFD.

Cette première approche montre que les astrocytes montrent une réactivité dans les 2 états post-prandiaux suggérant l'activation de ces cellules à l'échelle des repas. L'activation astrocytaire postprandiale pourrait s'accompagner de modifications d'interaction avec les neurones, en particulier avec les neurones POMC.

A



B

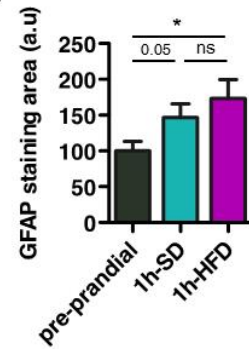


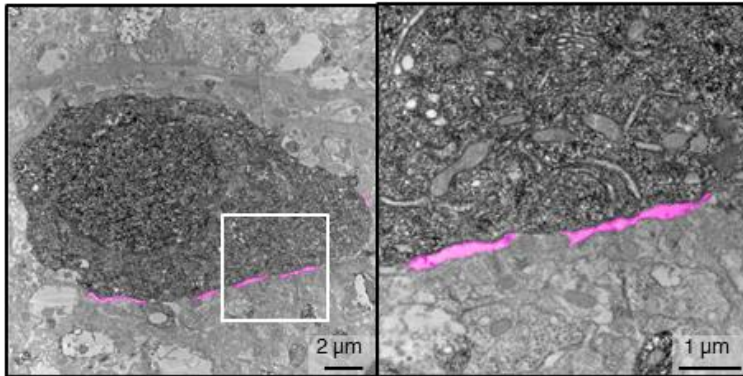
Figure 18 : Réactivité astrocytaire dans le noyau arqué en fonction de l'état prandial. A : Microphotographies représentatives du marquage dirigé contre la protéine GFAP dans les conditions PRE, 1h-SD et 1h-HFD. **B :** Surface du marquage dirigé contre la protéine GFAP révélé en fluorescence en unités arbitraires. N= 10-12 souris par groupe.

2) Relation astrocyte-neurone POMC : exploration de la couverture astrocytaire.

Afin d'explorer les relations astrocytes-neurones POMC nous avons déterminé en MET le nombre de contacts astrocytaires sur les somas POMC et nous avons mesuré la couverture astrocytaire c'est-à-dire la distance de contact des astrocytes sur les corps cellulaires POMC-Tomato (Figure 18A).

Notre étude montre une diminution de la couverture astrocytaire sur les somas POMC dans l'état 1h-SD par rapport à l'état PRE (1h-SD : 28.61 ± 1.936 %, N=4 souris, n=22 neurones versus PRE : 39.83 ± 1.625 %, N=4souris, n=14 neurones ; *** : p=0.0003) (Figure 18B). En revanche l'état 1h-HFD ne montre aucune modification de la couverture astrocytaire par rapport à l'état PRE mais augmente par rapport à l'état 1h-SD (1h-HFD : 42.72 ± 2.596 %, N=3 souris, n=21 neurones versus 1h-SD : *** : p=0.0004) (Figure 18B).

A



B

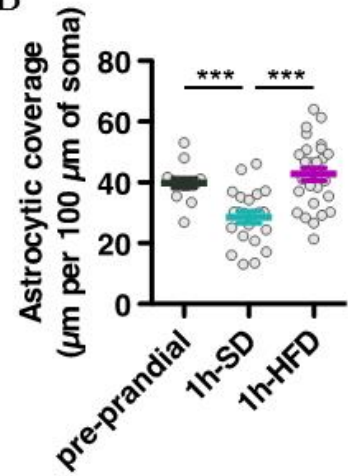


Figure 19 : Mesure de la couverture astrocytaire en périphérie des neurones POMC. **A** : Microphotographie et zoom d'un neurone POMC-Tomato marqué à la DAB. Pseudocoloration rose : objets astrocytaires. **B** : Représentation graphique de la couverture astrocytaire en fonction de l'état prandial exprimée par 100μm de soma POMC. *** : $p < 0.0005$, $N = 3$ à 4 souris par groupe, $n = 15-25$ neurones par groupe.

4. Interprétation

Les résultats indiquent que les astrocytes sont sensibles à l'état prandial et leur morphologie évolue en fonction de celui-ci. Nous avons ainsi mis en évidence une rétractation astrocytaire post-prandiale autour des somas des neurones POMC. De plus, on observe une corrélation inverse entre couverture gliale péri-somatique et activité électrique des neurones POMC, suggérant un rôle inhibiteur des astrocytes sur les neurones POMC. En effet, la rétractation astrocytaire postprandiale dans l'état 1h-SD est corrélée à une augmentation de l'activité électrique des neurones POMC. Cette diminution des contacts astrocytaires pourraient conditionner cette augmentation d'activité selon deux modalités:

- En diminuant la recapture du glutamate au niveau des synapses excitatrices apposées sur les neurones POMC, provoquant ainsi une augmentation de la liaison du glutamate à son récepteur post-synaptique et une augmentation de courants excitateurs au niveau du neurone POMC.
- En diminuant l'inhibition directe du neurone POMC par l'astrocyte via des gliotransmetteurs inhibiteurs tels que l'adénosine, la d-sérine ou encore le GABA.

De plus, dans l'état 1h-HFD, la couverture astrocytaire, semblable à l'état PRE est corrélée à une activité électrique des neurones POMC qui reste basse. Ainsi, le maintien de ces contacts astrocytaires pourrait maintenir une recapture importante du glutamate au niveau des synapses excitatrices apposées sur les neurones POMC et/ou pourrait maintenir une inhibition directe forte par l'astrocyte de l'activité électrique via des neurotransmetteurs inhibiteurs.

ETUDE 4 : LE GLUCOSE, UN SIGNAL POSSIBLE DE PLASTICITE ASTROCYTAIRE DANS LE SYSTEME A MELANOCORTINE

1. Objectifs

Dans les chapitres précédents, nous avons montré que l'activité électrique du neurone POMC est dépendante de l'état prandial et de la nature du régime consommé. Les neurones POMC sont activés après une heure d'exposition à un régime standard. Cette activation est corrélée à une diminution de la couverture astrocytaire sans changement synaptique. Les fluctuations hormonales ne semblent pas expliquer les modifications post-prandiales structurales et fonctionnelles des neurones POMC. En revanche, le glucose est capable d'induire un remodelage morphologique des cellules gliales, en particulier au niveau des tanocytes (Langlet et al. 2013). La sensibilité des astrocytes au glucose pourrait expliquer ce phénomène de rétractation astrocytaire autour des neurones POMC. En effet, les astrocytes possèdent la machinerie cellulaire nécessaire au transport et à la détection du glucose sanguin et sont capables de moduler l'activité des neurones POMC en sécrétant des métabolites du glucose comme le lactate, indispensable au fonctionnement du neurone (Levin et al. 2011). L'objectif de cette étude est de vérifier si le glucose est capable d'induire une plasticité astrocytaire autour des neurones POMC. Nous avons choisi d'utiliser une approche dite de « perte de fonction » du glucose en utilisant un antagoniste pharmacologique des transporteurs au glucose au niveau intestinal et rénal : le LX4211. Cette molécule inhibe les canaux SGLT1 intestinaux, et bloque ainsi l'absorption intestinale du glucose, et inhibe les canaux SGLT2 rénaux, et bloque ainsi la réabsorption tubulaire du glucose et favorise son élimination.

2. Matériel et Méthodes

1) Animaux

Les animaux sont hébergés dans les mêmes conditions de rythmicité et d'habituation que dans les études précédentes. Dans cette étude, nous avons utilisés deux lignées de souris : la lignée C57BL6j et la lignée POMC-Tomato qui exprime la protéine fluorescente Tomato dans les neurones POMC. Puisque la régulation des neurones POMC et le remodelage astrocytaire associé ne sont observés qu'en situation post-prandiale sous régime standard, nous avons étudié le rôle du glucose dans cette condition uniquement. Pour cela, nous avons injecté l'antagoniste LX4211 avant la réalimentation et observé les effets de cette injection sur la glycémie post-prandiale et la couverture astrocytaires des neurones POMC (Figure 19).

Afin d'éviter d'influencer la consommation de nourriture par le stress lié à l'injection du LX4211 ou du véhicule, les animaux sont habitués à la contention et à l'injection intrapéritonéale de solution de NaCl à 0.9% pendant 3 jours avant le début de l'expérience. Cela évite également l'hyperglycémie réactionnelle provoquée par le stress. La glycémie est prise sur animaux vigiles à la veine de la queue.

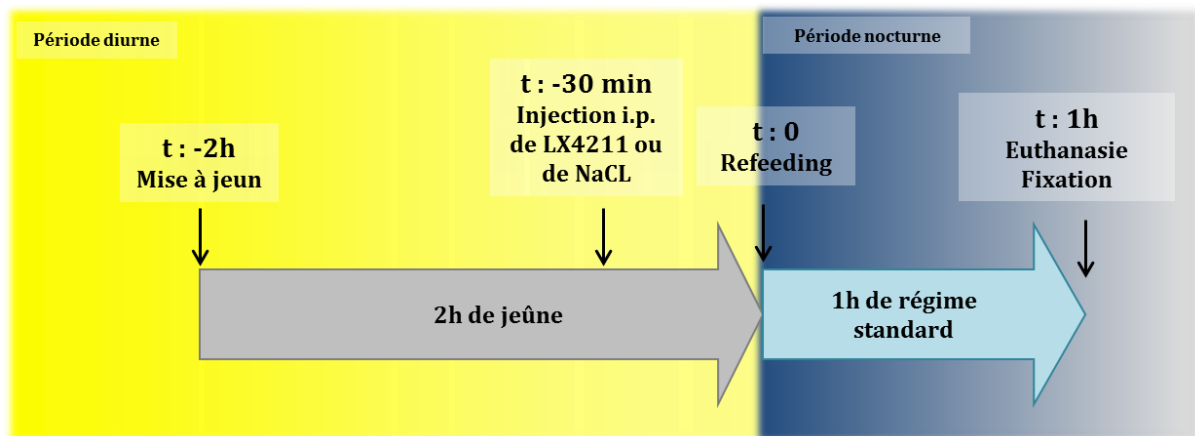


Figure 20 : Représentation schématique du paradigme expérimental utilisé pour le traitement au LX 4211. t : repère temporel ayant pour origine l'extinction des lumières ; Refeeding : remise à disposition de la nourriture *ad libitum*.

2) Agent pharmacologique utilisé

Le LX4211 (Advanced ChemBlocks Inc.) est un inhibiteur des transporteurs SGLT1 et SGLT2. Le LX4211 a été préparé dans une solution contenant 2.5% de DMSO, 22.5% de PEG300, qsp NaCl 0.9%, afin d'être injecté à une dose de 60mg/kg (100µl i.p.), une demi-heure avant le début de la période nocturne et de la remise à disposition de la nourriture.

3) Immunohistochimie associée à la microscopie électronique à transmission et analyse d'image

Cette procédure est détaillée dans l'étude 2 et dans l'étude 3.

3. Résultats

1) Evolution temporelle de la glycémie post-prandiale sous régime standard

Afin de suivre l'évolution de la glycémie post-prandiale, nous avons mesuré le taux de glucose circulant à 20 minutes, 40 min et 60 min post-prandiales. Cette expérience montre qu'un pic de glucose survient à 20 minutes post prandial uniquement dans la condition nourriture SD par rapport à la ligne de base définie par la glycémie en condition PRE (PRE : 150.1 ± 5.832 mg/dl ; 20min-SD : $125.06 \pm 4.24\%$ de la ligne de base N=9 souris *versus* 20 min-HFD : $101.60 \pm 3.63\%$ de la ligne de base, N=9 souris). Ce taux de glucose circulant revient à la ligne de base à 40 minutes et à 60 minutes dans nos deux groupes expérimentaux (40min-SD : $104.52 \pm 3.58\%$ de la ligne de base, N=9 souris *versus* 40min-HFD : $95.34 \pm 2.11\%$ de la ligne de base, N=9 souris) (Figure 20).

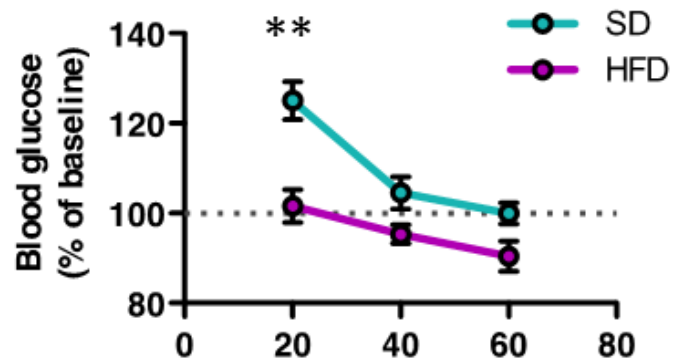


Figure 21 : Cinétique des taux de glucose circulant au cours d'une heure d'exposition à un régime standard et à un régime gras pendant la première heure de la période nocturne. Représentation graphique de la cinétique de la glycémie exprimée en pourcentage de la ligne de base. N=9 animaux par point, ** : $p < 0.005$.

2) Le LX4211 inhibe le pic post-prandial de glucose

Avant d'évaluer l'effet du LX4211 sur la plasticité astrocytaire, il était nécessaire dans un premier temps de contrôler l'efficacité du LX4211 à moduler le pic post-prandial de glucose observé après 20 minutes de réalimentation. Après habitude à la contention et à la prise de glycémie 3 jours avant le début de l'expérience, la glycémie a été prise à la veine de la queue après injection du LX4211 ou du véhicule NaCl 0.9% dans la situation PRE, et à 20 minutes post-prandiales (20min-SD).

L'injection de NaCl précédant l'état PRE et l'état 20min-SD ne modifie pas la glycémie en condition PRE (PRE+NaCl : 136.5 ± 3.775 dg/dl, N=7 souris), ni son évolution en condition post-prandiale 20min-SD (20min-SD+NaCl : 165 ± 3.856 dg/dl, N=7 souris ; ** : $p=0.0057$) (Figure 21).

En revanche, l'injection de LX4211 bloque totalement l'élévation de la glycémie à 20min-SD par rapport à 20min-SD précédé d'une injection de NaCl (20min-SD+LX : 152.2 ± 3.429 dg/dl, N=7 souris ; * : $p=0.0103$) (Figure 21).

L'injection de LX4211 en intrapéritonéale permet un blocage efficace du pic de glucose observé dans notre modèle à 20 minutes post-prandial. Nous pouvons donc utiliser cette approche pour évaluer l'effet de ce pic de glucose sur la plasticité astrocytaire.

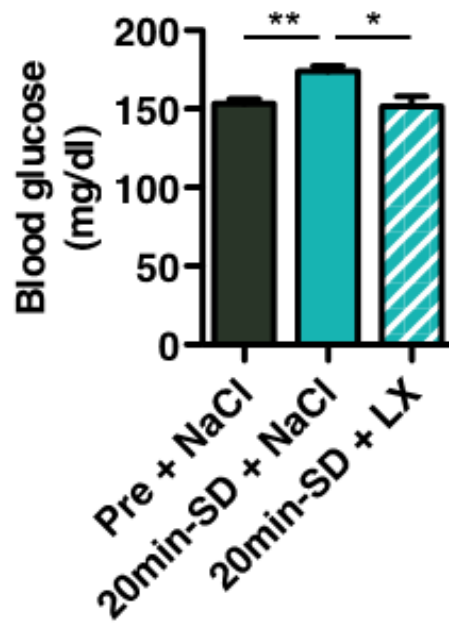


Figure 22 : Représentation graphique du taux de glucose sanguin dans la condition PRE précédée d'une injection de NaCl et en condition 20min-SD après injection de NaCl ou de LX4211. Glycémie exprimée en mg/dl ; N= 7 souris par groupe, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.005$.

3) Blocage périphérique du glucose et couverture gliale sur les neurones POMC

Après avoir vérifié l'efficacité du LX4211 à inhiber le pic glycémique post-prandial, nous avons mesuré l'effet de ce traitement sur la plasticité astrocytaire en évaluant le remodelage des astrocytes sur les neurones POMC. Pour cela nous avons mesuré la couverture gliale à 1h-SD après traitement au LX4211 ou au véhicule NaCl 0.9%.

L'injection de NaCl ne modifie pas la rétractation astrocytaire sur les neurones POMC. En revanche, le blocage du pic de glucose par le LX4211 maintient la couverture astrocytaire élevée sur les neurones POMC (1h-SD+NaCl : 22.07 ± 2.089 %, N=3 souris, n=5 neurones versus 1h-SD+LX4211 : 35.22 ± 2.358 %, N=3 souris, n=7 neurones ; ** : $p=0.007$) (Figure 22).

A noter que cette expérience devra être reproduite vu le petit nombre de neurones analysés afin de confirmer ce résultat faible.

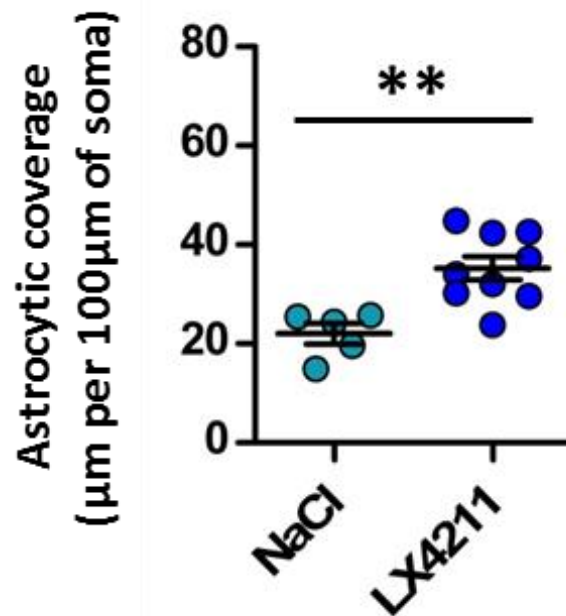


Figure 23 : Mesure de la couverture astrocytaire en périphérie des neurones POMC à 1h-SD en fonction du traitement. Représentation graphique de la couverture astrocytaire en fonction du traitement exprimée en µm par 100µm de soma POMC. ** : $p < 0.005$, $N = 3$ à 4 souris par groupe, $n = 5$ à 9 neurones par groupe.

4. Interprétation

Nos résultats indiquent que le pic post-prandial de glucose est nécessaire pour déclencher les modifications astrocytaires post-prandiales.

Par conséquent, l'absence de signal glucose en condition 1h-HFD expliquerait le maintien des contacts astrocytaires sur les neurones POMC.

ETUDE 5 : ROLE DES ASTROCYTES SUR LA REGULATION DE LA PRISE ALIMENTAIRE

1. Objectifs

Chez la souris, le comportement alimentaire ne comprend pas de repas à proprement parler. En effet, il s'agit plutôt d'une succession de prises alimentaires courtes que l'on appelle « bouts ».

Nous avons montré dans les parties précédentes qu'une rétractation astrocytaire se produit autour des neurones POMC en condition post-prandiale. Ces changements morphologiques sont corrélés à une augmentation d'activité des neurones POMC et pourraient donc impacter le comportement alimentaire.

L'objectif de cette étude est d'évaluer si les astrocytes hypothalamiques peuvent effectivement contrôler le comportement alimentaire chez la souris. Pour tester cette hypothèse, il est nécessaire de manipuler spécifiquement les astrocytes hypothalamiques. Les outils pharmacogénétiques semblent être indiqués pour réaliser cette manipulation cellule-spécifique. Dans cette étude, nous avons donc utilisé une approche pharmacogénétique ciblée sur les astrocytes hypothalamiques et évalué l'impact d'une manipulation de ces cellules sur le comportement alimentaire.

2. Matériel et Méthodes

1) Animaux

Dans cette étude, nous avons travaillé sur des souris mâles âgées de 8 semaines de la lignée C57Bl6J et sur la lignée POMC-Tomato, toutes deux incluses dans notre paradigme expérimental modélisant l'état prandial.

2) Mesure de la prise alimentaire par le système BioDaq

Le système BioDaq est un système de mesure automatisé de la prise alimentaire. Il repose sur l'enregistrement en temps réel de la quantité de nourriture ingérée mais

aussi du rythme de consommation. Des balances très sensibles sont placées sous les mangeoires. Les prises alimentaires sont filtrées avec minimum de 0.02g, due à la sensibilité des balances. Dans ce système, les animaux doivent être habitués à leur nouvel environnement pendant quelques jours avant le début de l'expérience. Les mesures du comportement alimentaire sont effectuées en continu, sur 3 jours, dans toutes les conditions expérimentales, afin de pallier aux variations intra-individuelles et de façon appariée pour les animaux inclus dans l'étude de pharmacogénétique.

3) Pharmacogénétique

f) Principe

Le principe de la pharmacogénétique est de faire exprimer aux cellules d'intérêt un récepteur dont le ligand est exclusivement exogène. Au cours de ma thèse j'ai utilisé les récepteurs DREADD : ce sont des récepteurs muscariniques modifiés couplés à des protéines G excitatrices (Gq) ou inhibitrices (Gi), qui sont activés par un ligand exogène la clozapine (CNO). Le couplage aux protéines G détermine l'action des DREADD sur les cellules : dans les neurones, un DREADD(Gq) activera le neurone, tandis qu'un DREADD(Gi) inactivera le neurone (Figure 23).

Dans cette étude, nous avons manipulé l'activité astrocytaire hypothalamique. Cette spécificité cellulaire et spatiale est permise par l'injection de vecteurs viraux dans l'hypothalamus médio-basal en stéréotaxie. Nous avons utilisé des DREADD couplés à une protéine Gi dans l'optique d'inhiber l'activité astrocytaire. En effet, les DREADD(Gi) agissent au niveau intracellulaire en diminuant les taux d'AMP cyclique et les taux d'ions Ca^{2+} . Cependant l'influence de ces effets sur l'activité astrocytaire est encore inconnue.

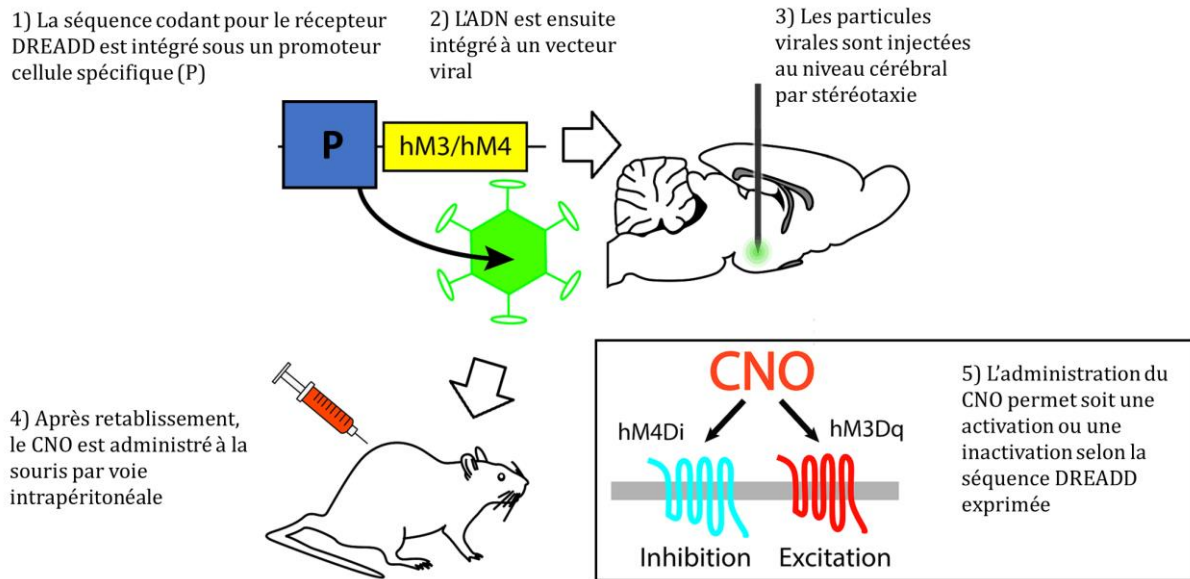


Figure 24 : Représentation schématique du principe de l'utilisation des DREADD afin de moduler l'activité des cellules neuronales. (Adaptée d'après Lovic Laboratory Methods)

g) Particules virales

Les particules virales utilisées sont des virus adéno-associés (AAV). Ces particules présentent l'avantage d'être non-pathogènes. Les vecteurs utilisés portent une séquence ADN qui exprime le récepteur DREADD hM4D-Gi, c'est-à-dire un récepteur muscarinique modifié couplé à une protéine G inhibitrice, sous le promoteur GFAP, une protéine du cytosquelette exprimée en majorité dans les astrocytes. De plus, cette séquence porte le gène rapporteur de la mCitrine, une protéine fluorescente permettant de détecter les cellules infectées (rAAV8/GFAP-HA-Hm4D(Gi)-IRES-mCitrine, fournit par Virus Vector Core).

h) Injection des particules virales

Les animaux ont été anesthésiés par un mélange de kétamine-xylazine (80mg/kg-12mg/kg). La souris a été ensuite placée dans un cadre stéréotaxique. Une injection de lidocaïne a été effectuée au niveau du crâne. Puis le scalp a été incisé afin de libérer le haut de la boîte crânienne. Le haut du crâne a ensuite été percé par un mini foret de chaque côté de la suture sagittale et un nano-fil a été introduit dans ces trous afin d'injecter les particules virales dans l'hypothalamus médio-basal. Les coordonnées

d'injection sont les suivantes : 1.5 mm postérieur au bregma, 0.5 mm latéralement par rapport à la suture sagittale et 6 mm en profondeur. Les virus sont ensuite injectés à raison de 0.20 μ L/min pendant 5 minutes par côté à l'aide d'un micro-injecteur. Un délai de diffusion de 5 min a été respecté avant de retirer le nano-fil du crâne. Puis, le scalp a été suturé et les animaux ont reçu 300 μ L de kétoprofène (Ketofen) à une concentration de 5mg/kg.

i) Rétablissement des souris

Après l'opération les souris ont été surveillées quotidiennement sur une semaine. Le poids corporel a été suivi. Un jour après l'opération, les souris ont eu à disposition dans leur eau de boisson de l'ibuprofène afin de limiter l'inflammation au niveau cérébral. Après 7 jours, les animaux ont retrouvé un poids, une prise alimentaire et une activité similaires à la période préopératoire. Un temps supplémentaire de rétablissement de 3 à 4 semaines de plus a été planifié pour permettre l'atténuation de la réaction inflammatoire locale déclenchée par l'infection virale.

j) Injection de CNO

Afin d'habituer les animaux à l'injection et à la contention, les souris ont reçu une injection intrapéritonéale quotidienne de véhicule 3 jours avant le début de l'enregistrement du comportement alimentaire. Le CNO est préparé dans de l'eau à une concentration stock de 5mg/ml (20X). Il est ensuite dilué dans du NaCl pour obtenir une concentration finale de 1mg/kg (1X). Le CNO est administré 30 minutes avant l'extinction des lumières (100 μ l de solution 1X). Le comportement alimentaire est enregistré sur toute la période nocturne (Figure 24). Les injections de NaCl et de CNO ont été faites de manière alternée 3 fois de suite pour chaque animal, afin que l'animal soit son propre contrôle.

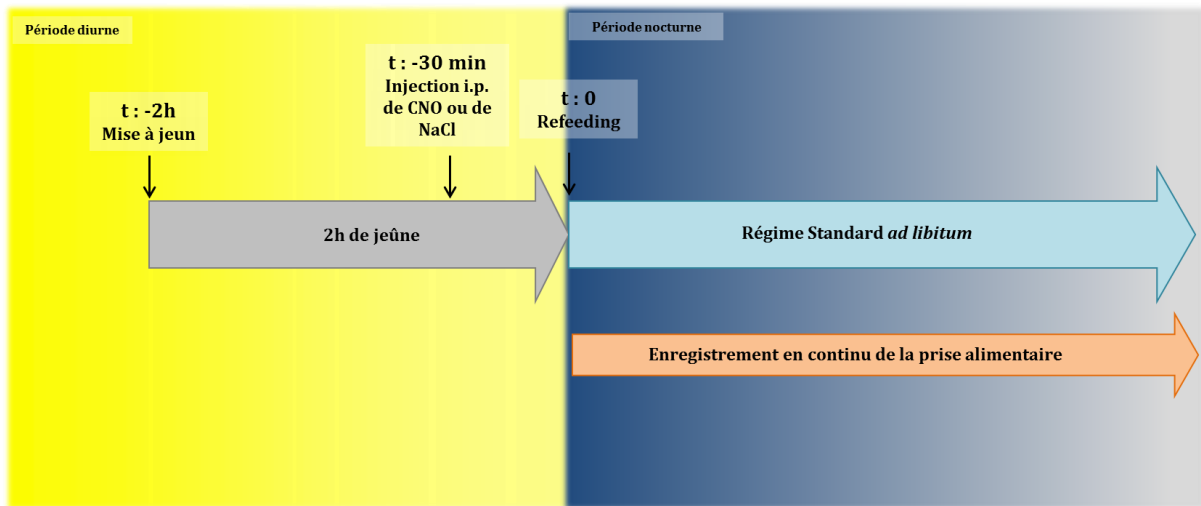


Figure 25 : Représentation schématique de la procédure d'injection de CNO et d'enregistrement du comportement alimentaire

4) Microscopie électronique

La morphologie des astrocytes et les structures synaptiques en périphérie des neurones POMC ont été étudiées d'après les mêmes procédures que celles des études précédentes, dans la lignée POMC-Tomato. L'administration de CNO a lieu 30 minutes avant l'extinction des lumières. Les animaux sont sacrifiés en condition 1h-SD (Figure 25).

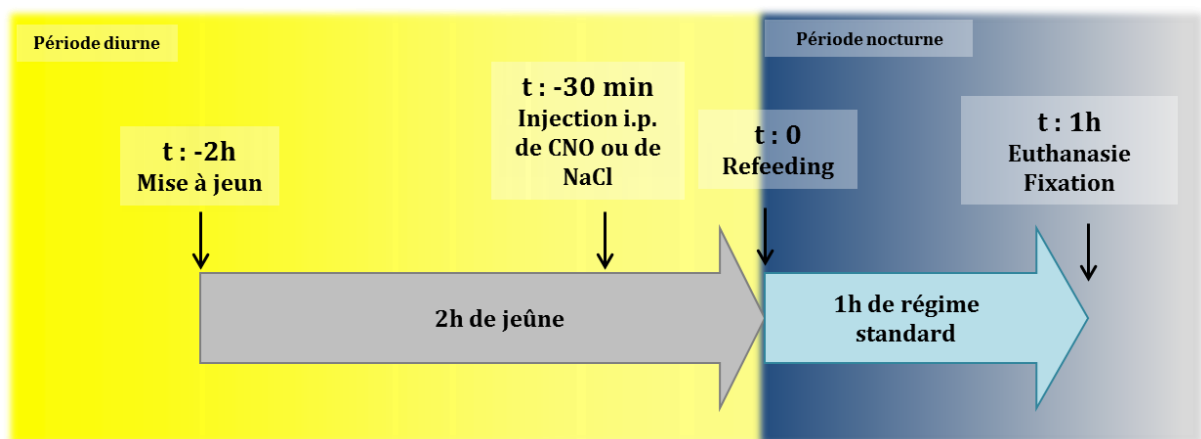


Figure 26 : Représentation schématique de la procédure d'injection de CNO avant analyse en microscopie électronique

3. Résultats

1) Inactivation des astrocytes via les DREADD et comportement alimentaire

Nous nous sommes ensuite posé la question de savoir si une manipulation de l'astrocyte pouvait conduire à des modifications de comportement alimentaire. Nous avons donc mis en place une approche en pharmacogénétique, en faisant exprimer par les astrocytes du noyau arqué un récepteur DREADD inhibiteur.

L'administration de CNO chez les souris C57BL6J exprimant le DREADD inhibiteur Hm4d-Gi dans les astrocytes induit un comportement alimentaire différent des mêmes souris opérées, injectées en i.p. avec du NaCl (Figure 26).

Au bout de 6h après remise à disposition de la nourriture, le traitement au CNO induit des *bouts* sont plus longs (NaCl : 132.5 ± 16.38 s/*bout* versus CNO : 298.4 ± 27.17 s/*bout*, N=7 souris, *** : $p=0.0002$) (Figure 26C).

L'injection de CNO induit également des *bouts* plus importants en termes de nourriture consommée (NaCl : 0.0657 ± 0.006 g/*bout* versus CNO : 0.0843 ± 0.004 g/*bout*, N=7 souris, * : $p= 0.0107$) (Figure 26D), malgré une prise alimentaire identique entre les deux groupes (NaCl : 1.893 ± 0.1627 g versus CNO : 1.931 ± 0.2335 g, N=7 souris) (Figure 26A).

De plus, une tendance à la diminution du nombre de *bouts* est observée après injection de CNO (NaCl : 28.86 ± 1.625 bouts versus CNO : 23.43 ± 2.983 bouts, N=7souris, $p=0.0577$) (Figure 26B).

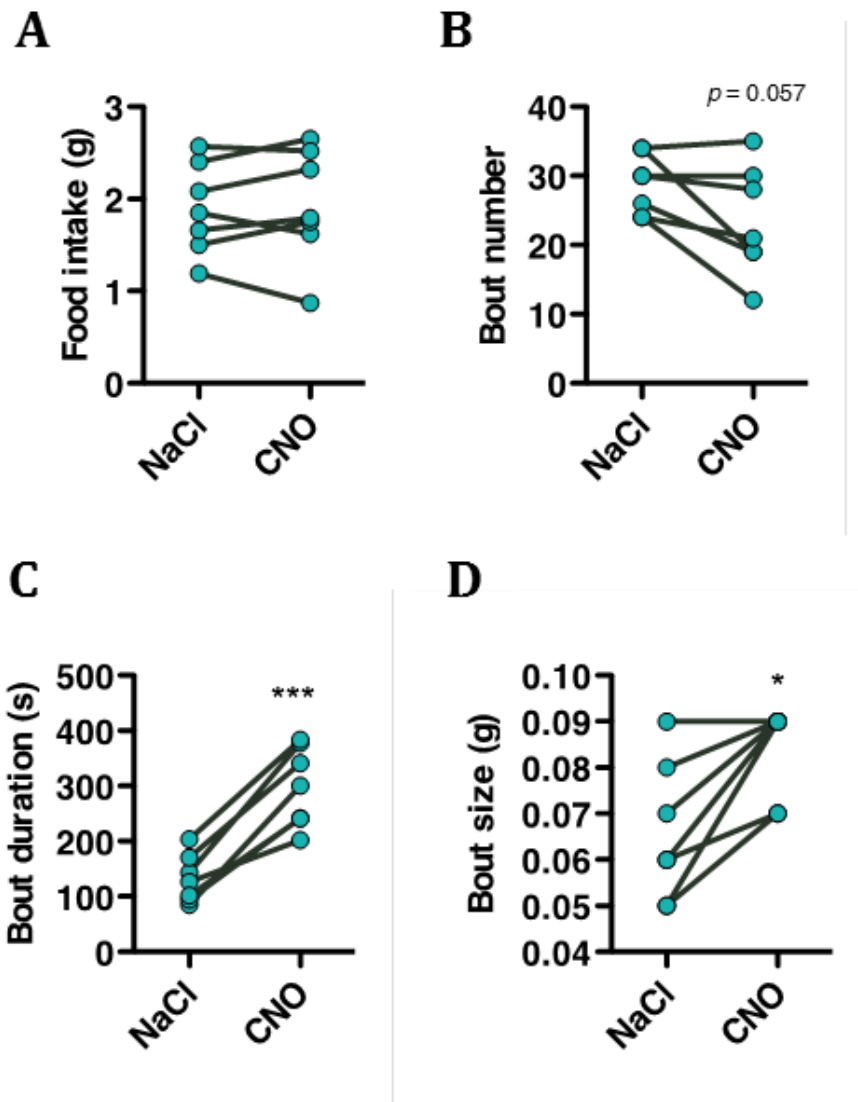


Figure 27 : Caractérisation de l'effet de l'inactivation par pharmacogénétique des astrocytes sur le comportement alimentaire au bout de 6h. **A** : Prise alimentaire globale en grammes ; **B** : Nombre de bouts ; **C** : Durée des bouts en seconde; **D** : Taille des bouts en grammes ; *** : $p=0.0002$, * : $p=0.0107$, $N=7$ souris.

2) Inactivation des astrocytes et plasticité astrocytaire et neuronale en périphérie des neurones POMC

Nous avons ensuite voulu savoir si ce comportement alimentaire au bout de 6h était précédé d'un remodelage neuronal et/ou astrocytaire autour des neurones POMC à 1h après remise à disposition de la nourriture.

Pour étudier cette plasticité nous avons utilisés les souris POMC-Tomato exprimant le DREADD inhibiteur hM4D-Gi dans les astrocytes.

Après administration de CNO, la couverture astrocytaire diminue de manière significative autour des neurones POMC : 1h-SD+NaCl : 24.22 ± 2.183 %, N=3 souris, n=11 neurones versus 1h-SD+CNO : 17.83 ± 1.469 %, N=3 souris, n=7 neurones ; * : $p=0.049$ (Figure 27).

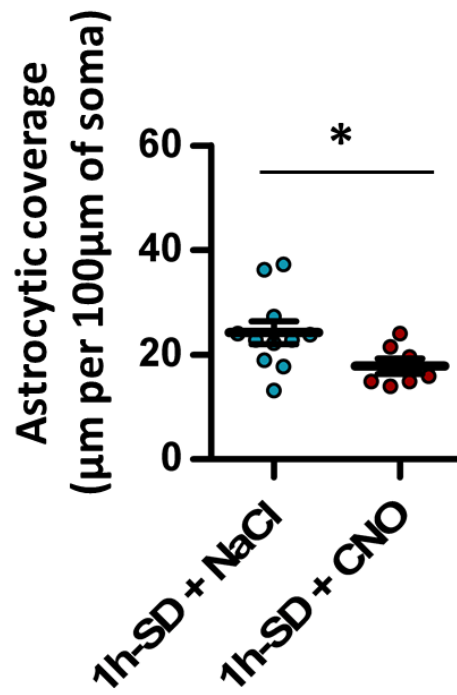


Figure 28 : Représentation graphique de la couverture astrocytaire sur les neurones POMC après inactivation des astrocytes par pharmacogénétique. Représentation graphique de la couverture astrocytaire en fonction du traitement exprimée en µm par 100µm de soma POMC. * : p=0.049

3) Nature du régime et comportement alimentaire

Dans un deuxième temps, nous voulions savoir si les remodelages astrocytaires observés dans nos deux situations post-prandiales sont corrélés à un comportement alimentaire différent. Nous avons réalisé une étude du comportement alimentaire sur la période nocturne en utilisant des souris de la lignée C57BL6J et des souris de la lignée POMC-Tomato.

Nous avons formé deux groupes de souris : 8 mâles C57BL6J et 4 mâles POMC-Tomato ont été soumis au régime standard et 6 mâles C57BL6J et 4 mâles POMC-Tomato ont été soumis au régime gras. Le comportement alimentaire a été enregistré par le système BioDag sur toute la période nocturne (Figure 28).

Les souris sous régime gras ont un nombre de *bouts* plus important durant la première heure nocturne (Figure 28A), malgré une consommation d'aliments équivalente (1h-SD : 8.833 ± 7.234 *bouts*/1h, N=12 *versus* 1h-HFD : 13.70 ± 1.407 *bouts*/1h, N=10 souris ; ** : $p=0.0042$). Cet effet sur le comportement alimentaire est pérenne dans le temps puisqu'au bout de 3h de consommation du régime gras, les souris sous régime gras présentent encore des *bouts* plus nombreux qu'en condition standard (3h-SD : 25.58 ± 2.503 *bouts*/3h, N=12 souris *versus* 3h-HFD : 37.33 ± 1.414 *bouts*/3h, N=10 souris ; ** : $p=0.0014$) (Figure 28 E)

De plus, les souris sous régime gras font des *bouts* de plus courte durée que les souris sous régime standard (1h-SD : 207.1 ± 34.05 s/*bout*, N=12 souris *versus* 1h-HFD : 59.79 ± 8.665 s/*bout*, N=10 ; *** : $p=0.0007$). Cet effet sur le comportement alimentaire perdure à 3h (3h-SD : 182.4 ± 28.91 s/*bout*, N=12 souris *versus* 3h-HFD : 78.15 ± 11.73 s/*bout*, N=10 souris ; ** : $p=0.0025$) (Figure 28C).

Nos résultats montrent que les souris sous régime gras ont un pattern comportemental différent des souris sous régime standard, quel que soit leur génotype (Figure 28 B, D, F, H).

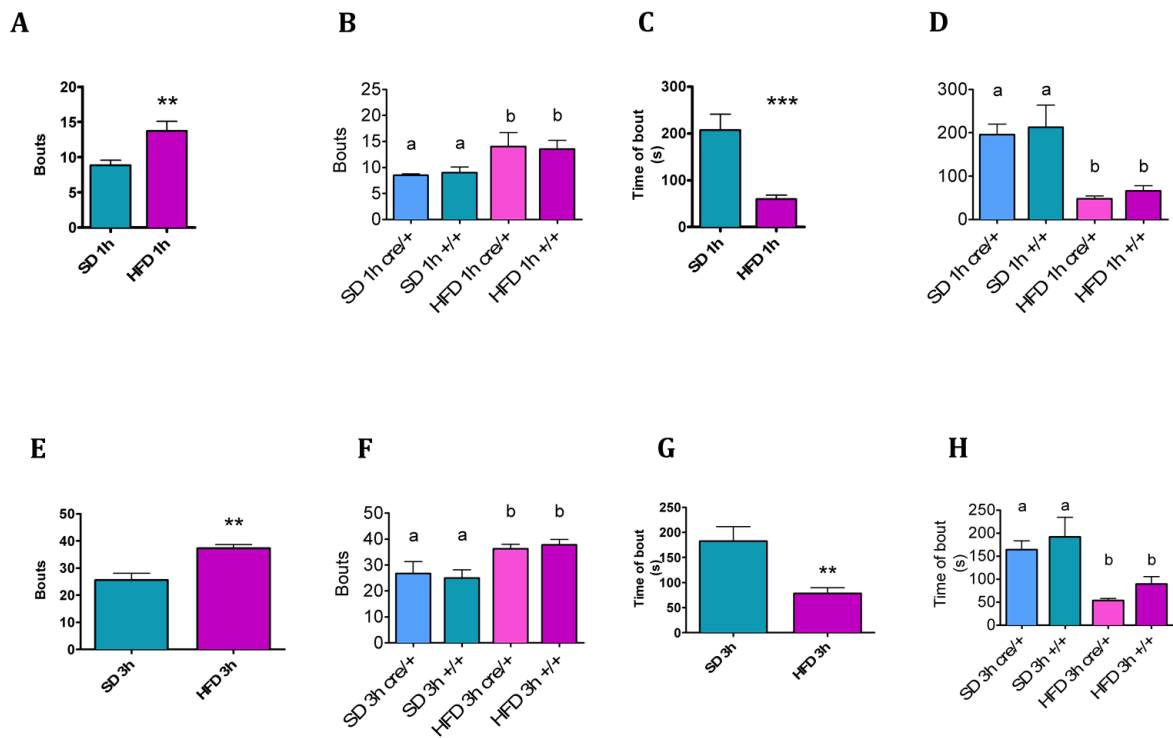


Figure 29 : Comportement alimentaire et nature du régime. A : Nombre de bouts sur une heure ; **B** : Nombre de bouts sur une heure selon le génotype ; **C** : Durée des bouts sur une heure en secondes **D** : Durée des bouts sur une heure selon le génotype en secondes ; **E** : Nombre de bouts sur 3 heures ; **F** : Nombre de bouts sur 3 heures selon le génotype ; **G** : Durée des bouts sur 3 heures en secondes ; **H** : Durée des bouts sur 3 heures selon le génotype en secondes. ** : $p < 0.005$, *** : $p < 0.0005$, a : significativement différent de b, b : significativement différent de a, cre/+ : lignée POMC-Tomato, +/+ : lignée C57BL6J.

4. Interprétation

Nous avons voulu tester si les astrocytes du noyau arqué pouvaient influencer le comportement alimentaire.

Nous avons utilisé une approche pharmacogénétique pour manipuler l'astrocyte avec l'utilisation des DREADD inhibiteurs exprimés spécifiquement sous promoteur GFAP. La liaison du CNO au récepteur DREADD-Gi entraîne une inactivation des astrocytes en agissant sur l'AMP cyclique intra cellulaire, les taux d'ions calcium et d'ions potassium. Cet effet est corrélé à un comportement alimentaire différent : en effet, au bout de 6h, les bouts sont plus longs et la consommation de nourriture pendant ces bouts est plus importante malgré une consommation d'aliment équivalente à celle observé sous condition contrôle. Cet effet est corrélé à des modifications de couverture astrocytaire autour des neurones POMC : en effet, la liaison du CNO sur le récepteur DREADD entraîne une diminution de la couverture astrocytaire, plus importante encore que celle observée dans la condition 1h-SD. La couverture astrocytaire autour des neurones POMC semble donc inversement corrélée à la satiété.

Sous régime gras, les souris font des *bouts* plus courts et plus nombreux que sous régime équilibré malgré une consommation totale d'aliment équivalente. Ce comportement est relié à une absence de remodelage astrocytaire et à un remodelage synaptique sur les neurones POMC. Cependant, le lien de cause à effet entre ces deux phénomènes est difficile à interpréter si l'on s'en tient à ce résultat. En effet, le régime gras de par sa palatabilité, sa texture et sa valeur hédonique et sensoriel pourrait à lui-même modifier le comportement alimentaire.

CONCLUSION GENERALE

1. Le système à mélanocortine présente des modifications à l'échelle des repas sans mettre en œuvre une plasticité synaptique

Nos résultats suggèrent que la plasticité synaptique n'est pas récapitulée à l'échelle des repas sous régime standard. En effet, malgré une augmentation d'activité électrique associée à une diminution du tonus inhibiteur appliqué aux neurones POMC, il n'y a pas de modification de densité synaptique ou de configuration synaptique à la surface de ces neurones. La synaptogénèse étant coûteuse pour l'organisme, on peut imaginer que dans cette situation physiologique, l'organisme met en œuvre d'autres mécanismes pour réguler l'activité des neurones POMC dans la condition régime standard. Il est finalement probable qu'à chaque repas, les circuits modifient leur configuration synaptique.

2. Les astrocytes du noyau arqué présentent une plasticité en fonction de l'état prandial, liée à l'hyperglycémie post-prandiale.

Nos résultats montrent que les astrocytes sont capables de modifier leur morphologie en fonction de l'état prandial. Une réactivité astrocytaire accrue, matérialisée par une augmentation de la surface de marquage GFAP dans les deux états post-prandiaux, montre que les astrocytes peuvent s'activer en fonction de l'état prandial. De plus, cette activation est corrélée à des changements d'interaction entre les astrocytes et les neurones POMC. En effet, dans l'état 1h-SD, la couverture astrocytaire en périphérie des neurones POMC diminue.

Cependant, les mécanismes moléculaires sous-tendant ces modifications morphologiques sont encore inconnus. Dans nos études, nous avons choisi de bloquer de façon pharmacologique l'absorption du glucose au niveau intestinal et rénal dans la situation 1h-SD, qui présente un pic de glucose post-prandial, afin d'observer les répercussions de ce blocage sur les interactions astrocyte-neurone POMC. Nous avons trouvé que le blocage du pic post-prandial de glucose entraîne une diminution de la

couverture gliale en périphérie des neurones POMC ce qui suggère que le glucose pourrait être le signal déclenchant de cette plasticité astrocytaire en périphérie des neurones POMC.

3. Un repas hyper-lipidique ne modifie pas l'activité du neurone POMC et ne déclenche pas de retraction gliale post-prandial mais induit une plasticité synaptique

Notre étude montre qu'une courte exposition à un régime gras entraîne des modifications du système à mélanocortine qui sont différentes de celles rencontrées en condition standard. En effet, l'exposition à un régime hyperlipidique n'entraîne pas d'activation des neurones POMC, mais induit un remodelage synaptique montrant une augmentation des synapses excitatrices sur les corps cellulaires POMC. De plus, cette situation inédite pour l'animal ne s'accompagne pas de modification d'interaction astrocyte-neurone POMC malgré une activation astrocytaire de façon générale, dans le noyau arqué. Puisque l'activité électrique des neurones POMC n'est pas modifiée, on peut supposer que ce remodelage synaptique n'est pas encore opérationnel. Il pourrait le devenir à plus long terme si le régime se poursuit. En effet, il a été montré qu'après trois jours de régime hyper-lipidique, le tonus exciteur sur les neurones POMC est plus important et correspond à une réponse physiologique pour limiter la prise énergétique (Benani et al. 2012).

Nos résultats montrent également que dans cette condition, le comportement alimentaire est modifié : les souris font des prises alimentaires ponctuelles plus courtes et plus nombreuses. Ce comportement peut être interprété comme du grignotage et suggère que le régime hyperlipidique serait moins satiétogène, et/ou que la valeur sensorielle de l'aliment pourrait également induire ce comportement différent, mais aussi que les remodelages gliaux différentiels observés en périphérie des neurones POMC entre régime standard et régime hyperlipidique pourraient avoir une répercussion directe sur le comportement alimentaire.

4. La manipulation pharmacogénétique des astrocytes du noyau arqué modifie le comportement alimentaire et les interactions neurone POMC-astrocyte

Afin de vérifier le lien de cause à effet entre remodelage astrocytaire en périphérie des neurones POMC et le comportement alimentaire, nous avons effectué une étude du comportement suite à une manipulation de l'astrocyte. Nous avons choisi une approche pharmacogénétique d'inactivation des astrocytes en utilisant un récepteur DREADD inhibiteur liant le ligand exogène CNO, exprimé sous le récepteur GFAP. Nous avons montré que l'injection de CNO provoque un pattern comportemental différent de la condition contrôle au bout de 6h : les souris font des prises alimentaires ponctuelles de durée plus longue et consomment plus de nourriture pendant ces prises, malgré une prise alimentaire globale équivalente à la condition contrôle. De plus ce changement de comportement semble être précédé d'un remodelage astrocytaire et synaptique sur les neurones POMC à 1h après remise à disposition de la nourriture standard. Ces résultats suggèrent qu'un lien de cause à effet pourrait exister entre le comportement alimentaire et le remodelage astrocytaire en périphérie des neurones POMC.

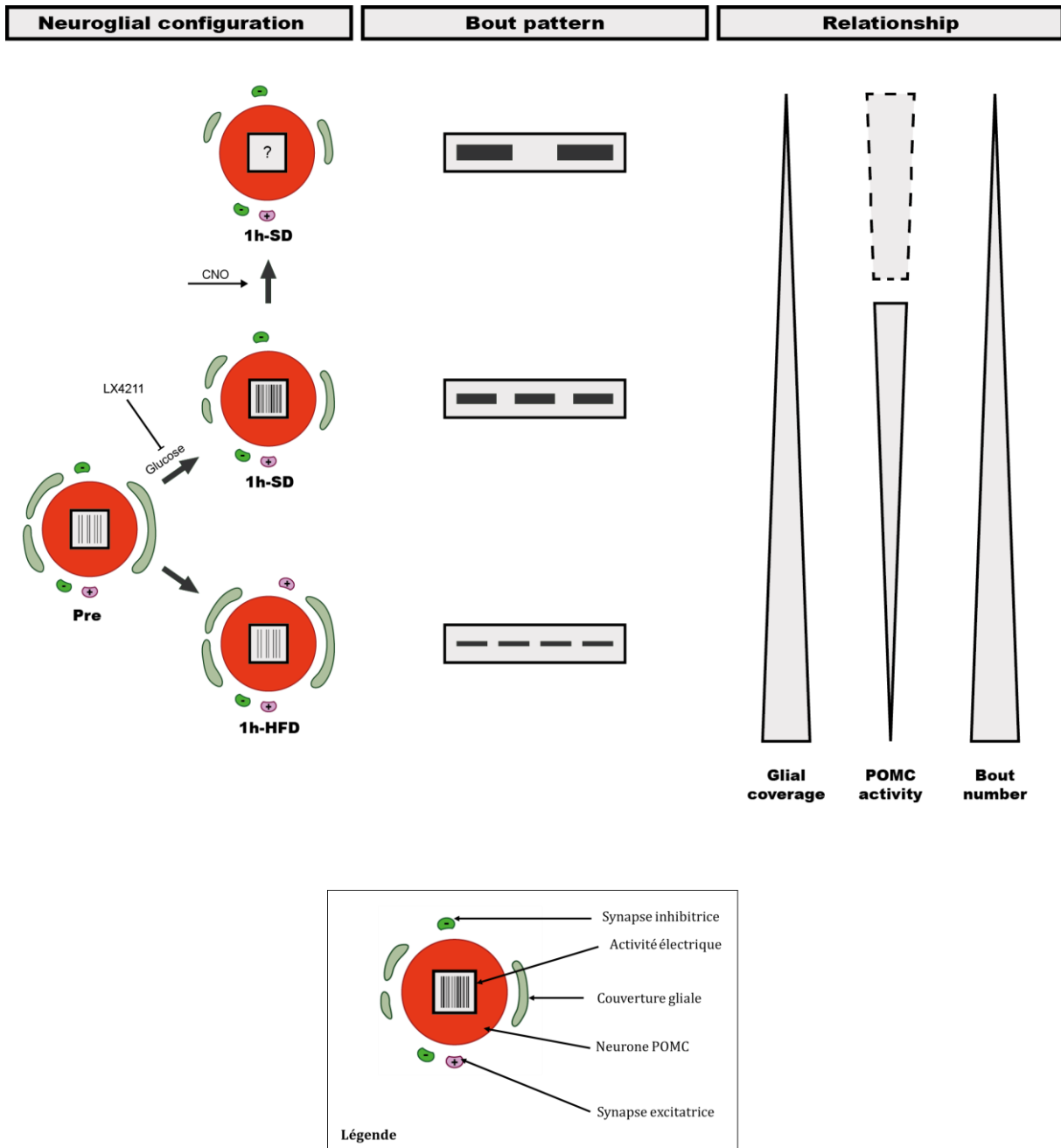


Figure 30 : Résumé graphique des résultats obtenus dans les études 2, 3, 4 et 5.

DISCUSSION

Nous avons développé un modèle expérimental permettant d'étudier des états prandiaux différents. En effet, chez la souris, le comportement alimentaire est tel qu'il ne présente pas de repas à proprement parler. Dans la littérature, l'analyse des repas chez la souris est déterminée par un regroupement de *bouts* selon des paramètres arbitraires de consommation ou encore d'intervalle entre *bouts* (Gotthardt and Bello 2017). De plus aucune modélisation de l'état prandial n'est référencée à ce jour, et cela est sans doute lié à la variabilité inter- et intra-individuelle du comportement alimentaire : en effet, une même souris peut avoir un comportement différent d'un jour à l'autre. Au début de ce projet, nous avons cherché en vain les caractéristiques d'un repas chez la souris, en prenant également en compte la prise hydrique. C'est pourquoi nous avons défini les états prandiaux de façon arbitraire. En revanche chez le rat, le comportement alimentaire est un comportement bien défini qui présente de longues périodes de non-alimentation et de séquences de prise alimentaire caractérisé par des comportements stéréotypés de *grooming* ou nettoyage (Le Magnen et Devos, 1969 ; Strubbe et Woods 2004).

Nous n'avons pas observé de variations hormonales en situation post-prandiale dans le modèle expérimental et cela, quel que soit le régime. Ces résultats suggèrent que les concentrations hormonales plasmatiques sont relativement stables chez la souris à cette échelle de temps. Toutefois, il n'est pas exclu que des fluctuations hormonales brèves à des temps plus courts interviennent, au moins pour l'insuline, en réponse à l'hyperglycémie post-prandiale. En effet, concernant la leptine, les fluctuations sont visibles à une échelle de temps plus longue et dépendante des phases d'activité (période nocturne) et de repos (période diurne).

Si l'on savait que l'activité des neurones POMC et des neurones AgRP est dépendante de l'état métabolique mais aussi des hormones telles que la leptine, l'insuline et la ghréline et du glucose, en revanche c'est la première fois qu'une variation d'activité électrique des neurones POMC dépendante de l'état nutritionnel est observée à des temps aussi court qu'une heure. Cette variation d'activité ne semble pas liée aux hormones, si on tient compte des taux mesurés à une heure, mais pourrait être liée à

l'hyperglycémie post-prandiale. Cette hypothèse est supportée par le fait que le régime gras, appliqué pendant une heure n'induit pas de pic de glucose post-prandial et cette observation est corrélée à une non-activation des neurones POMC à une heure. Ces observations suggèrent que l'hyperglycémie transitoire visible à 20 minutes post-prandiales, et qui disparaît à 40 minutes et 60 minutes post-prandiales, aurait soit des effets retardés ou soit des effets initiés rapidement mais qui perdurent dans le temps sur l'activité électrique des neurones POMC. Ainsi, il n'est pas exclu que cette hyperglycémie brève ait provoqué un remodelage glial rapide, dont les effets perdureraient dans le temps afin de réguler l'activité observée à une heure.

Nous n'avons pas observé de modification de l'activité électrique des neurones AgRP dans la condition post-prandiale 1h-SD, ce qui est surprenant car souvent, les neurones AgRP et les neurones POMC fonctionnent en opposition. Si l'on considère que le modèle transgénique AgRP-Tomato permet de visualiser l'ensemble des neurones AgRP, alors ce résultat pourrait être lié à une hétérogénéité dans la population AgRP (Betley et al. 2013). Toutefois, il a été montré que les neurones AgRP intègrent non seulement le statut métabolique mais aussi les signaux hédoniques et environnementaux pour ajuster la prise alimentaire. Ainsi, on peut imaginer que notre paradigme expérimental et que l'habituation de nos souris à la restriction alimentaire pourrait déclencher une activation des neurones AgRP qui se désactiveraient dès le signal de réalimentation (expérimentateur, ouverture des mangeoires), malgré le fait que l'animal soit en situation de balance énergétique négative, ce qui confirmerait le rôle anticipatoire des neurones AgRP sur le contrôle de la prise alimentaire (Chen et al. 2015).

Généralement, les courants miniatures reflètent le tonus présynaptique reçu par les neurones. Nous observons que le tonus inhibiteur reçu par les neurones POMC diminue dans la condition post-prandiale standard. Cela suggère qu'une levée de l'inhibition des neurones POMC a lieu dans cette condition post-prandiale. Or, nous n'avons pas décelé de modifications structurales dans cette condition expérimentale en ce qui concerne la configuration synaptique des neurones POMC : en effet, il n'y a pas de modifications en nombre et en nature des synapses somatiques. Si l'on considère que cette configuration synaptique somatique reflète l'ensemble des synapses reçues par le neurone POMC, alors les résultats suggèrent que les modifications de courants miniatures ne traduisent pas une plasticité synaptique mais intègre d'autres facteurs modulateurs extrinsèques

tels que la modulation gliale. En effet, on observe une rétractation astrocytaire post-prandiale concomitante à l'augmentation de l'activité POMC et à la diminution du tonus inhibiteur reçu. En effet, les astrocytes sont capables de moduler la transmission synaptique i) de façon physique, en limitant l'accès du neurone aux synapses en périphérie, ii) de façon neurochimique en sécrétant des gliotransmetteurs tels que l'adénosine ou la d-sérine, en recaptant des neurotransmetteurs, comme le glutamate, au niveau de la fente synaptique iii) et de façon métabolique en agissant sur le métabolisme neuronal par exemple en limitant le passage de nutriments comme le lactate aux neurones avoisinants. Ainsi, en situation post-prandiale standard, la rétractation astrocytaire pourrait entraîner :

- Une levée de l'inhibition directe de l'astrocyte sur le neurone par exemple via la sécrétion de GABA d'origine astrocytaire (Figure 30)
- Une diminution de la recapture du glutamate au niveau des synapses excitatrices déjà en place sur le soma (Figure 31)
- Ou encore une modulation physique de l'espace inter-synaptique qui pourrait permettre de concentrer ou au contraire de diluer les neurotransmetteurs sécrétés dans cet espace.

Si l'on exclut les hormones, le glucose semble être le signal déclencheur possible de la plasticité gliale observé. Par une approche pharmacologique, nous avons bloqué au niveau périphérique le pic de glucose postprandial et nous avons observé que dans cette situation, la couverture astrocytaire est maintenue et non plus rétractée autour des somas POMC. Cela suggère que le pic postprandial de glucose serait nécessaire pour entraîner un remodelage astrocytaire en périphérie des neurones POMC. Si c'est le cas, c'est la première fois qu'un nutriment est identifié comme un signal déclencheur d'une plasticité neurogliale affectant les neurones POMC. Cela n'est pas improbable. En effet, il a été montré que le glucose pouvait influencer un autre type de plasticité gliale, celle rencontrée dans les tanocytes en fonction du statut métabolique (Langlet et al. 2013). Cela dit, une injection intrapéritonéale de glucose ne provoquait pas de remodelage glial. Cependant, ce bolus de glucose est administré après un jeûne de 12h, dans une situation où les concentrations plasmatiques en hormones peuvent varier de façon drastique et masquer les effets du glucose. De plus, selon la même étude, un effet de rétractation astrocytaire suite à une injection intrapéritonéale de glucose ne serait visible qu'après

une ablation génétique du récepteur à l'insuline spécifiquement dans les astrocytes. Qui qu'il en soit ces résultats indiquent que la rétractation astrocytaire est dépendante de la signalisation de l'insuline (García-Cáceres et al. 2016).

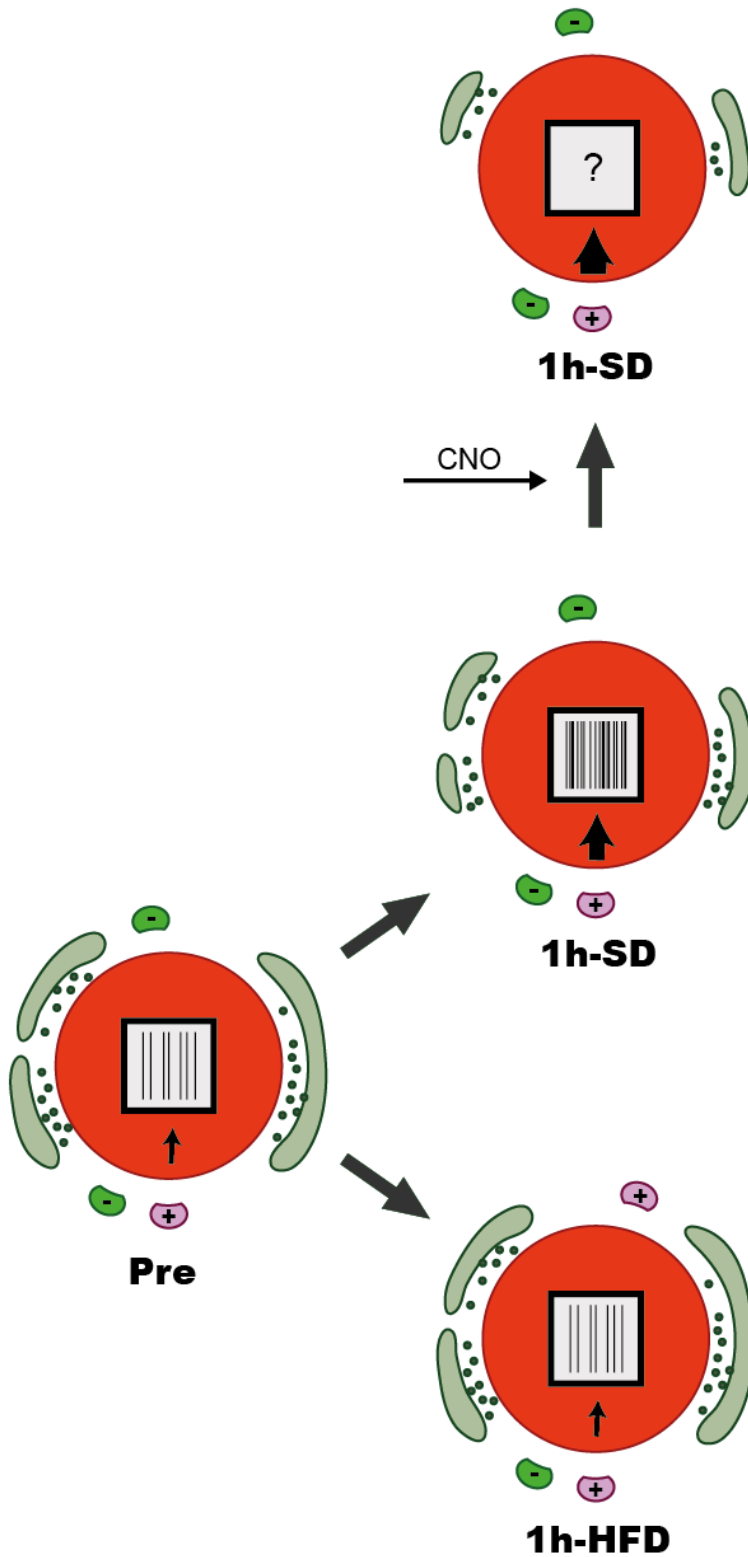
Enfin nous avons cherché à déterminer l'implication de ces phénomènes de plasticité astrocytaire dans la modulation du comportement alimentaire. Par une approche pharmacogénétique, utilisant un récepteur DREADD inhibiteur exprimé spécifiquement dans les astrocytes, nous avons montré qu'au bout de 6h, le traitement au ligand CNO provoque une modification du comportement alimentaire. En effet, après administration du CNO, les souris font des prises alimentaires de durée plus longue et plus importantes en masse avec une tendance à diminuer ces prises par rapport aux souris injectées avec du véhicule. Dans la littérature, de telles expériences de suivi du comportement alimentaire suite à l'activation et à l'inactivation des astrocytes par les DREADD ont été effectuées. Yang et ses collaborateurs ont montré que l'inactivation des astrocytes ne modifie pas la prise alimentaire cumulée sur la période nocturne mais que cette inactivation influence la prise alimentaire médiée par les hormones telles que la ghréline et la leptine. Dans cette étude, l'activation des astrocytes provoque une augmentation de la prise alimentaire en début de période nocturne et module également la réponse comportementale à la ghréline et à la leptine (Yang et al. 2015). Cependant, ces études n'ont pas exploré le comportement alimentaire en termes de rythme de consommation de l'aliment et les études des réponses aux hormones ont été effectuées dans des paradigmes de restriction alimentaire prolongée et de réalimentation, situation dans laquelle, les hormones du métabolisme présentent de grandes variations. En parallèle, une deuxième étude utilisant les mêmes DREADD montrent des résultats différents : une activation des astrocytes par les DREADD induit une prise alimentaire plus importante, cette fois ci en début de période diurne (Chen et al. 2016). Les résultats distincts obtenus entre ces deux études seraient dû notamment aux doses différentes de CNO administrées. Selon Chen, une forte dose de 5mg/kg de CNO, comme utilisé par Yang et ses collaborateurs, pourrait induire une inhibition du comportement alimentaire. Dans notre étude nous avons choisi une dose intermédiaire de 1mg/kg afin de pallier à cette inhibition éventuelle, mais pouvant permettre une inactivation efficace des cellules ciblées par le DREADD(Gi). Dans les deux cas, l'activation astrocytaire semble favoriser la prise alimentaire. Nos résultats suggèrent que l'inactivation astrocytaire réduit le

grignotage et pourrait augmenter la satiété, ce qui finalement est cohérent avec les deux études précédentes.

Enfin, nous avons montré que les modifications du comportement alimentaire au bout de 6h, après inactivation des astrocytes était précédées à 1h d'un remodelage astrocytaire. Ce remodelage est caractérisé par une rétractation de la couverture astrocytaire autour des neurones POMC. A notre connaissance, aucune étude de ce type n'a encore été rapportée. Nous proposons donc un lien entre couverture gliale, activité du neurone POMC et satiété. Ainsi une forte couverture astrocytaire favoriserait la prise alimentaire (ex : situation pré-prandiale, 1h-HFD), ce qui serait lié à une activité POMC réduite. En situation post-prandiale, le glucose pourrait stopper l'activité astrocytaire, et limiter la couverture astrocytaire sur les neurones POMC, ce qui réduirait la prise alimentaire. Ce qui est corroboré par l'étude pharmacogénétique dans laquelle la retraction astrocytaire forcée sous CNO est associée à un nombre de prises alimentaires réduites. L'ensemble des observations est résumé dans la figure 29. Une meilleure compréhension des mécanismes de modifications morphologiques des astrocytes permettra d'élucider cette question qui émerge, à savoir quelle est l'implication réelle des astrocytes sur le comportement alimentaire et existe-t-il un lien de cause à effet entre plasticité gliale en périphérie des neurones du système à mélanocortine et comportement alimentaire.

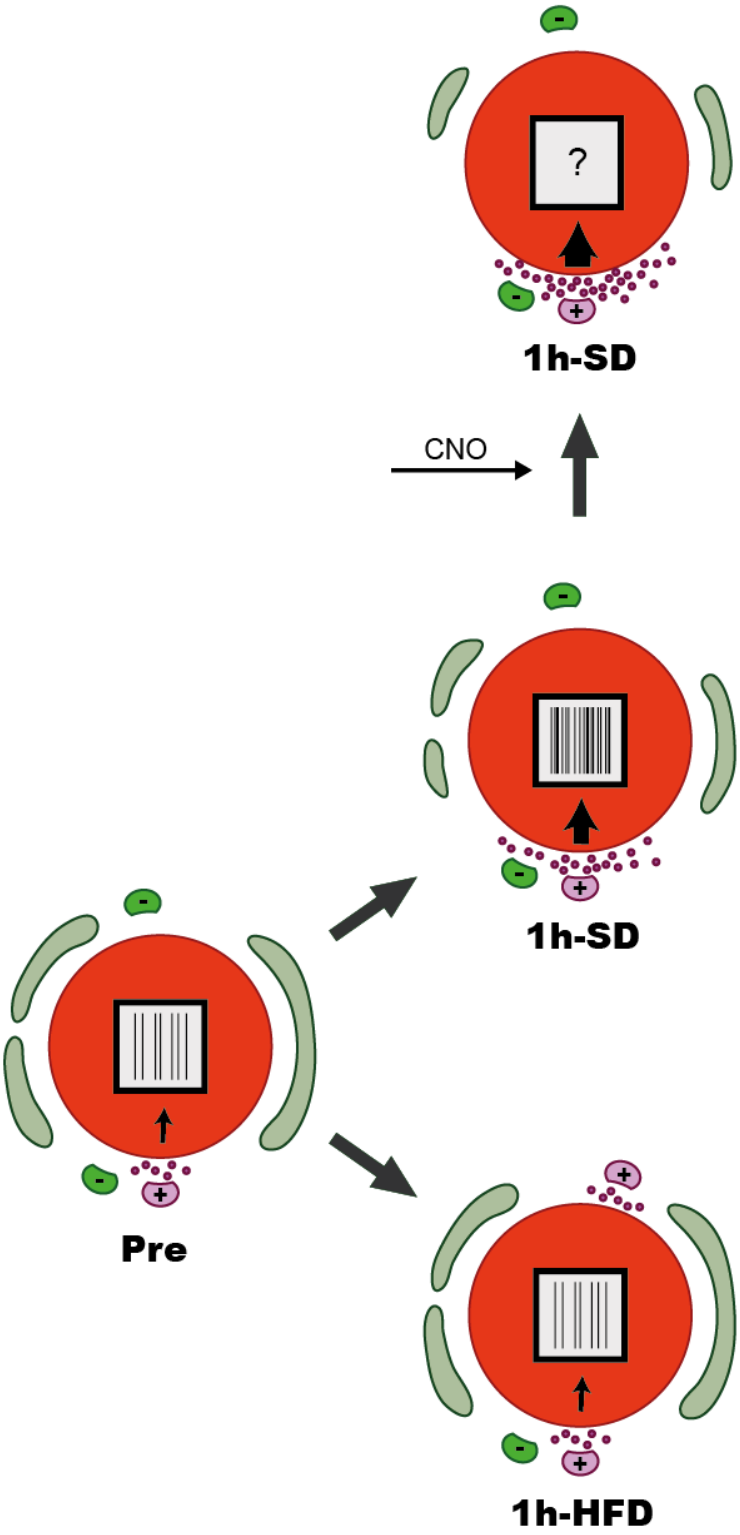
Direct glial inhibition

Figure 31: Représentation graphique de l'hypothèse de l'inhibition directe par l'astrocyte dans notre modèle d'étude.



Glutamate re-uptake

Figure 32 : Représentation graphique de l'hypothèse de la recapture du glutamate dans notre modèle d'étude.



PERSPECTIVES

Il convient dans un premier temps de conforter les résultats obtenus dans cette étude. En effet, l'étude la plasticité astrocytaire est basée sur une immunoréactivité globale et une appréciation morphologique des éléments astrocytaires sans identification. Nous proposons donc dans un premier temps d'étudier la plasticité structurale de l'astrocyte en micro-injectant *ex vivo* dans un astrocyte du noyau arqué (à proximité d'un neurone POMC identifié par l'expression de la Tomato) un marqueur fluorescent tel que la biocytine dans l'état pré-prandial et l'état post-prandial standard. La biocytine remplissant tout le corps cellulaire de la cellule, cela permettra une reconstruction en 3 dimensions de l'astrocyte (à proximité du neurone POMC) et permettra une étude morphométrique approfondie. Dans un deuxième temps, nous proposons une expérience d'électrophysiologie en patch-clamp sur l'astrocyte en mesurant la résistance membranaire, dont les variations peuvent indiquer une surface membranaire modifiée. Ces deux études *ex vivo* confirmeront la plasticité astrocytaire observée entre l'état pré-prandial et l'état post-prandial sous régime standard. Enfin nous proposons une étude *in vitro*, sur culture d'astrocyte primaire, qui consiste à visualiser la polymérisation et dépolymérisation du cytosquelette d'actine en fonction du temps après un traitement des cultures au glucose (technologie Live-actin, collaboration avec Clémence Blouet, Cambridge, UK). Cette expérience permettrait de conforter nos résultats obtenus dans l'étude 4 concernant le rôle possible du glucose sur la plasticité gliale. Nous souhaitons aussi observer les mécanismes d'inhibition directe de l'astrocyte sur le neurone POMC en bloquant par exemple, les récepteurs du gliotransmetteur Adénosine A₁ récepteur de façon pharmacologique. En aval de ces manipulations pharmacologiques nous proposons d'enregistrer les courants miniatures excitateurs et inhibiteurs afin de déterminer dans quelle proportion la cellule astrocytaire influence le tonus excitateur et inhibiteur reçus par les neurones POMC dans nos 3 situations prandiales.

Nous voudrions ensuite poursuivre la description du modèle expérimental. En effet, nous décrivons une variation d'activité électrique des neurones POMC associée à une plasticité astrocytaire en périphérie des somas POMC. Pour établir formellement le lien entre la cellule astrocytaire et l'activité des neurones POMC, nous proposons de caractériser par une approche pharmacologique associée à l'électrophysiologie le mode d'action des astrocytes sur les neurones POMC. Nous pensons par exemple bloquer le transporteur du glutamate Glt-1, qui est spécifique des astrocytes, afin d'observer si l'astrocyte régule l'activité POMC en modulant la recapture du glutamate.

Nous proposons ensuite de décrire la réactivité des astrocytes in situ et ex vivo dans nos 3 situations. Par une approche en imagerie calcique, nous allons mesurer les vagues de calcium suite à un stimulus de glucose. Cette approche sera effectuée sur la condition pré-prandial, situation où la couverture astrocytaire est élevée et permettra de poursuivre la description de l'action du glucose sur l'astrocyte du noyau arqué et sur sa réactivité cellulaire.

Pour aller plus loin, nous nous intéresserons également aux synapses non-somatiques, c'est-à-dire aux épines dendritiques. D'après Liu et ses collaborateurs, les neurones POMC semblent aspiniques, c'est-à-dire qu'ils présentent un nombre faible d'épines dendritiques comparés aux neurones AgRP (Liu et al. 2012). Nous proposons de confirmer ces résultats grâce au modèle transgénique POMC-Tomato, en analysant en microscopie confocale les épines dendritiques des neurones POMC dans notre modèle expérimental. Nous apporterons ainsi un paramètre de plasticité synaptique supplémentaire.

Enfin, nous souhaiterions mieux comprendre le mode d'action des DREADD inhibiteurs exprimés par pharmacogénétique dans les astrocytes. En effet, à ce jour, nous ne savons pas précisément quels sont les effets médiés par la liaison du DREADD(Gi) au CNO au niveau cellulaire dans les astrocytes. Théoriquement, la liaison du CNO sur les DREADD(Gi) inhibiteurs entraîne une diminution de l'AMP cyclique et de la concentration en ions Ca^{2+} . Cependant nous ne savons pas quelles en sont les conséquences pour l'astrocyte, c'est-à-dire, les conséquences morphologiques et structurales mais également les effets inhibiteurs ou même activateurs de ces variations sur la cellule. Pour évaluer ces effets, nous proposons d'étudier les voies de signalisations cellulaires in situ, en faisant par exemple un immunomarquage pour le

marqueur d'activation c-fos associé à un marquage GFAP afin de vérifier la pertinence de l'utilisation des DREADD pour manipuler l'astrocyte. Nous pouvons également entreprendre d'étudier la phosphorylation de la protéine Erk, qui est un marqueur d'activation astrocytaire, *in situ* en fonction de l'état prandial et du traitement LX4211.

Nous voulons également mieux comprendre les différences de remodelage glial sur le neurone POMC en fonction du régime. En effet, les remodelages observés sur les neurones POMC dans la condition 1h-HFD diffèrent de la condition standard par un maintien de la couverture astrocytaire associée à un recablage synaptique en faveur d'une augmentation du nombre de synapses excitatrices. Notre question est de savoir si ces phénomènes sont transitoires ou persistant dans le temps. Des résultats préliminaires suggèrent que la couverture astrocytaire après 3h d'exposition à un régime gras se rétracterait et reviendrait à des taux identiques à la condition 1h-SD (3h-HFD : 32.14 ± 3.168 % N=3 souris, n=16 neurones *versus* 1h-HFD : 42.72 ± 2.596 % N=3souris, n=21 neurones ; * : $p=0.019$). Il convient désormais d'analyser la configuration synaptique sur les somas POMC dans cette situation 3h-HFD. Pour compléter, nous étudierons les conséquences physiologiques de ces éventuels remodelages en mesurant l'activité électrique des neurones POMC par patch-clamp, en enregistrant notamment les courants miniatures excitateurs.

Enfin, nous voudrions déterminer le mode d'action du glucose sur le remodelage astrocytaire en périphérie des neurones POMC. En effet, après blocage de l'hyperglycémie post-prandiale nous observons un maintien de la couverture astrocytaire autour des neurones POMC. Or, nous voudrions savoir si l'action éventuelle du glucose serait dépendante ou non d'une détection directe par les astrocytes. Nous proposons de travailler sur un modèle transgénique qui présenterait une ablation du récepteur GLUT-2, transporteur du glucose impliqué dans sa détection, spécifiquement dans les astrocytes. Chez ce mutant, nous proposons de suivre des mécanismes de rétractation astrocytaire autour des neurones POMC dans nos états expérimentaux et également de mesurer l'activité électrique des neurones POMC.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N.Joan, Adjanie A. K. Patabendige, Diana E. M. Dolman, Siti R. Yusof, and David J. Begley. 2010. "Structure and Function of the Blood-Brain Barrier." *Neurobiology of Disease* 37(1):13–25. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>).
- André, Caroline et al. 2017. "Inhibiting Microglia Expansion Prevents Diet-Induced Hypothalamic and Peripheral Inflammation." *Diabetes* 66(4):908–19.
- Andrews, Zane B. et al. 2008. "UCP2 Mediates Ghrelin's Action on NPY/AgRP Neurons by Lowering Free Radicals." *Nature* 454(7206):846–51. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07181>).
- Aponte, Yexica, Deniz Atasoy, and Scott M. Sternson. 2011. "AGRP Neurons Are Sufficient to Orchestrate Feeding Behavior Rapidly and without Training." *Nature Neuroscience* 14(3):351–55. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.2739>).
- Araque, Alfonso, Vladimir Parpura, Rita P. Sanzgiri, and Philip G. Haydon. 1999. "Tripartite Synapses: Glia, the Unacknowledged Partner." *Trends in Neurosciences* 22(5):208–15.
- Argente-Arizn, Pilar, Alejandra Freire-Regatillo, Jesús Argente, and Julie A. Chowen. 2015. "Role of Non-Neuronal Cells in Body Weight and Appetite Control." *Frontiers in Endocrinology* 6(MAR).
- Atasoy, Deniz, J.Nicholas Betley, Helen H. Su, and Scott M. Sternson. 2012. "Deconstruction of a Neural Circuit for Hunger." *Nature* 488(7410):172–77. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11270>).
- Auestad, Nancy, Rose A. Korsak, Jack W. Morrow, and John Edmond. 1991. "Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis by Astrocytes in Primary Culture." *Journal of Neurochemistry* 56(4):1376–86.
- Bagnol, D. et al. 1999. "Anatomy of an Endogenous Antagonist: Relationship between Agouti-Related Protein and Proopiomelanocortin in Brain." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 19(August 2016):RC26.
- Balland, Eglantine et al. 2014. "Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain." *Cell Metabolism* 19(2):293–301.
- Balthasar, Nina et al. 2005. "Divergence of Melanocortin Pathways in the Control of Food Intake and Energy Expenditure." *Cell* 123(3):493–505.
- Benani, A. et al. 2012. "Food Intake Adaptation to Dietary Fat Involves PSA-Dependent Rewiring of the Arcuate Melanocortin System in Mice." *Journal of Neuroscience* 32(35):11970–79. Retrieved (<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0624-12.2012>).

- Bennett, Michael V. L., Jorge E. Contreras, Feliksas F. Bukauskas, and Juan C. Sáez. 2003. "New Roles for Astrocytes: Gap Junction Hemichannels Have Something to Communicate." *Trends in Neurosciences* 26(11):610–17.
- Benoit, Stephen C. et al. 2002. "The Catabolic Action of Insulin in the Brain Is Mediated by Melanocortins." *The Journal of Neuroscience* 22(20):9048–52.
- Bergles, Dwight E., J. David B. Roberts, Peter Somogyi, and Craig E. Jahr. 2000. "Glutamatergic Synapses on Oligodendrocyte Precursor Cells in the Hippocampus." *Nature* 405(6783):187–91. Retrieved December 18, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10821275>).
- Berglund, Eric D. et al. 2012. "Direct Leptin Action on POMC Neurons Regulates Glucose Homeostasis and Hepatic Insulin Sensitivity in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 122(3):1000–1009.
- Berthoud, Hans-Rudolf. 2002. "Multiple Neural Systems Controlling Food Intake and Body Weight." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26(4):393–428. Retrieved December 18, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12204189>).
- Berthoud, Hans Rudi. 2005. "Brain, Appetite and Obesity." *Physiology and Behavior*, 1–2.
- Betley, J. Nicholas et al. 2015. "Neurons for Hunger and Thirst Transmit a Negative-Valence Teaching Signal." *Nature* 521(7551):180–85. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature14416>).
- Betley, J. Nicholas, Zhen Fang Huang Cao, Kimberly D. Ritola, and Scott M. Sternson. 2013. "Parallel, Redundant Circuit Organization for Homeostatic Control of Feeding Behavior." *Cell* 155(6):1337–50.
- De Biase, L. M., A. Nishiyama, and D. E. Bergles. 2010. "Excitability and Synaptic Communication within the Oligodendrocyte Lineage." *Journal of Neuroscience* 30(10):3600–3611. Retrieved December 18, 2017 (<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.6000-09.2010>).
- Blazquez, C., A. Woods, M. L. de Ceballos, D. Carling, and M. Guzman. 1999. "The AMP-Activated Protein Kinase Is Involved in the Regulation of Ketone Body Production by Astrocytes." *J Neurochem* 73(4):1674–82. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501215>).
- Block, Michelle L., Luigi Zecca, and Jau-Shyong Hong. 2007. "Microglia-Mediated Neurotoxicity: Uncovering the Molecular Mechanisms." *Nature Reviews Neuroscience* 8(1):57–69. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn2038>).
- Bouyakdan, Khalil et al. 2015. "A Novel Role for Central ACBP/DBI as a Regulator of Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Astrocytes." *Journal of Neurochemistry* 133(2):253–65.
- Boyles, J. K., R. E. Pitas, E. Wilson, R. W. Mahley, and J. M. Taylor. 1985. "Apolipoprotein E Associated with Astrocytic Glia of the Central Nervous System and with Nonmyelinating Glia of the Peripheral Nervous System." *Journal of Clinical Investigation* 76(4):1501–13.

- Bray, G. A. and D. A. York. 1979. "Hypothalamic and Genetic Obesity in Experimental Animals: An Autonomic and Endocrine Hypothesis." *Physiological Reviews* 59(3):719–809. Retrieved December 18, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/379887>).
- Buckman, Laura B. et al. 2015. "Evidence for a Novel Functional Role of Astrocytes in the Acute Homeostatic Response to High-Fat Diet Intake in Mice." *Molecular Metabolism* 4(1):58–63.
- Butler, A. A. et al. 2001. "Melanocortin-4 Receptor Is Required for Acute Homeostatic Responses to Increased Dietary Fat." *Nat Neurosci* 4(6):605–11. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369941>).
- Butler, Andrew A. et al. 2000. "A Unique Metabolic Syndrome Causes Obesity in the Melanocortin-3 Receptor-Deficient Mouse." *Endocrinology* 141(9):3518–21.
- Butler, Andrew A. 2006. "The Melanocortin System and Energy Balance." *Peptides* 27(2):281–90.
- Cardinal, Pierre et al. 2015. "Cannabinoid Type 1 (CB1) Receptors on Sim1-Expressing Neurons Regulate Energy Expenditure in Male Mice." *Endocrinology* 156(2):411–18.
- Cardinal, Pierre et al. 2014. "CB1 Cannabinoid Receptor in SF1-Expressing Neurons of the Ventromedial Hypothalamus Determines Metabolic Responses to Diet and Leptin." *Molecular Metabolism* 3(7):705–16.
- Carter, Matthew E., Marta E. Soden, Larry S. Zweifel, and Richard D. Palmiter. 2013. "Genetic Identification of a Neural Circuit That Suppresses Appetite." *Nature* 503(7474):111–14. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12596>).
- Challis, B. G. et al. 2004. "Mice Lacking pro-Opiomelanocortin Are Sensitive to High-Fat Feeding but Respond Normally to the Acute Anorectic Effects of Peptide-YY3-36." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(13):4695–4700. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0306931101>).
- Chen, Airu S. et al. 2000. "Inactivation of the Mouse Melanocortin-3 Receptor Results in Increased Fat Mass and Reduced Lean Body Mass." *Nature Genetics* 26(1):97–102. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10973258http://www.nature.com/ng/journal/v26/n1/pdf/ng0900_97.pdf).
- Chen, Naiyan et al. 2016. "Direct Modulation of GFAP-Expressing Glia in the Arcuate Nucleus Bi-Directionally Regulates Feeding." *eLife* 5(OCTOBER2016).
- Chen, Yiming, Yen Chu Lin, Tzu Wei Kuo, and Zachary A. Knight. 2015. "Sensory Detection of Food Rapidly Modulates Arcuate Feeding Circuits." *Cell* 160(5):829–41.
- Cheung, Clement C., Donald K. Clifton, and Robert A. Steiner. 1997. "Proopiomelanocortin Neurons Are Direct Targets for Leptin in the Hypothalamus." *Endocrinology* 138(10):4489–92.

- Ciofi, Philippe. 2011. "The Arcuate Nucleus as a Circumventricular Organ in the Mouse." *Neuroscience Letters* 487(2):187–90.
- Clarke, Laura E. and Ben A. Barres. 2013. "Emerging Roles of Astrocytes in Neural Circuit Development." *Nature Reviews Neuroscience* 14(5):311–21. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrn3484>).
- Collin, Maria et al. 2003. "Plasma Membrane and Vesicular Glutamate Transporter mRNAs/proteins in Hypothalamic Neurons That Regulate Body Weight." *European Journal of Neuroscience* 18(5):1265–78.
- Cone, Roger D. 2005. "Anatomy and Regulation of the Central Melanocortin System." *Nature Neuroscience* 8(5):571–78. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nn1455>).
- Cota, Daniela et al. 2006. "Hypothalamic mTOR Signaling Regulates Food Intake." *Science (New York, N.Y.)* 312(5775):927–30. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16690869>).
- Cota, Daniela et al. 2003. "The Endogenous Cannabinoid." *The Journal of Clinical Investigation* 112(3):423–31. Retrieved (<http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/jc.2014-3455><http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.11.009><http://www.nature.com/doi/10.1038/nutd.2015.1><http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.001>[http://dx.doi.org/10.1016/S0083-6729\(09\)](http://dx.doi.org/10.1016/S0083-6729(09))).
- Cowley, M. a et al. 2001. "Leptin Activates Anorexigenic POMC Neurons through a Neural Network in the Arcuate Nucleus." *Nature* 411(6836):480–84.
- Cowley, Michael A. et al. 1999. "Integration of Npy, Agrp, and Melanocortin Signals in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus: Evidence of a Cellular Basis for the Adipostat." *Neuron* 24(1):155–63.
- Cristiano, L., A. Cimini, S. Moreno, A. M. Ragnelli, and M. Paola Cerù. 2005. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and Related Transcription Factors in Differentiating Astrocyte Cultures." *Neuroscience* 131(3):577–87.
- Cristino, L. et al. 2013. "Obesity-Driven Synaptic Remodeling Affects Endocannabinoid Control of Orexinergic Neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110(24):E2229–38. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1219485110>).
- Dagon, Yossi et al. 2012. "P70S6 Kinase Phosphorylates AMPK on Serine 491 to Mediate Leptin's Effect on Food Intake." *Cell Metabolism* 16(1):104–12.
- Dalmau, Ishar et al. 1997. "Development of Microglia in the Prenatal Rat Hippocampus." *Journal of Comparative Neurology* 377(1):70–84.
- Delgado, R. et al. 1998. "Melanocortin Peptides Inhibit Production of Proinflammatory Cytokines and Nitric Oxide by Activated Microglia." *Journal of Leukocyte Biology* 63(6):740–45.
- Diano, Sabrina and Tamas L. Horvath. 2012. "Mitochondrial Uncoupling Protein 2

- (UCP2) in Glucose and Lipid Metabolism." *Trends in Molecular Medicine* 18(1):52–58.
- Diano, Sabrina, Satya P. Kalra, and Tamas L. Horvath. 1998. "Leptin Receptor Immunoreactivity Is Associated with the Golgi Apparatus of Hypothalamic Neurons and Glial Cells." *Journal of Neuroendocrinology* 10(9):647–50.
- Dietrich, Marcelo O. et al. 2012. "AgRP Neurons Regulate Development of Dopamine Neuronal Plasticity and Nonfood-Associated Behaviors." *Nature Neuroscience* 15(8):1108–10. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nn.3147>).
- Dimou, L. and V. Gallo. 2015. "NG2-Glia and Their Functions in the Central Nervous System." *Glia* 63(8):1429–51. Retrieved December 18, 2017 (<http://doi.wiley.com/10.1002/glia.22859>).
- Djogo, Tina et al. 2016. "Adult NG2-Glia Are Required for Median Eminence-Mediated Leptin Sensing and Body Weight Control." *Cell Metabolism* 23(5):797–810. Retrieved December 18, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27166944>).
- Elmqvist, J. K., C. F. Elias, and C. B. Saper. 1999. "From Lesions to Leptin: Hypothalamic Control of Food Intake and Body Weight." *Neuron* 22(2):221–32. Retrieved December 18, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10069329>).
- Ferreira, Raquel et al. 2012. "Neuropeptide Y Inhibits Interleukin-1 Beta-Induced Microglia Motility." *Journal of Neurochemistry* 120(1):93–105.
- Le Foll, Christelle, Ambrose A. Dunn-Meynell, Henri M. Miziorko, and Barry E. Levin. 2014. "Regulation of Hypothalamic Neuronal Sensing and Food Intake by Ketone Bodies and Fatty Acids." *Diabetes* 63(4):1259–69.
- Fuente-Martín, Esther et al. 2012. "Leptin Regulates Glutamate and Glucose Transporters in Hypothalamic Astrocytes." *Journal of Clinical Investigation* 122(11):3900–3913.
- Gao, Qian et al. 2007. "Anorectic Estrogen Mimics Leptin's Effect on the Rewiring of Melanocortin Cells and Stat3 Signaling in Obese Animals." *Nature Medicine* 13(1):89–94. Retrieved (<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm1525>).
- Gao, Yuanqing et al. 2014. "Hormones and Diet, but Not Body Weight, Control Hypothalamic Microglial Activity." *GLIA* 62(1):17–25.
- García-Cáceres, Cristina et al. 2016. "Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability." *Cell* 166(4):867–80.
- García-Cáceres, Cristina et al. 2011. "Differential Acute and Chronic Effects of Leptin on Hypothalamic Astrocyte Morphology and Synaptic Protein Levels." *Endocrinology* 152(5):1809–18.
- García-Cáceres, Cristina et al. 2014. "The Opposing Effects of Ghrelin on Hypothalamic and Systemic Inflammatory Processes Are Modulated by Its Acylation Status and Food Intake in Male Rats." *Endocrinology* 155(8):2868–80.
- García-Segura, Luis Miguel, Betty Lorenz, and Lydia L. DonCarlos. 2008. "The Role of Glia

- in the Hypothalamus: Implications for Gonadal Steroid Feedback and Reproductive Neuroendocrine Output." *Reproduction* 135(4):419–29.
- Garza, Jacob C., Chung Sub Kim, Jing Liu, Wei Zhang, and Xin Yun Lu. 2008. "Adeno-Associated Virus-Mediated Knockdown of Melanocortin-4 Receptor in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus Promotes High-Fat Diet-Induced Hyperphagia and Obesity." *Journal of Endocrinology* 197(3):471–82.
- Gonçalves, Joana, Carlos F. Ribeiro, João O. Malva, and Ana P. Silva. 2012. "Protective Role of Neuropeptide Y Y₂ Receptors in Cell Death and Microglial Response Following Methamphetamine Injury." *The European Journal of Neuroscience* 36(9):3173–83. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22805317>).
- Gordon, Grant R. J. et al. 2009. "Astrocyte-Mediated Distributed Plasticity at Hypothalamic Glutamate Synapses." *Neuron* 64(3):391–403.
- Gordon, Grant R. J. et al. 2005. "Norepinephrine Triggers Release of Glial ATP to Increase Postsynaptic Efficacy." *Nature Neuroscience* 8(8):1078–86. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nn1498>).
- Gotthardt, Juliet D. and Nicholas T. Bello. 2017. "Meal Pattern Alterations Associated with Intermittent Fasting for Weight Loss Are Normalized after High-Fat Diet Re-Feeding." *Physiology and Behavior* 174:49–56.
- Gouazé, Alexandra et al. 2013. "Cerebral Cell Renewal in Adult Mice Controls the Onset of Obesity." *PLoS ONE* 8(8).
- Gray, E. G. 1969. "Electron Microscopy of Excitatory and Inhibitory Synapses: A Brief Review." *Progress in Brain Research* 31(C):141–55.
- Guzmán, Manuel and Cristina Blázquez. 2001. "Is There an Astrocyte–neuron Ketone Body Shuttle?" *Trends in Endocrinology & Metabolism* 12(4):169–73.
- Gyengesi, Erika et al. 2010. "Corticosterone Regulates Synaptic Input Organization of POMC and NPY/AgRP Neurons in Adult Mice." *Endocrinology* 151(11):5395–5402.
- Hahn, T. M., J. F. Breininger, D. G. Baskin, and M. W. Schwartz. 1998. "Coexpression of *Agrp* and NPY in Fasting-Activated Hypothalamic Neurons." *Nature Neuroscience* 1(4):271–72.
- Halassa, Michael M. et al. 2009. "Astrocytic Modulation of Sleep Homeostasis and Cognitive Consequences of Sleep Loss." *Neuron* 61(2):213–19.
- Heneka, Michael T. and Gary E. Landreth. 2007. "PPARs in the Brain." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1771(8):1031–45.
- Hentges, Shane T. et al. 2004. "GABA Release from Proopiomelanocortin Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 24(7):1578–83. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973227>).
- Hill, Jennifer W. et al. 2008. "Acute Effects of Leptin Require PI3K Signaling in Hypothalamic Proopiomelanocortin Neurons in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 118(5):1796–1805.

- Hill, Jennifer W. et al. 2010. "Direct Insulin and Leptin Action on Pro-Opiomelanocortin Neurons Is Required for Normal Glucose Homeostasis and Fertility." *Cell Metabolism* 11(4):286–97.
- Hsuchou, Hung, Yi He, et al. 2009. "Obesity Induces Functional Astrocytic Leptin Receptors in Hypothalamus." *Brain* 132(4):889–902.
- Hsuchou, Hung, Weihong Pan, Maria J. Barnes, and Abba J. Kastin. 2009. "Leptin Receptor mRNA in Rat Brain Astrocytes." *Peptides* 30(12):2275–80.
- Hughes, Ethan G., Shin H. Kang, Masahiro Fukaya, and Dwight E. Bergles. 2013. "Oligodendrocyte Progenitors Balance Growth with Self-Repulsion to Achieve Homeostasis in the Adult Brain." *Nature Neuroscience* 16(6):668–76. Retrieved December 18, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23624515>).
- Hung, A. J. et al. 2003. "Estrogen, Synaptic Plasticity and Hypothalamic Reproductive Aging." Pp. 53–59 in *Experimental Gerontology*, vol. 38.
- Huo, Lihong et al. 2009. "Leptin-Dependent Control of Glucose Balance and Locomotor Activity by POMC Neurons." *Cell Metabolism* 9(6):537–47.
- Huszar, Dennis et al. 1997. "Targeted Disruption of the Melanocortin-4 Receptor Results in Obesity in Mice." *Cell* 88(1):131–41. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400818656>).
- Jourdain, Pascal et al. 2007. "Glutamate Exocytosis from Astrocytes Controls Synaptic Strength." *Nature Neuroscience* 10(3):331–39. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nn1849>).
- Kacem, Kamel, Pierre Lacombe, Jacques Seylaz, and Gilles Bonvento. 1998. "Structural Organization of the Perivascular Astrocyte Endfeet and Their Relationship with the Endothelial Glucose Transporter: A Confocal Microscopy Study." *GLIA* 23(1):1–10.
- Kang, J., L. Jiang, S. a Goldman, and M. Nedergaard. 1998. "Astrocyte-Mediated Potentiation of Inhibitory Synaptic Transmission." *Nat. Neurosci.* 1(8):683–92. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10196584>).
- Kettenmann, H., U. K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky. 2011. "Physiology of Microglia." *Physiological Reviews* 91(2):461–553. Retrieved (<http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00011.2010>).
- Kim, Jae Geun et al. 2014. "Leptin Signaling in Astrocytes Regulates Hypothalamic Neuronal Circuits and Feeding." *Nature Neuroscience* 17(7):908–10. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.3725>).
- Kishi, Toshiro et al. 2003. "Expression of Melanocortin 4 Receptor mRNA in the Central Nervous System of the Rat." *The Journal of Comparative Neurology* 457(August 2002):213–35.
- Koch, Marco et al. 2015a. "Hypothalamic POMC Neurons Promote Cannabinoid-Induced Feeding." *Nature* 519(7541):45–50. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature14260>).

- Koch, Marco et al. 2015b. "Hypothalamic POMC Neurons Promote Cannabinoid-Induced Feeding." *Nature* 519(7541):45–50. Retrieved October 12, 2017 (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature14260>).
- Kokoeva, M. V., Huali Yin, and Jeffrey S. Flier. 2005. "Neurogenesis in the Hypothalamus of Adult Mice: Potential Role in Energy Balance." *Science* 310(5748):679–83. Retrieved December 18, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16254185>).
- Kokoeva, Maia V., Huali Yin, and Jeffrey S. Flier. 2007. "Evidence for Constitutive Neural Cell Proliferation in the Adult Murine Hypothalamus." *The Journal of Comparative Neurology* 505(2):209–20. Retrieved December 18, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17853440>).
- Könner, A.Christine et al. 2007. "Insulin Action in AgRP-Expressing Neurons Is Required for Suppression of Hepatic Glucose Production." *Cell Metabolism* 5(6):438–49.
- Krashes, Michael J. et al. 2011. "Rapid, Reversible Activation of AgRP Neurons Drives Feeding Behavior in Mice." *Journal of Clinical Investigation* 121(4):1424–28.
- Krashes, Michael J., Bhavik P. Shah, Shuichi Koda, and Bradford B. Lowell. 2013. "Rapid versus Delayed Stimulation of Feeding by the Endogenously Released agRP Neuron Mediators GABA, NPY, and AgRP." *Cell Metabolism* 18(4):588–95.
- Krul, Elaine S. and J. Tang. 1992. "Secretion of Apolipoprotein E by an Astrocytoma Cell Line." *Journal of Neuroscience Research* 32(2):227–38.
- Labouebe, G. et al. 2013. "Insulin Induces Long-Term Depression of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons via Endocannabinoids." *Nat Neurosci* 16(3):300–308. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23354329>).
- Lafrance, Véronique, Wataru Inoue, Bernard Kan, and Giamal N. Luheshi. 2010. "Leptin Modulates Cell Morphology and Cytokine Release in Microglia." *Brain, Behavior, and Immunity* 24(3):358–65.
- Lam, Brian Y. H. et al. 2017. "Heterogeneity of Hypothalamic pro-Opiomelanocortin-Expressing Neurons Revealed by Single-Cell RNA Sequencing." *Molecular Metabolism* 6(5):383–92.
- Lanfray, Damien et al. 2013. "Gliotransmission and Brain Glucose Sensing Critical Role of Endozepines." *Diabetes* 62(3):801–10.
- Langlet, Fanny et al. 2013. "Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in Response to Fasting." *Cell Metabolism* 17(4):607–17.
- Lau, Benjamin K., Daniela Cota, Luigia Cristino, and Stephanie L. Borgland. 2017. "Endocannabinoid Modulation of Homeostatic and Non-Homeostatic Feeding Circuits." *Neuropharmacology* 124:38–51.
- Lehman, Michael N., Fred J. Karsch, Jane E. Robinson, and Ann-Judith -J Silverman. 1988. "Ultrastructure and Synaptic Organization of Luteinizing Hormone-releasing Hormone (LHRH) Neurons in the Anestrous Ewe." *Journal of Comparative Neurology* 273(4):447–58.

- Lemaire, Jean-Jacques et al. 2011. "White Matter Connectivity of Human Hypothalamus." *Brain Research* 1371:43–64. Retrieved December 18, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899310025850>).
- Lemus, Moyra B. et al. 2015. "A Stereological Analysis of NPY, POMC, Orexin, GFAP Astrocyte, and iba1 Microglia Cell Number and Volume in Diet-Induced Obese Male Mice." *Endocrinology* 156(5):1701–13.
- Levin, Barry E. and Thomas A. Lutz. 2017. "Amylin and Leptin: Co-Regulators of Energy Homeostasis and Neuronal Development." *Trends in Endocrinology and Metabolism* 28(2):153–64.
- Levin, Barry E., Christophe Magnan, Ambrose Dunn-Meynell, and Christelle Le Foll. 2011. "Metabolic Sensing and the Brain: Who, What, Where, and How?" *Endocrinology* 152(7):2552–57.
- Lin, Hua V. et al. 2010. "Divergent Regulation of Energy Expenditure and Hepatic Glucose Production by Insulin Receptor in Agouti-Related Protein and POMC Neurons." *Diabetes* 59(2):337–46.
- Liu, Tiemin et al. 2012a. "Fasting Activation of AgRP Neurons Requires NMDA Receptors and Involves Spinogenesis and Increased Excitatory Tone." *Neuron* 73(3):511–22. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.11.027>).
- Liu, Tiemin et al. 2012b. "Fasting Activation of AgRP Neurons Requires NMDA Receptors and Involves Spinogenesis and Increased Excitatory Tone." *Neuron* 73(3):511–22.
- Luquet, S. 2005. "NPY/AgRP Neurons Are Essential for Feeding in Adult Mice but Can Be Ablated in Neonates." *Science* 310(5748):683–85. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1115524>).
- Marks, Daniel L., Victor Hruby, Gregor Brookhart, and Roger D. Cone. 2006. "The Regulation of Food Intake by Selective Stimulation of the Type 3 Melanocortin Receptor (MC3R)." *Peptides* 27(2):259–64.
- Marty, Nell et al. 2005. "Regulation of Glucagon Secretion by Glucose Transporter Type 2 (glut2) and Astrocyte-dependent Glucose Sensors." *Journal of Clinical Investigation* 115(12):3545–53.
- Mercer, Aaron J., Shane T. Hentges, Charles K. Meshul, and Malcolm J. Low. 2013. "Unraveling the Central Proopiomelanocortin Neural Circuits." *Frontiers in Neuroscience* (7 FEB).
- Meta, M. R. 2006. "Glial Cells Dilate and Constrict Blood Vessels: A Mechanism of Neurovascular Coupling." *Journal of Neuroscience* 26(11):2862–70. Retrieved (<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4048-05.2006>).
- Milanski, M. et al. 2009. "Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity." *Journal of Neuroscience* 29(2):359–70. Retrieved (<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009>).

- Minokoshi, Yasuhiko et al. 2004. "AMP-Kinase Regulates Food Intake by Responding to Hormonal and Nutrient Signals in the Hypothalamus." *Nature* 428(6982):569–74. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature02440>).
- Morello, Giovanna et al. 2016. "Orexin-A Represses Satiety-Inducing POMC Neurons and Contributes to Obesity via Stimulation of Endocannabinoid Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(17):4759–64. Retrieved (<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1521304113>).
- Morgello, Susan, Ronald R. Uson, Elissa J. Schwartz, and Richard S. Haber. 1995. "The Human Blood-brain Barrier Glucose Transporter (GLUT1) Is a Glucose Transporter of Gray Matter Astrocytes." *Glia* 14(1):43–54.
- Morton, G., D. Cummings, D. Baskin, G. Barsh, and M. Schwartz. 2006. "Central Nervous System Control of Food Intake and Body Weight." *Nature* 443(7109):289–95. Retrieved (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16988703).
- Mountjoy, K. G., M. T. Mortrud, M. J. Low, R. B. Simerly, and R. D. Cone. 1994. "Localization of the Melanocortin-4 Receptor (MC4-R) in Neuroendocrine and Autonomic Control Circuits in the Brain." *Molecular Endocrinology* 8(December):1298–1308.
- Nedergaard, Maiken, Bruce Ransom, and Steven A. Goldman. 2003. "New Roles for Astrocytes: Redefining the Functional Architecture of the Brain." *Trends in Neurosciences* 26(10):523–30.
- Nuzzaci, Danaé et al. 2015. "Plasticity of the Melanocortin System: Determinants and Possible Consequences on Food Intake." *Frontiers in Endocrinology* 6. Retrieved (<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fendo.2015.00143/abstract>).
- Pan, Weihong et al. 2008. "Astrocyte Leptin Receptor (ObR) and Leptin Transport in Adult-Onset Obese Mice." *Endocrinology* 149(6):2798–2806.
- Panatier, Aude et al. 2006. "Glia-Derived D-Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory." *Cell* 125(4):775–84.
- Panov, A., Z. Orynbayeva, V. Vavilin, and V. Lyakhovich. 2014. "Fatty Acids in Energy Metabolism of the Central Nervous System." *Biomed Res Int* 2014:472459. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24883315%5Cnhttp://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2014/472459.pdf>).
- Parton, Laura E. et al. 2007. "Glucose Sensing by POMC Neurons Regulates Glucose Homeostasis and Is Impaired in Obesity." *Nature* 449(7159):228–32. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature06098>).
- Perea, Gertrudis, Marta Navarrete, and Alfonso Araque. 2009. "Tripartite Synapses: Astrocytes Process and Control Synaptic Information." *Trends in Neurosciences* 32(8):421–31.
- Pinto, S. 2004. "Rapid Rewiring of Arcuate Nucleus Feeding Circuits by Leptin." *Science* 304(5667):110–15. Retrieved

- (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1089459>).
- Plum, Leona et al. 2006. "Enhanced PIP3 Signaling in POMC Neurons Causes KATP Channel Activation and Leads to Diet-Sensitive Obesity." *Journal of Clinical Investigation* 116(7):1886–1901.
- Pu, S. et al. 1999. "Interactions between Neuropeptide Y and Gamma-Aminobutyric Acid in Stimulation of Feeding: A Morphological and Pharmacological Analysis." *Endocrinology* 140(2):933–40.
- Purkayastha, Sudarshana and Dongsheng Cai. 2013. "Disruption of Neurogenesis by Hypothalamic Inflammation in Obesity or Aging." *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 14(4):351–56.
- Qiu, Jian et al. 2014. "Insulin Excites Anorexigenic Proopiomelanocortin Neurons via Activation of Canonical Transient Receptor Potential Channels." *Cell Metabolism* 19(4):682–93.
- Ransom, Bruce, Toby Behar, and Maiken Nedergaard. 2003. "New Roles for Astrocytes (Stars at Last)." *Trends in Neurosciences* 26(10):520–22.
- do Rego, Jean-Claude et al. 2007. "Pharmacological Characterization of the Receptor Mediating the Anorexigenic Action of the Octadecaneuropeptide: Evidence for an Endozepinergic Tone Regulating Food Intake." *Neuropsychopharmacology* 32(7):1641–48. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.npp.1301280>).
- Roberta, Imperatore, Palomba Letizia, and Cristino Luigia. 2017. "Role of Orexin-A in Hypertension and Obesity." *Current Hypertension Reports* 19(4).
- Rouach, N., A. Koulakoff, V. Abudara, K. Willecke, and C. Giaume. 2008. "Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission." *Science* 322(5907):1551–55. Retrieved (<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1164022>).
- Saper, Clifford B. 2000. "Hypothalamic Connections with the Cerebral Cortex." Pp. 39–48 in *Progress in brain research*, vol. 126. Retrieved December 18, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11105638>).
- Shen, Ling et al. 2008. "Brain Apolipoprotein E: An Important Regulator of Food Intake in Rats." *Diabetes* 57(8):2092–98.
- Shoelson, S. E., J. Lee, and A. B. Goldfine. 2006. "Inflammation and Insulin Resistance." *J Clin Invest* 116(7):1793–1801. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16823477>).
- Sohn, Jong Woo et al. 2011. "Serotonin 2C Receptor Activates a Distinct Population of Arcuate pro-Opiomelanocortin Neurons via TRPC Channels." *Neuron* 71(3):488–97.
- Ste Marie, Linda, Grant I. Miura, Donald J. Marsh, Keith Yagaloff, and Richard D. Palmiter. 2000. "A Metabolic Defect Promotes Obesity in Mice Lacking Melanocortin-4 Receptors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(22):12339–44. Retrieved (<http://www.pnas.org/content/97/22/12339.long>).

- Stolarczyk, Emilie et al. 2010. "Detection of Extracellular Glucose by GLUT2 Contributes to Hypothalamic Control of Food Intake." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 298(5):E1078–87.
- Sutton, G. M. et al. 2008. "The Melanocortin-3 Receptor Is Required for Entrainment to Meal Intake." *Journal of Neuroscience* 28(48):12946–55. Retrieved (<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3615-08.2008>).
- Sutton, Gregory M. et al. 2006. "Diet-Genotype Interactions in the Development of the Obese, Insulin-Resistant Phenotype of C57BL/6J Mice Lacking Melanocortin-3 or -4 Receptors." *Endocrinology* 147(5):2183–96.
- Taïb, Bouchra et al. 2013. "Glucose Regulates Hypothalamic Long-Chain Fatty Acid Metabolism via AMP-Activated Kinase (AMPK) in Neurons and Astrocytes." *Journal of Biological Chemistry* 288(52):37216–29.
- Tang, Chih-Hsin et al. 2007. "Leptin-Induced IL-6 Production Is Mediated by Leptin Receptor, Insulin Receptor Substrate-1, Phosphatidylinositol 3-Kinase, Akt, NF-kappaB, and p300 Pathway in Microglia." *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)* 179(2):1292–1302. Retrieved (<http://pubs.ascp.org/doi/10.1189/jlb.0607111>).
- Thaler, J. et al. 2011. "Obesity Is Associated with Hypothalamic Injury in Rodents and Humans." *Journal of Clinical Investigation* 122(1):153. Retrieved (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488604004182>).
- Theodosis, D. T. and D. A. Poulain. 1993. "Activity-Dependent Neuronal-Glial and Synaptic Plasticity in the Adult Mammalian Hypothalamus." *Neuroscience* 57(3):501–35.
- Tong, Qingchun, Chian-Ping Ye, Juli E. Jones, Joel K. Elmquist, and Bradford B. Lowell. 2008. "Synaptic Release of GABA by AgRP Neurons Is Required for Normal Regulation of Energy Balance." *Nature Neuroscience* 11(9):998–1000. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.2167>).
- Tschöp, M., D. L. Smiley, and M. L. Heiman. 2000. "Ghrelin Induces Adiposity in Rodents." *Nature* 407(6806):908–13.
- Tung, Y. C. Lorain., Debra Rimmington, Stephen O'Rahilly, and Anthony P. Coll. 2007. "Pro-Opiomelanocortin Modulates the Thermogenic and Physical Activity Responses to High-Fat Feeding and Markedly Influences Dietary Fat Preference." *Endocrinology* 148(11):5331–38.
- Valdearcos, Martin et al. 2014. "Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function." *Cell Reports* 9(6):2124–39.
- Valdearcos, Martin et al. 2017. "Microglial Inflammatory Signaling Orchestrates the Hypothalamic Immune Response to Dietary Excess and Mediates Obesity Susceptibility." *Cell Metabolism* 26(1):185–197.e3.
- Vannucci, S. J., F. Maher, and I. A. Simpson. 1997. "Glucose Transporter Proteins in Brain: Delivery of Glucose to Neurons and Glia." *Glia* 21(1):2–21. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9111111>).

([http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199709\)21:1%3C2::AID-GLIA2%3E3.0.CO;2-C/asset/2_ftp.pdf?v=1&t=i09bqg3l&s=59d1a8d4d9ea55167f1b6d3fb4524848fe6e7026](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/(SICI)1098-1136(199709)21:1%3C2::AID-GLIA2%3E3.0.CO;2-C/asset/2_ftp.pdf?v=1&t=i09bqg3l&s=59d1a8d4d9ea55167f1b6d3fb4524848fe6e7026)).

- Vong, Linh et al. 2011. "Leptin Action on GABAergic Neurons Prevents Obesity and Reduces Inhibitory Tone to POMC Neurons." *Neuron* 71(1):142–54.
- Williams, K. W. et al. 2010. "Segregation of Acute Leptin and Insulin Effects in Distinct Populations of Arcuate Proopiomelanocortin Neurons." *Journal of Neuroscience* 30(7):2472–79. Retrieved (<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3118-09.2010>).
- Witkin, Joan W., Michel Ferin, Sulli J. Popilskis, and Ann Judith Silverman. 1991. "Effects of Gonadal Steroids on the Ultrastructure of GnRH Neurons in the Rhesus Monkey: Synaptic Input and Glial Apposition." *Endocrinology* 129(2):1083–92.
- Wu, Q., M. P. Howell, M. A. Cowley, and R. D. Palmiter. 2008. "Starvation after AgRP Neuron Ablation Is Independent of Melanocortin Signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(7):2687–92. Retrieved (<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0712062105>).
- Wu, Qi, Maureen P. Boyle, and Richard D. Palmiter. 2009. "Loss of GABAergic Signaling by AgRP Neurons to the Parabrachial Nucleus Leads to Starvation." *Cell* 137(7):1225–34.
- Yang, Liang, Yong Qi, and Yunlei Yang. 2015. "Astrocytes Control Food Intake by Inhibiting AGRP Neuron Activity via Adenosine A₁ Receptors." *Cell Reports* 11(5):798–807.
- Yang, Yunlei, Deniz Atasoy, Helen H. Su, and Scott M. Sternson. 2011. "Hunger States Switch a Flip-Flop Memory Circuit via a Synaptic AMPK-Dependent Positive Feedback Loop." *Cell* 146(6):992–1003.
- Yaswen, L., N. Diehl, M. B. Brennan, and U. Hochgeschwender. 1999. "Obesity in the Mouse Model of pro-Opiomelanocortin Deficiency Responds to Peripheral Melanocortin." *Nature Medicine* 5(9):1066–70.
- Young, Kaylene M. et al. 2013. "Oligodendrocyte Dynamics in the Healthy Adult CNS: Evidence for Myelin Remodeling." *Neuron* 77(5):873–85. Retrieved December 18, 2017 (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627313000500>).
- Zhan, C. et al. 2013. "Acute and Long-Term Suppression of Feeding Behavior by POMC Neurons in the Brainstem and Hypothalamus, Respectively." *Journal of Neuroscience* 33(8):3624–32. Retrieved (<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013>).
- Zhang, Qi, Mitsunori Fukuda, Elisabeth Van Bockstaele, Olivier Pascual, and Philip G. Haydon. 2004. "Synaptotagmin IV Regulates Glial Glutamate Release." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(25):9441–46. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15197251> <http://www.ncbi.nlm.nih>).

gov/pubmed/15197251).

- Zhang, Xiaoqing et al. 2008. "Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity." *Cell* 135(1):61–73.
- Zhang, Y. et al. 1994. "Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue." *Nature* 372(6505):425–32.
- Zhang, Yalin, Judith M. Reichel, Cheng Han, Juan Pablo Zuniga-Hertz, and Dongsheng Cai. 2017. "Astrocytic Process Plasticity and IKK β /NF- κ B in Central Control of Blood Glucose, Blood Pressure, and Body Weight." *Cell Metabolism* 25(5):1091–1102.e4. Retrieved December 18, 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28467927>).
- Ziotopoulou, M., C. S. Mantzoros, S. M. Hileman, and J. S. Flier. 2000. "Differential Expression of Hypothalamic Neuropeptides in the Early Phase of Diet-Induced Obesity in Mice." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 279(4):E838–45.
- Zonta, Micaela et al. 2002. "Neuron-to-Astrocyte Signaling Is Central to the Dynamic Control of Brain Microcirculation." *Nature Neuroscience* 6(1):43–50. Retrieved (<http://www.nature.com/doi/10.1038/nn980>).

ANNEXES

Annexe 1.

Nuzzaci D, Laderrière A, Lemoine A, Nédélec E, Pénicaud L, Rigault C, Benani A. *Plasticity of the Melanocortin System: Determinants and Possible Consequences on Food Intake*. Front Endocrinol (Lausanne). 2015 Sep 14;6:143. doi: 10.3389/fendo.2015.00143. eCollection 2015.

Annexe 2.

Brenachot X, Gautier T, Nédélec E, Deckert V, Laderrière A, Nuzzaci D, Rigault C, Lemoine A, Pénicaud L, Lagrost L, Benani A. *Brain Control of Plasma Cholesterol Involves Polysialic Acid Molecules in the Hypothalamus*. Front Neurosci. 2017 May 3;11:245. doi: 10.3389/fnins.2017.00245. eCollection 2017.



Plasticity of the melanocortin system: determinants and possible consequences on food intake

Danaé Nuzzaci, Amélie Laderrière, Aleth Lemoine, Emmanuelle Nédélec, Luc Pénicaud, Caroline Rigault and Alexandre Benani*

Center for Taste and Feeding Behaviour, CNRS (UMR6265), INRA (UMR1324), Université de Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Marc Claret,
Institut d'Investigacions Biomèdiques
August Pi i Sunyer, Spain

Reviewed by:

Julie A. Chowen,
Hospital Infantil Universitario Niño
Jesús, Spain
Cristina García Cáceres,
Technische Universität München,
Germany

*Correspondence:

Alexandre Benani,
Centre des Sciences du Goût et de
l'Alimentation (CSGA), CNRS
(UMR6265), INRA (UMR1324),
Université de Bourgogne-Franche
Comté, 9E Boulevard Jeanne d'Arc,
Dijon 21000, France
alexandre.benani@u-bourgogne.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science, a section of
the journal *Frontiers in Endocrinology*

Received: 20 July 2015

Accepted: 31 August 2015

Published: 14 September 2015

Citation:

Nuzzaci D, Laderrière A, Lemoine A,
Nédélec E, Pénicaud L, Rigault C and
Benani A (2015) Plasticity of the
melanocortin system: determinants
and possible consequences on food
intake.
Front. Endocrinol. 6:143.
doi: 10.3389/fendo.2015.00143

The melanocortin system is one of the most important neuronal pathways involved in the regulation of food intake and is probably the best characterized. Agouti-related peptide (AgRP) and proopiomelanocortin (POMC) expressing neurons located in the arcuate nucleus of the hypothalamus are the key elements of this system. These two neuronal populations are sensitive to circulating molecules and receive many excitatory and inhibitory inputs from various brain areas. According to sensory and metabolic information they integrate, these neurons control different aspects of feeding behavior and orchestrate autonomic responses aimed at maintaining energy homeostasis. Interestingly, composition and abundance of pre-synaptic inputs onto arcuate AgRP and POMC neurons vary in the adult hypothalamus in response to changes in the metabolic state, a phenomenon that can be recapitulated by treatment with hormones, such as leptin or ghrelin. As described in other neuroendocrine systems, glia might be determinant to shift the synaptic configuration of AgRP and POMC neurons. Here, we discuss the physiological outcome of the synaptic plasticity of the melanocortin system, and more particularly its contribution to the control of energy balance. The discovery of this attribute has changed how we view obesity and related disorders, and opens new perspectives for their management.

Keywords: synaptic plasticity, melanocortin system, food intake, obesity, AgRP neurons, POMC neurons

Introduction

Brain plasticity refers to the natural capacity of the brain to modify its structure and function through experience. This attribute relies on the property of neurons to adjust their responsiveness, molecular content, and connections as a result of activity. At the level of synapses, plasticity includes functional changes that strengthen or weaken existing synapses – by changing probability of neurotransmitter release and conductance and quantity of post-synaptic receptors – as well as structural changes that involve synapse formation and elimination (1). The hypothalamus, which ensures long-term stability of the inner milieu, is a brain area prone to synaptic plasticity. Neurotransmission in numerous neuronal circuits located in the hypothalamus varies in response to changes within the body and in the environment. This Review focuses on the structural forms of synaptic plasticity in the melanocortin system of the hypothalamus, one of the main neuronal circuits that control appetite and energy homeostasis. We also discuss recent findings suggesting that loss of plasticity in this

circuit might compromise its function and confer risk for obesity and related disorders.

Overview of the Melanocortin System

Feeding behavior is controlled by several homeostatic brain circuits that promote food intake or suppress appetite according to metabolic needs, and by cognitive structures involved in hedonic hunger, eating habits, and emotional processing of the meal context (2). The melanocortin system is one of the most important neuronal pathways involved in the regulation of food intake and is probably the best characterized (3–7). This circuit includes (i) neurons expressing melanocortin receptors (MCR), namely central MC3R and MC4R subtypes, (ii) neurons that express MCR agonists, such as the melanocortin peptide called α -melanocyte-stimulating hormone (MSH), which derives from the proopiomelanocortin (POMC) precursor protein, and (iii) neurons that express MCR antagonists, such as the high-affinity ligand agouti-related peptide (AgRP).

While MC3R and MC4R target neurons are widely distributed through the brain, they are highly enriched in specific brain areas controlling energy balance (8–10). The role of MC3R in energy homeostasis is not well understood yet, but MC3R neurons likely contribute to behavioral adaptation to fasting and nutrient partitioning (11, 12). Conversely, MCR4 is clearly involved in several aspects of energy balance, such as feeding behavior, adaptive thermogenesis, and glucose homeostasis (13–17). The anorectic and weight-lowering functions of MC4R have been evidenced using pharmacological and genetic tools in the late 1990s (18, 19). Moreover, mutations in the MC4R gene represent the most frequent genetic form of obesity and are associated with hyperphagia (20–22).

Interestingly, most of MC4R-expressing sites in the brain receive dual antagonistic innervation of stimulatory POMC and inhibitory AgRP fibers (23–25), suggesting that the melanocortin system is finely tuned to maintain energy homeostasis. POMC- and AgRP-expressing neurons are contained in close proximity in the arcuate nucleus of the hypothalamus, but a small cluster of POMC neurons is also found in the solitary tract nucleus (*nucleus tractus solitarii*, NTS) in the brainstem (26–29). One special feature of the arcuate neurons is their position in a brain parenchyma flooded by blood-borne factors and cerebrospinal factors that are released by permeable microvessels of the median eminence and delivered by tanycytes lining the third ventricle (30–33). The ability of arcuate POMC and AgRP neurons to be regulated by circulating hormones, including leptin, insulin, ghrelin, estrogens, glucocorticoids, glucagon-like peptide 1, and peptide YY, and by nutrients makes the melanocortin system sensitive to changes in body's energy status (34–36). For instance, the adipose-derived signal leptin increases the activity of POMC neurons and inhibits that of AgRP neurons, which is consistent with the anorexigenic effect of this hormone (29, 37). Intrinsic particularities have been found in the melanocortin system based on the neurochemistry, anatomy, and sensitivity of its neuronal components. Arcuate but not NTS POMC neurons co-express the cocaine amphetamine-related peptide (CART), another anorexigenic molecule (38, 39). Moreover, arcuate POMC neurons

are likely segregated into different projectional systems through the rostral-caudal axis of the hypothalamus, sending separated bundles of fibers to anterior brain structures (e.g., bed nucleus of the stria terminalis), lateral regions [e.g., paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), lateral hypothalamus (LH), amygdala], or caudal regions (e.g., periaqueductal gray) (23, 25, 40). Likewise, distinct subpopulations of arcuate AgRP neurons project to different brain regions (41). AgRP neurons co-express the orexigenic neuropeptide Y (NPY) (42, 43), and the neurotransmitter gamma-aminobutyric acid (GABA) that allows direct inhibition of POMC neurons (29). By contrast, arcuate POMC neurons exhibit diverse GABAergic, glutamatergic, and cholinergic neurotransmitter phenotypes (44–48), but the significance of this heterogeneity remains unclear (49). Nonetheless, divergence in the melanocortin system has been evidenced and the current model comprises dissociated sub-circuits that are dedicated to regulating specific parameters of the energy balance. For instance, MC4R-expressing single-minded homolog 1 (SIM1) neurons located in the PVN control appetite, while others in other parts of the brain control energy expenditure (50). Indeed, sympathetic preganglionic cholinergic MC4R-expressing neurons of the intermedialateral nucleus (IML) of the thoracic spinal cord regulate energy expenditure but not food intake (51).

Until recently, it was thought that AgRP neurons promote food intake via GABA- and NPY-mediated inhibition of local POMC neurons, and via AgRP-mediated competitive antagonism on distant MCR-expressing neurons (3, 52). The use of genetically encoded anatomical, optogenetic, and pharmacogenetic tools allowed for the identification of further modes of action of arcuate AgRP and POMC neurons in the control of food intake. In fact, the MCR signaling is not always mandatory for AgRP neurons to mediate their orexigenic effect. This has been exemplified in two different models. The first is based on selective ablation of AgRP neurons in adult mice. This procedure reduces the GABAergic tone from AgRP neurons within the parabrachial nucleus (PBN) of the hindbrain, a visceral and taste-sensing area, which leads to cessation of feeding and ultimately to death by starvation (53–55). In this specific hypothalamus-to-hindbrain circuit, AgRP innervation of the PBN maintains food intake in mice in a melanocortin-independent manner (54). The second model uses chemical- or light-mediated activation of melanocortin neurons in mice. These experiments show that artificial acute and selective activation of AgRP neurons is sufficient to rapidly induce voracious feeding (56, 57). Because this behavioral response is still found in *Lethal yellow* (A^y) mutant mice, whose ectopic expression of the endogenous MCR antagonist Agouti blocks the melanocortin signaling, this indicates that MCR signaling is not necessary for AgRP neurons to initiate feeding (56). Conversely, photo-activation of POMC reduces food intake but the POMC-mediated anorexigenic effect is completely blocked by the A^y mutation showing that POMC neurons require downstream melanocortin signaling to reduce food intake (56). Further studies have indicated that AgRP neurons control distinct phases of eating via specific molecular signaling pathways and neuronal circuits. NPY and GABA transmitters from AgRP neurons are involved in short-term regulation of food intake, whereas the AgRP peptide itself – as well as arcuate POMC neurons – controls food intake through an action on MC4R over

a delayed and prolonged period (56, 58–60). A growing body of evidence suggests that AgRP and POMC neurons not only control homeostatic food intake but also motivate feeding behaviors, including desire to eat and food-seeking behavior (57), preference for flavors (61), visceral malaise anorexia (62), and reward-related behaviors (63). Furthermore, these neurons take into account the nutritional value and accessibility of food together with the internal physiological state to produce an anticipatory modulation of the feeding behavior (64). Finally, current model shows that AgRP neurons engage a constellation of parallel circuits and brain relays to control different aspects of feeding behavior, some of which have a redundant capability to drive feeding behavior (41).

Evidences of Synaptic Plasticity in the Melanocortin System in Adult Brain

Sensory experiences and changes in the inner milieu deeply modify the function of specialized neuronal circuits in the adult brain (1, 65, 66). This capacity to adapt to ever-changing life conditions relies on coordinated molecular and cellular mechanisms, including changes in synaptic strength and in neuronal connectivity. The concept that the mature hypothalamus can undergo morphological plasticity according to variations of the physiological state and in response to hormonal cues is not a recent idea. In the 1980s, synaptic reorganization within the oxytocinergic system has been evidenced during lactation or in response to changes in water homeostasis (67, 68). In the same time, synaptic remodeling has been found in the hypothalamus in response to sex steroid hormones and during the estrous cycle (69, 70). This hormone-dependent synaptic plasticity affects gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons involved in the neuroendocrine control of reproduction (71). During the two last decades, Tamas Horvath and colleagues have clearly established that the melanocortin system is another hypothalamic system whose connectivity is affected by variation in circulating hormones (72). Pioneer studies were based on depletion–repletion paradigms in living animals to control hormone levels combined with in-depth inspection of synaptic organization on arcuate POMC and NPY neurons (73–75). In the first report, the situation in mutant *ob/ob* mice lacking leptin was compared to that of wild-type and leptin-supplemented *ob/ob* mice (73). Electron microscopic stereology on fixed brain sections combined to *ex vivo* electrophysiological recordings of living brain slices revealed that leptin induces a shift in the composition of afferent inputs on POMC neurons in adult brain, by increasing excitatory synapses apposed on these cells within only 6 h following intraperitoneal injection. Opposite effects were found on NPY/AgRP neurons. Interestingly, leptin-induced synaptic changes are consistent with the anorectic effect of leptin suggesting that a causal relation might exist. Similar strategies were used to evidence remodeling properties of estradiol and corticosterone, whose effects on the connectivity of the adult melanocortin system are still consistent with their physiological actions (74, 75). Further studies have revealed that injection of ghrelin in wild-type mice also causes synaptic remodeling on POMC and NPY/AgRP neurons (73, 76). All these observations clearly indicate the ability of the adult melanocortin to rewire in response to metabolic cues.

Connectivity of the Melanocortin System is Nutritionally Regulated

Plasticity of the melanocortin system in adult brain has been initially evidenced in response to hormone replacement in depleted backgrounds found in mutant *ob/ob*, ovariectomized, or adrenalectomized mice (73–75). This discovery markedly changed our understanding of how hormones regulate the melanocortin system. A second breakthrough was achieved in the early 2010s when it was shown that synaptic rearrangement on POMC and NPY/AgRP neurons naturally occurs in naïve animals in response to changes in the nutritional state.

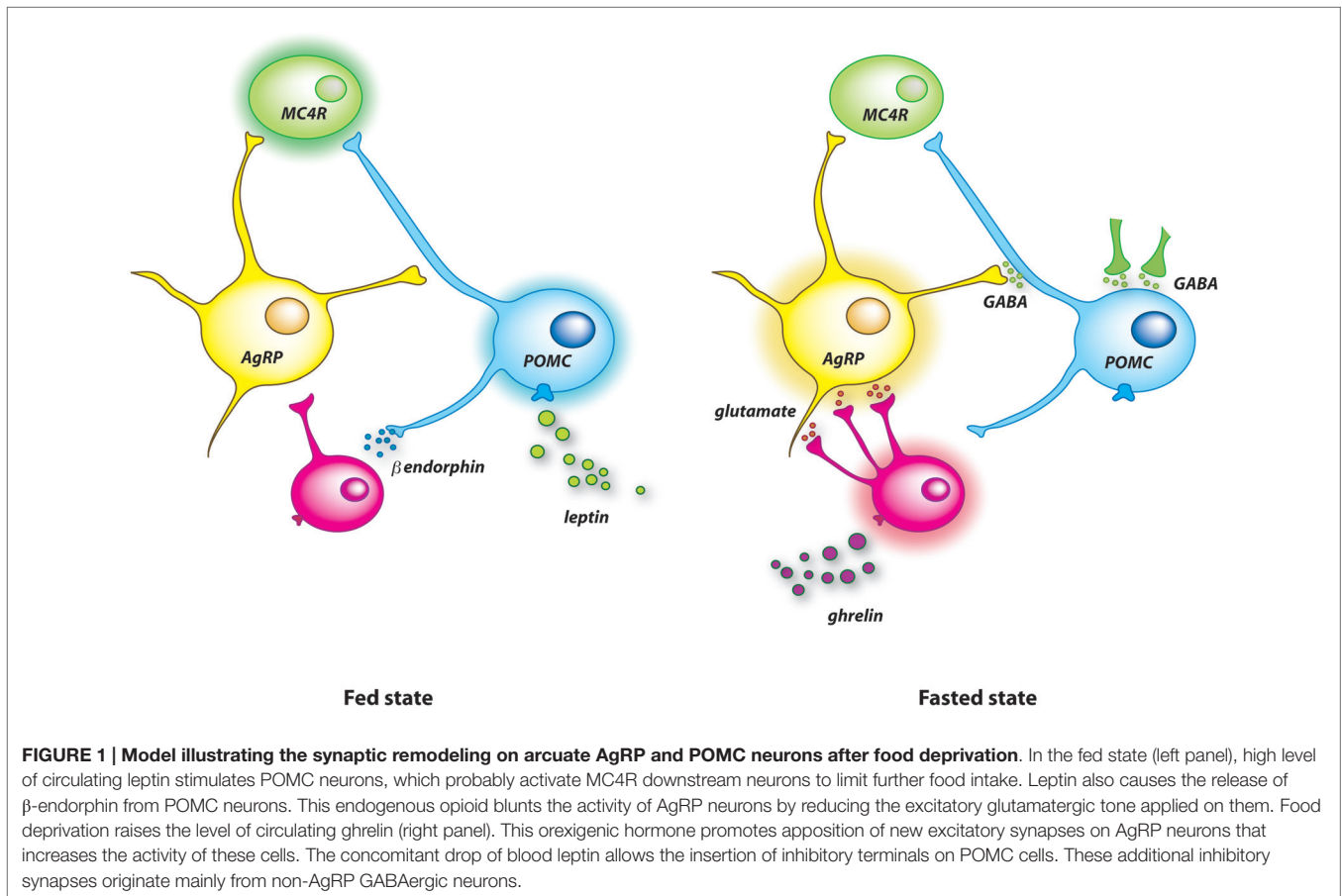
During positive energy balance, high level of circulating leptin stimulates arcuate leptin-sensitive POMC neurons, which might activate anorexigenic MC4R-signaling in downstream neurons *via* α -MSH release (29, 77, 78). In parallel, leptin blunts the tonic AgRP activity by reducing excitatory inputs on AgRP neurons through an opioid receptor-dependent pathway (78). It is likely the release of β -endorphin from leptin-stimulated POMC neurons that down-regulates the glutamatergic activity on AgRP neurons (78).

Food deprivation induces synaptic remodeling in both AgRP and POMC neurons (77–79). Orexigenic ghrelin, which is elevated after fasting (80), promotes excitatory glutamate release onto AgRP neurons (78). Ca^{2+} and AMPK intracellular signaling in pre-synaptic glutamatergic neurons mediates this effect (78). *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors and spinogenesis in AgRP neurons are also required to increase AgRP activity during fasting (79). In addition, the inhibitory tone on POMC neurons increases when blood leptin level falls during fasting (77, 78). Fasting-induced inhibition of POMC neurons might result from ghrelin-activated GABAergic AgRP neurons that innervate POMC neurons (29, 58, 77, 81) but is also caused by apposition of new inhibitory terminals on POMC neurons, which are non-AgRP GABAergic neurons (77).

Finally, the current model for food deprivation-induced neuronal rewiring implies two opposite signals acting on several cell targets (**Figure 1**). Ghrelin rewires the melanocortin system during negative energy balance and basal synaptic organization is recovered by the rise of leptin when energy balance is restored. In this model, leptin is viewed as a resetting signal. On the other hand, overfeeding for few days, which is associated with high leptin level, is another nutritional situation that initiates synaptic remodeling in the melanocortin system (82). Precisely, short-term high-fat diet for 3 days increases excitatory inputs on POMC neurons. This observation indicates that synaptic plasticity of AgRP and POMC neurons is not a specific response to fasting and suggests that synaptic remodeling is activated after positive or negative deviation from the metabolic set point. Underlying biological mediators, molecular pathways as well as origin of dynamic synapses probably differ for each situation.

Astrocytes Regulate the Connectivity of Melanocortin Neurons

Initially viewed as the “brain glue,” i.e., an inert scaffold for neural tissues, and then as non-excitatory supporting and nourishing cells for neurons, astrocytes are now considered as key players in neurotransmission (83). Recently, it has been proposed that



these glial cells contribute to the brain control of energy balance (84–86). In fact, astrocytes are at the interface between blood vessels and neurons (87). Expression of sensors for metabolic signals, including those for glucose, fatty acids, insulin, leptin, insulin-like growth factor-1 (IGF1), and glucocorticoids, give to astrocytes the ability to integrate changes in the microenvironment that might be communicated to neurons (88–96). Obviously, hypothalamic and hindbrain astrocytes are glucosensitive cells involved in several physiological functions, including glucose homeostasis and gastric motility (97–100). Moreover, leptin regulates the expression of glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes (101). Alteration of leptin signaling in astrocytes causes aberrant feeding responses to fasting and to leptin or ghrelin injections (96). Feeding response to high-fat diet is also impaired by disruption of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) pathway in astrocytes (102). All these data support the idea that astrocytes contribute to the control of food intake. However, the mode of action of astrocytes for modulating activity of feeding circuits is not totally elucidated. Indeed, they act on neurons through a wide variety of mechanisms. These glial cells modulate neuronal excitability and synaptic transmission *via* the clearance of synaptic transmitters and the delivery of signaling compounds, called gliotransmitters, such as protons, lactate, and adenosine (103, 104). For instance, blood osmolality is nutritionally regulated through a ghrelin-dependent astrocytic ATP release on vasopressin neurons (105). Furthermore, it has been shown

that astrocytes control food intake by inhibiting AgRP neurons via adenosine A1 receptors (106). Astrocytes also produce bioactive molecules, such as apolipoprotein E (ApoE), the most abundant lipid transporter in the brain, which acts in the hypothalamus as a satiety factor by reducing food intake after central administration (107). Modification of astrocyte coverage at the synapses is another mean to efficiently and rapidly modulate the synaptic strength onto neurons (108–110). Time-lapse imaging shows that perisynaptic astrocytic processes that embrace synapses are highly reactive and motile structures, to an even higher degree than dendritic spines (111). Interestingly, leptin alters the expression of structural proteins, such as glial fibrillary acidic protein (GFAP), actin, and vimentin, in astrocytes, which is accompanied by changes in astrocytes morphology (112). Furthermore, the morphology of astrocytes surrounding arcuate POMC and AgRP soma varies in the adult brain according to nutritional history, metabolic state, and leptin signaling (96, 101, 113). These morphological changes significantly influence the synaptic inputs received by melanocortin neurons, which might affect overall activity of the system and ultimately the feeding behavior (96, 101, 113).

Physiological Relevance of Synaptic Plasticity in the Melanocortin System

The ability of the brain to change physically and functionally following experience is a way to adapt to changing environment.

Thus, rearrangement of pre-synaptic contacts onto AgRP and POMC neurons in response to metabolic cues would serve to adjust the reactivity of the melanocortin circuit and to finely control feeding behavior according to energy availability. This attribute would avoid stereotyped responses and maladaptive behaviors. For instance, in fasted animals synaptic remodeling in AgRP and POMC neurons might contribute to increase sensitivity for food cues and/or to increase threshold for satiety signals in order to increase meal size following food deprivation. However, such relation has not been established yet. Nevertheless, it is very likely that the plasticity of the melanocortin system is involved in the regulation of food intake and energy homeostasis. First, because the synaptic rearrangement on AgRP and/or POMC neurons naturally occurs in adult animals in response to positive or negative deviation from a metabolic steady state, i.e., situations that require central regulation of energy metabolism and behavior (78, 79, 82). Second, because the synaptic rearrangement on AgRP and/or POMC neurons caused by metabolic imbalance is consistent with the activation of a counter-regulatory response mediated by changes in AgRP and POMC neuronal activity (78, 79, 82). This observation is in line with seminal reports showing that hormones affect AgRP and POMC synaptology in a manner compatible with their effects on food intake and body weight regulation (73–75, 78). Third, because removal of polysialic acid (PSA), a major synaptic plasticity-promoting factor, from the hypothalamus not only inhibits POMC neurons rewiring during overfeeding but also blunts the following normalization of energy intake (82). While the permissive factor PSA was not selectively ablated in POMC cells in this study – but removed in the whole hypothalamus – these results suggest that POMC rewiring induced by dietary fat consumption contributes to the homeostatic control of food intake. Further studies based on cell-specific manipulation of synaptic plasticity in adult animals are definitively needed to characterize physiological consequences of plasticity-related mechanisms caused by changes in the nutritional state.

Conclusion and Perspectives

Synaptic plasticity of the melanocortin system is currently considered as an adaptive process activated by huge variations in circulating hormones that can be seen during extreme metabolic circumstances, such as 3-day overfeeding and 24-h fasting in rodents. Other plasticity-related processes occur in response to these metabolic challenges. Overfeeding increases cell proliferation in the mouse brain within few days (114). Blocking the early proliferative burst impairs the normalization of energy intake on the short term. In addition, percentage of newly generated cells

adopting a POMC-phenotype in the arcuate nucleus is increased on the long term. This suggests that cell renewal is accelerated during metabolic imbalance, and that maturation of newborn cells is nutritionally regulated to maintain energy homeostasis. On the other hand, fasting induces remodeling of the tanycytic barrier and change in permeability of capillaries in the median eminence and the arcuate nucleus of the hypothalamus, a process that modifies blood–brain exchanges and diffusion of blood-borne molecules into the arcuate parenchyma (31). Structural remodeling in brain feeding centers likely strengthens functional plasticity based on pure pharmacological mechanisms within circuits. Indeed, high-fat feeding induces transient suppression of orexigenic neuropeptides and subsequent induction of anorexigenic neuropeptides (115). Secretion of neuropeptides from POMC neurons can be changed selectively, which further increases the plasticity of the melanocortin system. Activation of cannabinoid receptor 1 (CB₁R) induces β -endorphin release, but not α -MSH, in a subset of POMC neurons, and thereby shifts the function of these appetite-suppressing neurons and increases feeding behavior (116). Interestingly, neurotransmission in the dopaminergic system of the ventral tegmental area is also regulated according to the metabolic state and this regulation involves endocannabinoids too (117). This mechanism might serve to modulate the anticipatory activity and preference for food-related cues. Thus, plasticity of the melanocortin system might be an element of a protecting arsenal based on disseminated structural and functional changes throughout the brain that are engaged during metabolic imbalance.

Metabolic magnetic resonance imaging has shown that the human hypothalamus is competent for plasticity (118). Therefore, it would not be surprising to find in the human brain plasticity-related events similar to those that have been detected in the melanocortin system of laboratory animals. As a corollary, deficiency in the ability to rewire feeding circuits on-demand would confer a risk for maladaptive feeding behaviors, obesity, and related disorders. This hypothesis has been recently strengthened by a meta-analysis of genome-wide association studies for body mass index in human that has brought to the front of the scene the role of the central nervous system in obesity susceptibility, implicating genes related to synaptic function and plasticity (119).

Acknowledgments

This work was supported by the “Centre National de la Recherche Scientifique” and by a grant from the “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-13-JSV1-0003-01 to AB).

References

- Holtmaat A, Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* (2009) **10**:647–58. doi:10.1038/nrn2699
- Berthoud HR. Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? *Curr Opin Neurobiol* (2011) **21**:888–96. doi:10.1016/j.conb.2011.09.004
- Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* (2005) **8**:571–8. doi:10.1038/nn1455
- Ellacott KL, Cone RD. The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* (2006) **361**:1265–74. doi:10.1098/rstb.2006.1861
- Garfield AS, Lam DD, Marston OJ, Przydzial MJ, Heisler LK. Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* (2009) **20**:203–15. doi:10.1016/j.tem.2009.02.002
- Xu Y, Elmquist JK, Fukuda M. Central nervous control of energy and glucose balance: focus on the central melanocortin system. *Ann N Y Acad Sci* (2011) **1243**:1–14. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06248.x

7. Mountjoy KG. Pro-opiomelanocortin (POMC) neurones, POMC-derived peptides, melanocortin receptors and obesity: how understanding of this system has changed over the last decade. *J Neuroendocrinol* (2015) **27**:406–18. doi:10.1111/jne.12285
8. Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB, Cone RD. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* (1994) **8**:1298–308. doi:10.1210/me.8.10.1298
9. Kishi T, Aschkenasi CJ, Lee CE, Mountjoy KG, Saper CB, Elmquist JK. Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* (2003) **457**:213–35. doi:10.1002/cne.10454
10. Liu H, Kishi T, Roseberry AG, Cai X, Lee CE, Montez JM, et al. Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci* (2003) **23**:7143–54.
11. Begriche K, Marston OJ, Rossi J, Burke LK, McDonald P, Heisler LK, et al. Melanocortin-3 receptors are involved in adaptation to restricted feeding. *Genes Brain Behav* (2012) **11**:291–302. doi:10.1111/j.1601-183X.2012.00766.x
12. Renquist BJ, Murphy JG, Larson EA, Olsen D, Klein RF, Ellacott KL, et al. Melanocortin-3 receptor regulates the normal fasting response. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) **109**:E1489–98. doi:10.1073/pnas.1201994109
13. Voss-Andreae A, Murphy JG, Ellacott KL, Stuart RC, Nillni EA, Cone RD, et al. Role of the central melanocortin circuitry in adaptive thermogenesis of brown adipose tissue. *Endocrinology* (2007) **148**:1550–60. doi:10.1210/en.2006-1389
14. Sohn JW, Harris LE, Berglund ED, Liu T, Vong L, Lowell BB, et al. Melanocortin 4 receptors reciprocally regulate sympathetic and parasympathetic preganglionic neurons. *Cell* (2013) **152**:612–9. doi:10.1016/j.cell.2012.12.022
15. Shah BP, Vong L, Olson DP, Koda S, Krashes MJ, Ye C, et al. MC4R-expressing glutamatergic neurons in the paraventricular hypothalamus regulate feeding and are synaptically connected to the parabrachial nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) **111**:13193–8. doi:10.1073/pnas.1407843111
16. Garfield AS, Li C, Madara JC, Shah BP, Webber E, Steger JS, et al. A neural basis for melanocortin-4 receptor-regulated appetite. *Nat Neurosci* (2015) **18**:863–71. doi:10.1038/nn.4011
17. Morgan DA, McDaniel LN, Yin T, Khan M, Jiang J, Acevedo MR, et al. Regulation of glucose tolerance and sympathetic activity by MC4R signaling in the lateral hypothalamus. *Diabetes* (2015) **64**:1976–87. doi:10.2337/db14-1257
18. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* (1997) **385**:165–8. doi:10.1038/385165a0
19. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* (1997) **88**:131–41. doi:10.1016/S0092-8674(00)81865-6
20. Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O, Becker I, Ziegler A, et al. Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) **84**:1483–6. doi:10.1210/jcem.84.4.5728
21. Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, et al. Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* (2000) **106**:271–9. doi:10.1172/JCI9397
22. Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* (2000) **106**:253–62. doi:10.1172/JCI9238
23. Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, et al. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci* (1999) **19**:RC26.
24. Haskell-Luevano C, Chen P, Li C, Chang K, Smith MS, Cameron JL, et al. Characterization of the neuroanatomical distribution of agouti-related protein immunoreactivity in the rhesus monkey and the rat. *Endocrinology* (1999) **140**:1408–15. doi:10.1210/en.140.3.1408
25. Wang D, He X, Zhao Z, Feng Q, Lin R, Sun Y, et al. Whole-brain mapping of the direct inputs and axonal projections of POMC and AgRP neurons. *Front Neuroanat* (2015) **9**:40. doi:10.3389/fnana.2015.00040
26. Joseph SA, Pilcher WH, Bennett-Clarke C. Immunocytochemical localization of ACTH perikarya in nucleus tractus solitarius: evidence for a second opiocortin neuronal system. *Neurosci Lett* (1983) **38**:221–5. doi:10.1016/0304-3940(83)90372-5
27. Schwartzberg DG, Nakane PK. ACTH-related peptide containing neurons within the medulla oblongata of the rat. *Brain Res* (1983) **276**:351–6. doi:10.1016/0006-8993(83)90746-1
28. Palkovits M, Mezey E, Eskay RL. Pro-opiomelanocortin-derived peptides (ACTH/beta-endorphin/alpha-MSH) in brainstem baroreceptor areas of the rat. *Brain Res* (1987) **436**:323–38. doi:10.1016/0006-8993(87)91676-3
29. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* (2001) **411**:480–4. doi:10.1038/35078085
30. Ciofi P, Garret M, Lapirot O, Lafon P, Loyens A, Prevot V, et al. Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* (2009) **150**:5509–19. doi:10.1210/en.2009-0584
31. Langlet F, Levin BE, Luquet S, Mazzone M, Messina A, Dunn-Meynell AA, et al. Tancytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab* (2013) **17**:607–17. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.004
32. Schaeffer M, Langlet F, Lafont C, Molino F, Hodson DJ, Roux T, et al. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) **110**:1512–7. doi:10.1073/pnas.1212137110
33. Ballard E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, et al. Hypothalamic tancytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab* (2014) **19**:293–301. doi:10.1016/j.cmet.2013.12.015
34. Blouet C, Schwartz GJ. Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behav Brain Res* (2010) **209**:1–12. doi:10.1016/j.bbr.2009.12.024
35. Mountjoy KG. Functions for pro-opiomelanocortin-derived peptides in obesity and diabetes. *Biochem J* (2010) **428**:305–24. doi:10.1042/BJ20091957
36. Sohn JW, Elmquist JK, Williams KW. Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends Neurosci* (2013) **36**:504–12. doi:10.1016/j.tins.2013.05.003
37. Bayer SB, Hope K, Guyot S, Bjorbaek C, Kaczorowski C, O'Connell KM. Leptin modulates the intrinsic excitability of AgRP/NPY neurons in the arcuate nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* (2014) **34**:5486–96. doi:10.1523/JNEUROSCI.4861-12.2014
38. Elias CF, Lee C, Kelly J, Aschkenasi C, Ahima RS, Couceyro PR, et al. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* (1998) **21**:1375–85. doi:10.1016/S0896-6273(00)80656-X
39. Ellacott KL, Halatchev IG, Cone RD. Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem. *Endocrinology* (2006) **147**:3190–5. doi:10.1210/en.2005-0877
40. Khachaturian H, Lewis ME, Haber SN, Akil H, Watson SJ. Proopiomelanocortin peptide immunocytochemistry in rhesus monkey brain. *Brain Res Bull* (1984) **13**:785–800. doi:10.1016/0361-9230(84)90237-5
41. Betley JN, Cao ZF, Ritola KD, Sternson SM. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell* (2013) **155**:1337–50. doi:10.1016/j.cell.2013.11.002
42. Broberger C, Johansen J, Johansson C, Schalling M, Hokfelt 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* (1998) **95**:15043–8. doi:10.1073/pnas.95.25.15043
43. Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, Schwartz MW. Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* (1998) **1**:271–2. doi:10.1038/1082
44. Hentges ST, Nishiyama M, Overstreet LS, Stenzel-Poore M, Williams JT, Low MJ. GABA release from proopiomelanocortin neurons. *J Neurosci* (2004) **24**:1578–83. doi:10.1523/JNEUROSCI.3952-03.2004
45. Meister B, Gomuc B, Suarez E, Ishii Y, Durr K, Gillberg L. Hypothalamic proopiomelanocortin (POMC) neurons have a cholinergic phenotype. *Eur J Neurosci* (2006) **24**:2731–40. doi:10.1111/j.1460-9568.2006.05157.x
46. Hentges ST, Otero-Corchon V, Pennock RL, King CM, Low MJ. Proopiomelanocortin expression in both GABA and glutamate neurons. *J Neurosci* (2009) **29**:13684–90. doi:10.1523/JNEUROSCI.3770-09.2009
47. Jarvie BC, Hentges ST. Expression of GABAergic and glutamatergic phenotypic markers in hypothalamic proopiomelanocortin neurons. *J Comp Neurol* (2012) **520**:3863–76. doi:10.1002/cne.23127
48. Wittmann G, Hrabovszky E, Lechan RM. Distinct glutamatergic and GABAergic subsets of hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons

- revealed by in situ hybridization in male rats and mice. *J Comp Neurol* (2013) **521**:3287–302. doi:10.1002/cne.23350
49. Mercer AJ, Hentges ST, Meshul CK, Low MJ. Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. *Front Neurosci* (2013) **7**:19. doi:10.3389/fnins.2013.00019
 50. Balthasar N, Dalggaard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, et al. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* (2005) **123**:493–505. doi:10.1016/j.cell.2005.08.035
 51. Rossi J, Balthasar N, Olson D, Scott M, Berglund E, Lee CE, et al. Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab* (2011) **13**:195–204. doi:10.1016/j.cmet.2011.01.010
 52. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* (2006) **443**:289–95. doi:10.1038/nature05026
 53. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* (2005) **310**:683–5. doi:10.1126/science.1115524
 54. Wu Q, Howell MP, Cowley MA, Palmiter RD. Starvation after AgRP neuron ablation is independent of melanocortin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) **105**:2687–92. doi:10.1073/pnas.0712062105
 55. Wu Q, Boyle MP, Palmiter RD. Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation. *Cell* (2009) **137**:1225–34. doi:10.1016/j.cell.2009.04.022
 56. Aponte Y, Atasoy D, Sternson SM. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci* (2011) **14**:351–5. doi:10.1038/nn.2739
 57. Krashes MJ, Koda S, Ye C, Rogan SC, Adams AC, Cusher DS, et al. Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice. *J Clin Invest* (2011) **121**:1424–8. doi:10.1172/JCI46229
 58. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature* (2012) **488**:172–7. doi:10.1038/nature11270
 59. Krashes MJ, Shah BP, Koda S, Lowell BB. Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metab* (2013) **18**:588–95. doi:10.1016/j.cmet.2013.09.009
 60. Zhan C, Zhou J, Feng Q, Zhang JE, Lin S, Bao J, et al. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *J Neurosci* (2013) **33**:3624–32. doi:10.1523/JNEUROSCI.2742-12.2013
 61. Betley JN, Xu S, Cao ZF, Gong R, Magnus CJ, Yu Y, et al. Neurons for hunger and thirst transmit a negative-valence teaching signal. *Nature* (2015) **521**:180–5. doi:10.1038/nature14416
 62. Carter ME, Soden ME, Zweifel LS, Palmiter RD. Genetic identification of a neural circuit that suppresses appetite. *Nature* (2013) **503**:111–4. doi:10.1038/nature12596
 63. Dietrich MO, Bober J, Ferreira JG, Tellez LA, Mineur YS, Souza DO, et al. AgRP neurons regulate development of dopamine neuronal plasticity and nonfood-associated behaviors. *Nat Neurosci* (2012) **15**:1108–10. doi:10.1038/nn.3147
 64. Chen Y, Lin YC, Kuo TW, Knight ZA. Sensory detection of food rapidly modulates arcuate feeding circuits. *Cell* (2015) **160**:829–41. doi:10.1016/j.cell.2015.01.033
 65. Barth C, Villringer A, Sacher J. Sex hormones affect neurotransmitters and shape the adult female brain during hormonal transition periods. *Front Neurosci* (2015) **9**:37. doi:10.3389/fnins.2015.00037
 66. Ebling FJ. Hypothalamic control of seasonal changes in food intake and body weight. *Front Neuroendocrinol* (2015) **37**:97–107. doi:10.1016/j.yfrne.2014.10.003
 67. Chapman DB, Theodosis DT, Montagnese C, Poulain DA, Morris JF. Osmotic stimulation causes structural plasticity of neurone-glia relationships of the oxytocin but not vasopressin secreting neurones in the hypothalamic supraoptic nucleus. *Neuroscience* (1986) **17**:679–86. doi:10.1016/0306-4522(86)90039-4
 68. Theodosis DT, Montagnese C, Rodriguez F, Vincent JD, Poulain DA. Oxytocin induces morphological plasticity in the adult hypothalamo-neurohypophysial system. *Nature* (1986) **322**:738–40. doi:10.1038/322738a0
 69. Garcia-Segura LM, Baetens D, Naftolin F. Synaptic remodelling in arcuate nucleus after injection of estradiol valerate in adult female rats. *Brain Res* (1986) **366**:131–6. doi:10.1016/0006-8993(86)91287-4
 70. Olmos G, Naftolin F, Perez J, Tranque PA, Garcia-Segura LM. Synaptic remodeling in the rat arcuate nucleus during the estrous cycle. *Neuroscience* (1989) **32**:663–7. doi:10.1016/0306-4522(89)90288-1
 71. Naftolin F, Garcia-Segura LM, Horvath TL, Zsarnovszky A, Demir N, Fadiel A, et al. Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge. *Reprod Sci* (2007) **14**:101–16. doi:10.1177/1933719107301059
 72. Dietrich MO, Horvath TL. Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* (2013) **36**:65–73. doi:10.1016/j.tins.2012.12.005
 73. Pinto S, Roseberry AG, Liu H, Diano S, Shanabrough M, Cai X, et al. Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* (2004) **304**:110–5. doi:10.1126/science.1089459
 74. Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, et al. Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med* (2007) **13**:89–94. doi:10.1038/nm1525
 75. Gyengesi E, Liu ZW, D'Agostino G, Gan G, Horvath TL, Gao XB, et al. Corticosterone regulates synaptic input organization of POMC and NPY/AgRP neurons in adult mice. *Endocrinology* (2010) **151**:5395–402. doi:10.1210/en.2010-0681
 76. Andrews ZB, Liu ZW, Wallingford N, Erion DM, Borok E, Friedman JM, et al. UCP2 mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals. *Nature* (2008) **454**:846–51. doi:10.1038/nature07181
 77. Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S Jr, Lowell BB. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron* (2011) **71**:142–54. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.028
 78. Yang Y, Atasoy D, Su HH, Sternson SM. Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* (2011) **146**:992–1003. doi:10.1016/j.cell.2011.07.039
 79. Liu T, Kong D, Shah BP, Ye C, Koda S, Saunders A, et al. Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron* (2012) **73**:511–22. doi:10.1016/j.neuron.2011.11.027
 80. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* (2000) **407**:908–13. doi:10.1038/35038090
 81. Tong Q, Ye CP, Jones JE, Elmquist JK, Lowell BB. Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance. *Nat Neurosci* (2008) **11**:998–1000. doi:10.1038/nn.2167
 82. Benani A, Hryhorczuk C, Gouaze A, Fioramonti X, Brenachot X, Guissard C, et al. Food intake adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice. *J Neurosci* (2012) **32**:11970–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.0624-12.2012
 83. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* (2005) **6**:626–40. doi:10.1038/nrn1722
 84. Garcia-Caceres C, Fuente-Martín E, Argente J, Chowen JA. Emerging role of glial cells in the control of body weight. *Mol Metab* (2012) **1**:37–46. doi:10.1016/j.molmet.2012.07.001
 85. Buckman LB, Ellacott KL. The contribution of hypothalamic macroglia to the regulation of energy homeostasis. *Front Syst Neurosci* (2014) **8**:212. doi:10.3389/fnsys.2014.00212
 86. Argente-Arizon P, Freire-Regatillo A, Argente J, Chowen JA. Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control. *Front Endocrinol* (2015) **6**:42. doi:10.3389/fendo.2015.00042
 87. Teschemacher AG, Gourine AV, Kasparov S. A role for astrocytes in sensing the brain microenvironment and neuro-metabolic integration. *Neurochem Res* (2015). doi:10.1007/s11064-015-1562-9
 88. Kum W, Cockram CS, Zhu SQ, Teoh R, Vallance-Owen J, Young JD. Insulin binding and effects on pyrimidine nucleoside uptake and incorporation in cultured mouse astrocytes. *J Neurochem* (1987) **49**:1293–300. doi:10.1111/j.1471-4159.1987.tb10023.x
 89. Vielkind U, Walencewicz A, Levine JM, Bohn MC. Type II glucocorticoid receptors are expressed in oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res* (1990) **27**:360–73. doi:10.1002/jnr.490270315
 90. Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* (1997) **21**:2–21. doi:10.1002/(SICI)1098-1136(199709)21:1<2::AID-GLIA>3.0.CO;2-C

91. Cardona-Gomez GP, Chowen JA, Garcia-Segura LM. Estradiol and progesterone regulate the expression of insulin-like growth factor-I receptor and insulin-like growth factor binding protein-2 in the hypothalamus of adult female rats. *J Neurobiol* (2000) **43**:269–81. doi:10.1002/(SICI)1097-4695(20000605)43:3<269::AID-NEU5>3.0.CO;2-D
92. Cardona-Gomez GP, DonCarlos L, Garcia-Segura LM. Insulin-like growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain. *Neuroscience* (2000) **99**:751–60. doi:10.1016/S0306-4522(00)00228-1
93. Cheunguang O, Morris R. Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia* (2005) **52**:228–33. doi:10.1002/glia.20239
94. Hsouchou H, He Y, Kastin AJ, Tu H, Markadakis EN, Rogers RC, et al. Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain* (2009) **132**:889–902. doi:10.1093/brain/awp029
95. Hsouchou H, Pan W, Barnes MJ, Kastin AJ. Leptin receptor mRNA in rat brain astrocytes. *Peptides* (2009) **30**:2275–80. doi:10.1016/j.peptides.2009.08.023
96. Kim JG, Suyama S, Koch M, Jin S, Argente-Arizon P, Argente J, et al. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat Neurosci* (2014) **17**:908–10. doi:10.1038/nn.3725
97. Guilloid-Maximin E, Lorisignol A, Alquier T, Penicaud L. Acute intracarotid glucose injection towards the brain induces specific c-fos activation in hypothalamic nuclei: involvement of astrocytes in cerebral glucose-sensing in rats. *J Neuroendocrinol* (2004) **16**:464–71. doi:10.1111/j.1365-2826.2004.01185.x
98. Marty N, Dallaporta M, Foretz M, Emery M, Tarussio D, Bady I, et al. Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J Clin Invest* (2005) **115**:3545–53. doi:10.1172/JCI26309
99. McDougal DH, Hermann GE, Rogers RC. Astrocytes in the nucleus of the solitary tract are activated by low glucose or glucoprivation: evidence for glial involvement in glucose homeostasis. *Front Neurosci* (2013) **7**:249. doi:10.3389/fnins.2013.00249
100. McDougal DH, Viard E, Hermann GE, Rogers RC. Astrocytes in the hind-brain detect glucoprivation and regulate gastric motility. *Auton Neurosci* (2013) **175**:61–9. doi:10.1016/j.autneu.2012.12.006
101. Fuente-Martin E, Garcia-Caceres C, Granado M, De Ceballos ML, Sanchez-Garrido MA, Sarman B, et al. Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J Clin Invest* (2012) **122**:3900–13. doi:10.1172/JCI64102
102. Buckman LB, Thompson MM, Lippert RN, Blackwell TS, Yull FE, Ellacott KL. Evidence for a novel functional role of astrocytes in the acute homeostatic response to high-fat diet intake in mice. *Mol Metab* (2015) **4**:58–63. doi:10.1016/j.molmet.2014.10.001
103. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* (1999) **22**:208–15. doi:10.1016/S0166-2236(98)01349-6
104. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron* (2014) **81**:728–39. doi:10.1016/j.neuron.2014.02.007
105. Haam J, Halmos KC, Di S, Tasker JG. Nutritional state-dependent ghrelin activation of vasopressin neurons via retrograde trans-neuronal-glia stimulation of excitatory GABA circuits. *J Neurosci* (2014) **34**:6201–13. doi:10.1523/JNEUROSCI.3178-13.2014
106. Yang L, Qi Y, Yang Y. Astrocytes control food intake by inhibiting AGRP neuron activity via adenosine A1 receptors. *Cell Rep* (2015) **11**:798–807. doi:10.1016/j.celrep.2015.04.002
107. Shen L, Tso P, Woods SC, Clegg DJ, Barber KL, Carey K, et al. Brain apolipoprotein E: an important regulator of food intake in rats. *Diabetes* (2008) **57**:2092–8. doi:10.2337/db08-0291
108. Oliet SH, Piet R, Poulain DA. Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* (2001) **292**:923–6. doi:10.1126/science.1059162
109. Oliet SH. Functional consequences of morphological neuroglial changes in the magnocellular nuclei of the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* (2002) **14**:241–6. doi:10.1046/j.0007-1331.2001.00766.x
110. Theodosis DT, Poulain DA, Oliet SH. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol Rev* (2008) **88**:983–1008. doi:10.1152/physrev.00036.2007
111. Bernardinelli Y, Randall J, Janett E, Nikonenko I, König S, Jones EV, et al. Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability. *Curr Biol* (2014) **24**:1679–88. doi:10.1016/j.cub.2014.06.025
112. Garcia-Caceres C, Fuente-Martin E, Burgos-Ramos E, Granado M, Frago LM, Barrios V, et al. Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology* (2011) **152**:1809–18. doi:10.1210/en.2010-1252
113. Horvath TL, Sarman B, Garcia-Caceres C, Enriori PJ, Sotonyi P, Shanabrough M, et al. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**:14875–80. doi:10.1073/pnas.1004282107
114. Gouaze A, Brenachot X, Rigault C, Krezymon A, Rauch C, Nedelec E, et al. Cerebral cell renewal in adult mice controls the onset of obesity. *PLoS One* (2013) **8**:e72029. doi:10.1371/journal.pone.0072029
115. Ziotopoulou M, Mantzoros CS, Hileman SM, Flier JS. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2000) **279**:E838–45.
116. Koch M, Varela L, Kim JG, Kim JD, Hernandez-Nuno F, Simonds SE, et al. Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature* (2015) **519**:45–50. doi:10.1038/nature14260
117. Labouebe G, Liu S, Dias C, Zou H, Wong JC, Karunakaran S, et al. Insulin induces long-term depression of ventral tegmental area dopamine neurons via endocannabinoids. *Nat Neurosci* (2013) **16**:300–8. doi:10.1038/nn.3321
118. Baroncini M, Jissendi P, Cateau-Jonard S, Dewailly D, Pruvo JP, Francke JP, et al. Sex steroid hormones-related structural plasticity in the human hypothalamus. *Neuroimage* (2010) **50**:428–33. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.11.074
119. Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* (2015) **518**:197–206. doi:10.1038/nature14177

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Nuzzaci, Laderrière, Lemoine, Nédélec, Pénicau, Rigault and Benani. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Brain Control of Plasma Cholesterol Involves Polysialic Acid Molecules in the Hypothalamus

Xavier Brenachot¹, Thomas Gautier², Emmanuelle Nédélec¹, Valérie Deckert², Amélie Laderrière¹, Danaé Nuzzaci¹, Caroline Rigault¹, Aleth Lemoine¹, Luc Pénicaud¹, Laurent Lagrost² and Alexandre Benani^{1*}

¹ AgroSup Dijon, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique, Université Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France, ² Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale LNC, U1231, Université Bourgogne-Franche Comté, LipSTIC LabEx, Fondation de Coopération Scientifique Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Sebastien G. Bouret,
University of Southern California, USA

Reviewed by:

Abdelhak Mansouri,
ETH Zurich, Switzerland
Marc Claret,
Consorci Institut D'Investigacions
Biomediques August Pi I Sunyer,
Spain

*Correspondence:

Alexandre Benani
alexandre.benani@u-bourgogne.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Neuroendocrine Science,
a section of the journal
Frontiers in Neuroscience

Received: 06 February 2017

Accepted: 13 April 2017

Published: 03 May 2017

Citation:

Brenachot X, Gautier T, Nédélec E, Deckert V, Laderrière A, Nuzzaci D, Rigault C, Lemoine A, Pénicaud L, Lagrost L and Benani A (2017) Brain Control of Plasma Cholesterol Involves Polysialic Acid Molecules in the Hypothalamus. *Front. Neurosci.* 11:245. doi: 10.3389/fnins.2017.00245

The polysialic acid (PSA) is a large glycan that is added to cell-surface proteins during their post-translational maturation. In the brain, PSA modulates distances between cells and controls the plasticity of the nervous system. In the hypothalamus, PSA is involved in many aspects of energy balance including food intake, osmoregulation, circadian rhythm, and sleep. In this work, we investigated the role of hypothalamic PSA in the regulation of plasma cholesterol levels and distribution. We report that HFD consumption in mice rapidly increased plasma cholesterol, including VLDL, LDL, and HDL-cholesterol. Although plasma VLDL-cholesterol was normalized within the first week, LDL and HDL were still elevated after 2 weeks upon HFD. Importantly, we found that hypothalamic PSA removal aggravated LDL elevation and reduced HDL levels upon HFD. These results indicate that hypothalamic PSA controls plasma lipoprotein profile by circumventing the rise of LDL-to-HDL cholesterol ratio in plasma during overfeeding. Although mechanisms by which hypothalamic PSA controls plasma cholesterol homeostasis remains to be elucidated, these findings also suggest that low level of hypothalamic PSA might be a risk factor for dyslipidemia and cardiovascular diseases.

Keywords: polysialic acid, hypothalamus, atherosclerosis, HDL, LDL, synaptic plasticity

INTRODUCTION

Atherosclerosis is characterized by the accumulation of lipoprotein-derived cholesterol in the arterial wall (Hegele, 2009; Goldstein and Brown, 2015). Among lipoproteins, low-density lipoproteins (LDL) play a critical role in the early-onset of the disease. The oxidative modification of LDL promotes the migration of circulating monocytes into the arterial wall and their differentiation into macrophages that in turn scavenge oxidized LDL in an unregulated manner (Tabas et al., 2007). Accordingly, elevated plasma LDL-cholesterol has long been associated with cardiovascular risk and strongly correlates with cardiovascular events (Brown and Goldstein, 1996). On the opposite, high-density lipoproteins (HDL) cholesterol levels are inversely correlated with atherosclerosis but the molecular basis of this relationship is still unclear (Rye et al., 2009). Lowering blood LDL by statins is the first-line strategy against atherosclerosis (Brautbar and Ballantyne, 2011). Additional drugs can be used in combination with statins to further reduce the cardiovascular risk (Libby, 2005). In this way, strategies aiming at increasing HDL-cholesterol are still under development

but their net effect on atherosclerosis and cardiovascular events still needs to be demonstrated (Libby et al., 2011). In all cases, current pharmacological treatments target cholesterol metabolism in liver, gut, or in the vascular compartment. A better understanding of how the plasma level of lipoproteins is regulated might provide new opportunities to achieve optimal LDL levels as well as LDL-to-HDL cholesterol ratio.

Many lines of evidence have been accumulated showing a neural control of plasma cholesterol (Perez-Tilve et al., 2011; Bruinstroop et al., 2014; Geerling et al., 2014). Earlier studies performed in rats and rabbits have shown that electrical stimulation (Gunn et al., 1960) or lesion (Bernardis and Schnatz, 1971) in the hypothalamus strongly alter plasma cholesterol. More recently, it has been shown that circulating hormones such as leptin (Vanpatten et al., 2004), insulin (Scherer et al., 2016), and Glp-1 (Parlevliet et al., 2012; Panjwani et al., 2013; Taher et al., 2014), trigger brain-mediated regulation of hepatic cholesterol metabolism. Nutrients such as glucose or oleic acid are also able to regulate VLDL hepatic production via a central action (Lam et al., 2007; Yue et al., 2015). Further pharmacological studies indicate that the melanocortin system, which is sensitive to these hormones and nutrients, is a master regulator of plasma cholesterol. The two main antagonistic components of this system are anorexigenic proopiomelanocortin (POMC) neurons and orexigenic neuropeptide Y/agouti-related protein (NPY/AgRP) neurons. NPY neurons enhance VLDL maturation and secretion (van Den Hoek et al., 2004; Stafford et al., 2008; Bruinstroop et al., 2012; Rojas et al., 2012, 2015) whereas POMC neurons modulate HDL uptake by the liver (Perez-Tilve et al., 2010).

Synaptic inputs on POMC and NPY neurons vary in adult mice, depending on the energy state and changes in fuel availability (Vong et al., 2011; Yang et al., 2011; Benani et al., 2012; Liu et al., 2012). Synaptic plasticity of the melanocortin system likely contributes to the accurate control of energy balance (Benani et al., 2012), and altered synaptic plasticity of POMC and NPY neurons might be a risk factor for metabolic diseases (Pinto et al., 2004; Horvath et al., 2010). We identified the polysialic acid molecule (PSA) as a permissive factor for synaptic reorganization of the melanocortin system during overfeeding (Benani et al., 2012). PSA is a large glycan that is added to specific membrane proteins, including the neural cell-adhesion molecule (NCAM), during post-translational maturation. The attachment of PSA to cell-surface proteins reduces cell interactions and promotes synaptic changes and other plasticity-related events in the brain (Rutishauser, 2008). In the hypothalamus, PSA is involved in many aspects of energy balance including food intake (Benani et al., 2012), osmoregulation (Theodosis et al., 1999), circadian rhythm (Shen et al., 1997; Glass et al., 2000; Fedorkova et al., 2002; Prosser et al., 2003), and sleep (Black et al., 2009). In this work, we investigated whether PSA also contributes to the homeostatic control of plasma cholesterol. To examine this hypothesis, we compared plasma cholesterol-containing lipoproteins levels during overfeeding induced by short-term high-fat diet (HFD) in control mice and PSA-depleted mice. Selective loss of PSA in the hypothalamus was achieved

through stereotactic bilateral injection of endoneuraminidase N (endoN), a highly specific bacterial enzyme that cleaves PSA from NCAM residues (Vimr et al., 1984).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male C57Bl/6J mice were purchased from the Charles River Laboratories France. Mice were maintained in temperature and humidity controlled rooms on a 12-h/12-h light/dark cycle, with lights on at 07:00 a.m. They were fed either a standard diet (A04; 5.1% lipids; 3.3 kcal/g) or a high fat diet (HFD, reference number: U8954; 22% lipids; 4.4 kcal/g) purchased from Safe, France. Food and water were provided *ad libitum*. For pair-feeding studies, the daily amount of HFD provided to the pair-fed EndoN-treated group (HFDpf mice) was matched to that consumed by the vehicle-treated group fed a HFD (HFD mice). Daily food intake was recorded manually. Experiments were performed on 8-week old mice. All procedures were in agreement with the European Directive 2010/63/UE and were approved by the French Ministry of Research (agreement #00853.01) and by the local ethic committee, i.e., "Comité d'Ethique de l'Expérimentation Animale Grand Campus Dijon" (national identification number: #105).

Bilateral endoN Injections in the Hypothalamus

Depletion of PSA in the hypothalamus was achieved by bilateral intra-parenchymal injections of EndoN (0.28 units/side, prepared in phosphate buffer with glycerol, injected volume: 400 nl/side, rate of infusion: 100 nl/min; EuroBio). Injections were performed under isoflurane anesthesia as previously described (Benani et al., 2012; Brenachot et al., 2014). Stereotactic coordinates for injection were: -1.4 mm posterior to the Bregma, ± 0.4 mm lateral to the sagittal suture, and -5.6 mm below the skull surface. Control mice received artificial cerebrospinal fluid (aCSF; Tocris Bioscience). Mice were housed individually after surgery. They were kept under controlled temperature and rehydrated with intra-peritoneal injection of saline. They were also injected subcutaneously with buprecare (1 mg/kg) to reduce post-operative pain. Mice were allowed 2 days for recovery before experiment, i.e., before HFD introduction.

Plasma Lipid Analyses

Mice were fasted 4 h (with bedding changed and food removed) at 10.00 a.m. and blood samples were collected at 2.00 p.m. under anesthesia with isoflurane. Blood was drawn from the retro-orbital plexus on heparin-containing tubes. Plasma was isolated by a 8,000-rpm spin (7,230 g) at 4°C and samples were stored at -80°C before analysis. Plasma VLDL, LDL, and HDL were isolated by sequential ultracentrifugation as the $d < 1.006$ g/ml, the 1.006 g/ml $< d < 1.063$ g/ml, and the 1.063 g/ml $< d < 1.21$ g/ml fractions, respectively (Hurt-Camejo et al., 2013). Densities were adjusted with KBr solutions. The centrifugation steps for VLDL, LDL, and HDL consisted of 3, 4, and 5-h runs, respectively, at 100,000 rpm (436,000 g) in a TLA-100 rotor on a Beckman Optima TLX ultracentrifuge (Palo Alto, CA). Cholesterol levels in total plasma and in lipoprotein fractions

were measured enzymatically with a commercially available kit (Cholesterol FS, Diasys, Holzheim, Germany).

VLDL Secretion Rate Assay

VLDL production rate was determined by measuring the increase in plasma triglyceride levels after injection of an inhibitor of lipolysis as previously described (Sberna et al., 2011). Briefly, 4-h fasted mice were injected intraperitoneally with Poloxamer 407 (P-407, Lasersen, Etampes, France) (1 g/kg body weight). Blood samples were drawn into EDTA-containing tubes and plasma was isolated by centrifugation as described above. Plasma triglycerides levels were determined enzymatically with a commercially available kit (Triglyceride FS, Diasys, Holzheim, Germany). The VLDL triglyceride production rate was calculated from the slope of the curve between 30 and 120 min after P-407 injection and expressed as g/l/min.

Statistical Analysis

All data are expressed as means. Error bars indicate SEM. Multiple comparisons of groups were performed by one-way ANOVA using Prism 5.0 software (GraphPad Software). Newman-Keuls test was used in *post hoc* analyses to compare groups when main effects reached significance. Equality of variances and normality of distribution were checked prior to analysis using Bartlett-test and Kolmogorov-Smirnov-test, respectively. When variances were significantly different or if the data fail the normality test, the Mann-Whitney test was applied. Calculated *p*-values below 0.05 were considered significant. Finally, significant differences between groups were indicated on each graphic representation with a letter and bars without a common letter are significantly different.

RESULTS

Plasma Lipoproteins Profile Is Rapidly Altered upon HFD

We first characterized how plasma cholesterol was regulated upon short-term HFD. For that purpose, we fed mice a HFD for 1 day to 2 weeks and measured total plasma cholesterol and VLDL-, LDL-, and HDL-cholesterol. Control mice were kept on standard diet (STD). HFD consumption for 1 day was sufficient to raise total plasma cholesterol (**Figure 1A**). This increase was a result of higher VLDL-, LDL-, and HDL-cholesterol levels (**Figures 1B–D**). Total plasma cholesterol, as well as LDL- and HDL-cholesterol, remained elevated during the 2-week exposure to HFD (**Figures 1A,C,D**). However, VLDL-cholesterol returned to basal values after 1 week while mice were still kept on HFD (**Figure 1B**).

Hypothalamic PSA Removal Alters Plasma Lipoprotein Homeostasis

To assess the role of hypothalamic PSA in the regulation of circulating cholesterol, we compared levels of plasma cholesterol after 1-week HFD in control and endoN-treated mice (**Figure 2A**). On STD, daily food intake of control mice that received intrahypothalamic endoN treatment was stable and similar to that of mice receiving aCSF injections. As a

result, cumulative energy intake over a week was similar for these two groups (**Figure 2B**). The absence of behavioral change upon endoN treatment suggests that endoN *per se* does not elicit obvious anorectic inflammatory response. Although this compound did not modify energy intake over a week in mice fed a STD, endoN treatment increased it on HFD (**Figure 2B**). This typical hyperphagic response induced on HFD by the endoN treatment reveals a PSA-dependent adaptive behavioral response to dietary fat (Benani et al., 2012). To appreciate the contribution of endoN treatment on blood parameters during HFD, irrespective of associated hyperphagia, we pair-fed endoN-treated mice (HFDpf) limiting them to the amount of calories ingested by vehicle-treated control group on HFD (**Figure 2B**; HFD/aCSF: 4.83 ± 0.14 , HFDpf/endoN: 5.04 ± 0.1 kcal/g of body weight over a week). EndoN treatment did not alter plasma cholesterol levels and distribution in STD-fed mice (**Figures 2C–F**). EndoN treatment did not affect total cholesterol or VLDL-cholesterol in HFD-fed mice too (**Figures 2C,D**). However, endoN injection in the hypothalamus slightly increased LDL-cholesterol and significantly reduced HDL-cholesterol in HFD-fed mice (**Figures 2E,F**). Similar effects of endoN treatment on plasma cholesterol were obtained in mice fed a HFD *ad libitum* and in HFD pair-fed mice (**Figures 2C–F**). Interestingly, LDL/HDL ratio or non-HDL/HDL ratio remained unchanged after 1-week HFD (**Figures 2G,H**), and endoN treatment did not change these ratios upon STD. However, by affecting both plasma LDL and HDL levels, endoN caused elevation of LDL/HDL and non-HDL/HDL ratios in HFD-fed mice, independently of changes in food intake.

Hypothalamic PSA Does Not Control Hepatic VLDL Secretion

We next sought to determine how hypothalamic PSA controls plasma cholesterol in HFD-fed mice. Because neural circuits in the brain directly control cholesterol metabolism by the liver (Perez-Tilve et al., 2010), we investigated the hepatic function after hypothalamic PSA manipulation. We assessed hepatic production of VLDL in mice that received endoN or vehicle in the hypothalamus. As before, mice were fed either a STD or HFD for 1 week, or were pair-fed on HFD to prevent endoN-induced hyperphagia as a confounding factor. Hepatic VLDL production rate was determined by measuring the kinetics of triglyceride increase after inhibition of VLDL triglyceride hydrolysis by intraperitoneal injection of poloxamer, an inhibitor of lipoprotein lipase (LPL) (**Figure 3A**). Ingestion of HFD for 1 week decreased VLDL production rate compared to STD-fed mice (**Figure 3B**). EndoN injection in the hypothalamus did not modify VLDL production rate in STD-fed mice nor during short-term HFD.

DISCUSSION

In the present study, we report that acute overfeeding induced by HFD consumption rapidly increased plasma cholesterol levels in mice. This was noticeable as early as 1 day after HFD introduction. Characterization of major circulating

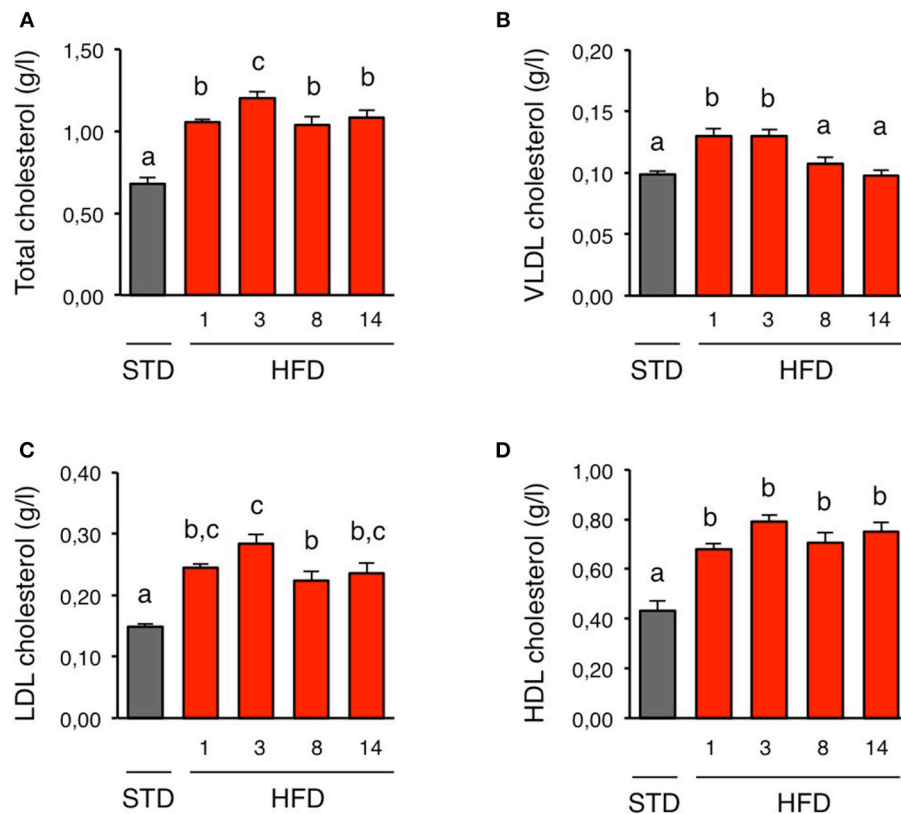


FIGURE 1 | Plasma lipoproteins profile is rapidly altered upon HFD. (A–D) Plasma kinetics of total cholesterol, VLDL cholesterol, LDL cholesterol, and HDL cholesterol in mice during a 2 week-high fat diet (HFD; red bars). Control mice were fed with a standard diet (STD; gray bars). $n = 5–6$ for each time-point. Data are presented as mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA and Newman–Keuls multiple comparison test. Bars without a common letter are significantly different.

cholesterol-containing lipoproteins revealed that VLDL, LDL, and HDL cholesterol were all elevated after 1 day on HFD. Interestingly, VLDL-cholesterol returned to basal value within a week although mice were still kept on HFD. Moreover, LDL/HDL as well as non-HDL/HDL cholesterol ratio, remained unchanged after 1-week HFD. These results support the existence of homeostatic mechanisms that limit the rise of VLDL-cholesterol during acute overfeeding and that maintain a balanced plasma lipoproteins profile. Our findings are in line with previous works that evidenced early adaptation of cholesterol metabolism during short-term HFD, and they further show that such mechanism occurs more rapidly than previously anticipated (Srivastava et al., 1991; Hernández Vallejo et al., 2009; Kahle et al., 2013).

We also found that 1-week HFD caused significant reduction of hepatic VLDL production in mice. Opposite effect has been reported in rats after 3-day HFD (Lam et al., 2007; Yue et al., 2012). Apart from possible inter-species differences, this discrepancy might result from successive and opposite modifications in hepatic lipid metabolism upon HFD. Such sequential effect has been already described for the insulin pathway during the time-course of short-term HFD. Actually, progressive β -cell mass expansion in pancreas upon HFD might compensate early hyperglycemia, glucose intolerance, and insulin

resistance (Wang et al., 2001; Ahrén and Pacini, 2002; Winzell and Ahrén, 2004; Lee et al., 2011; Stamateris et al., 2013). Since insulin is a strong regulator of cholesterol metabolism (Sparks and Sparks, 1994; Choi and Ginsberg, 2011), sequential changes in insulin secretion and sensitivity might also explain fluctuations in hepatic VLDL release during 1-week HFD. Short-term HFD is also known to induce gene expression reprogramming in the liver affecting several enzymes and transporters involved in the lipoprotein metabolism. For instance, coordinated down-regulation of *Acc*, *Fas*, and *Hmgcr*, occurs in mouse liver after 1-week HFD, suggesting a reduction of VLDL synthesis on HFD (de Fourmestreaux et al., 2004; Hernández Vallejo et al., 2009). These molecular data are consistent with a drop in VLDL release seen in this study. Altogether, these results support the concept that metabolism adapts to compensate for acute cholesterol overload. Such homeostatic response likely results from complementary mechanisms taking place in various organs or tissues. Indeed, 1-week HFD is sufficient to change postprandial release, composition and size of chylomicrons by modulating intestinal lipid metabolism (Hernández Vallejo et al., 2009). Early transcriptional regulation of fatty acid metabolism-related enzymes has been observed in jejunum and duodenum upon 3-day HFD, indicating that the intestine is highly reactive

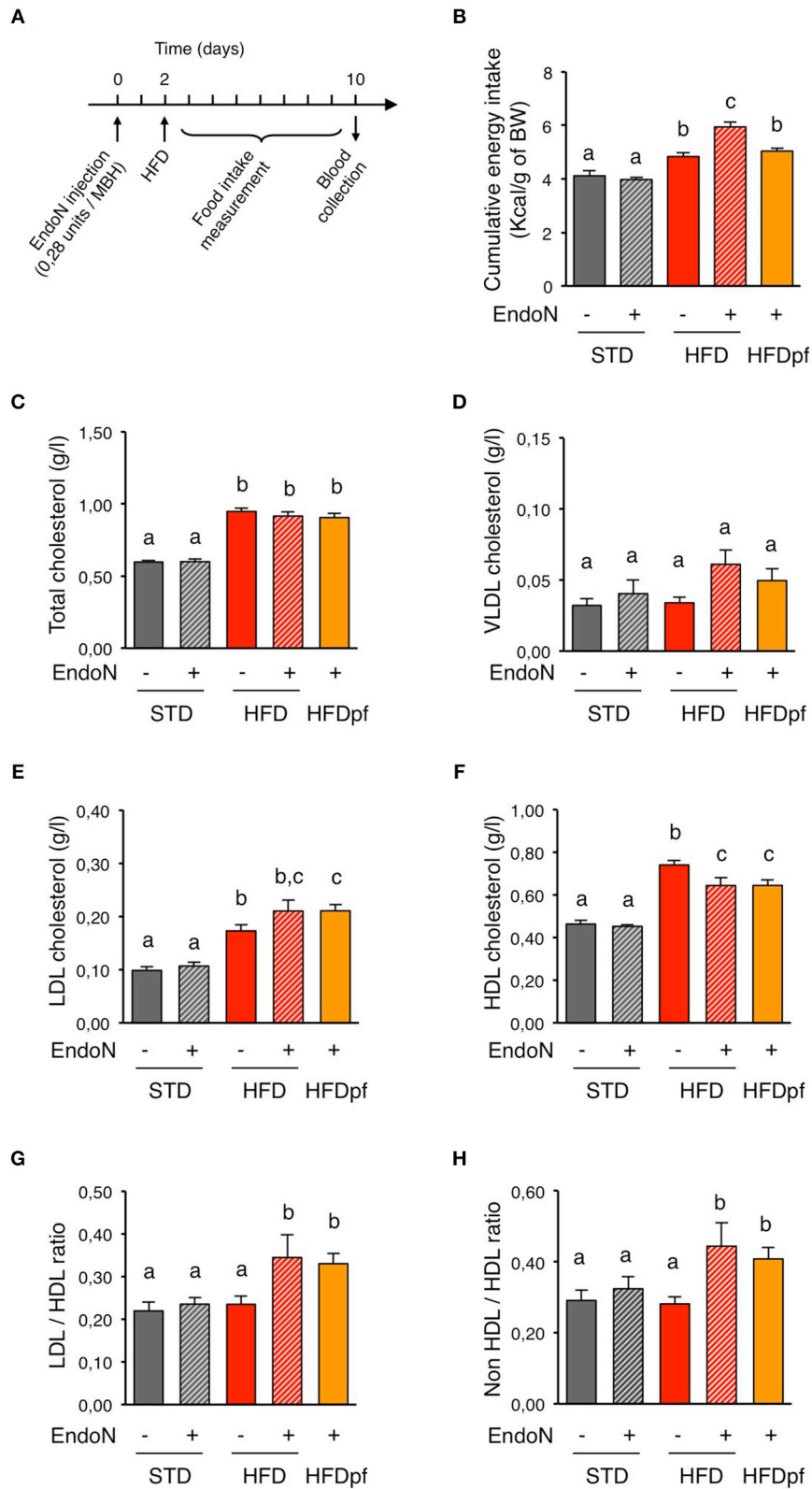


FIGURE 2 | Hypothalamic PSA removal alters plasma lipoproteins homeostasis. (A) Picture showing the experimental protocol used to investigate the regulation of plasma cholesterol by hypothalamic PSA. Day 0: To remove hypothalamic PSA, endoN was injected bilaterally in the hypothalamus of mice (0.28 (Continued)

FIGURE 2 | Continued

units/site), targeting the mediobasal hypothalamus (MBH). Control mice received artificial cerebrospinal fluid (aCSF). Mice were given 2 days to recover from stereotaxic surgery prior to the nutritional challenge. Day 2: Mice were fed either a standard (STD) or a high fat diet (HFD) for 8 days and blood samples were obtained at the end of the experiment (Day 10). **(B)** Effect of intra-hypothalamic endoN injection on cumulative energy intake over a week in mice fed a STD or a HFD. **(C–F)** Effect of intra-hypothalamic endoN injection on plasma total cholesterol, VLDL cholesterol, LDL cholesterol, and HDL cholesterol in mice fed a STD or a HFD for 8 days. **(G,H)** Effect of intra-hypothalamic endoN injection on LDL/HDL and non-HDL/HDL cholesterol ratios in mice fed a STD or a HFD for 8 days. $n = 10$ for STD+aCSF, $n = 6$ for STD+endoN, $n = 8$ for HFD+aCSF, $n = 8$ HFD+endoN, $n = 7$ for HFD pair-fed+endoN. Data are presented as mean \pm SEM and were analyzed by nonparametric Mann–Whitney test. Bars without a common letter are significantly different.

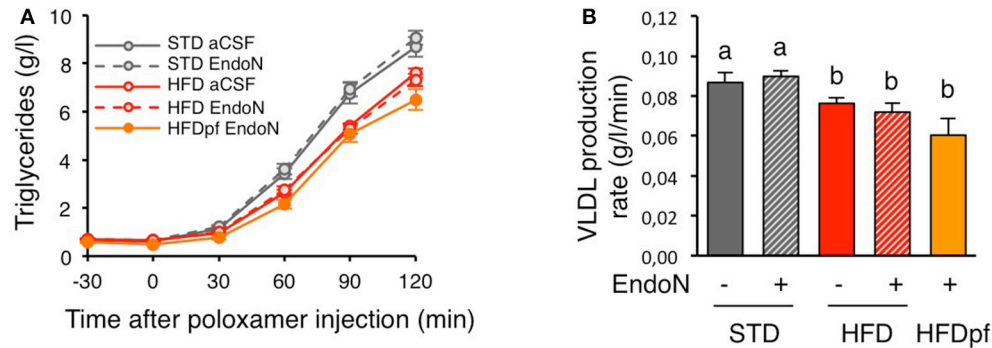


FIGURE 3 | Hypothalamic PSA does not control hepatic VLDL secretion. (A) Plasma triglycerides concentration after intraperitoneal injection of poloxamer 407 ($t = 0$) in 4 h fasted mice. Prior to poloxamer injection, mice received bilateral injection of endoN (0.28 units/site) or aCSF in the hypothalamus and were fed a standard (STD) or a high fat diet (HFD) for 8 days, as described in **Figure 2A**. **(B)** Effect of intra-hypothalamic endoN injection on VLDL production rate in mice fed a STD or a HFD for 8 days. VLDL production rate calculated from the slope of the rise of plasma triglycerides after poloxamer injection. $n = 11$ for STD+aCSF, $n = 13$ for STD+endoN, $n = 22$ for HFD+aCSF, $n = 16$ HFD+endoN, $n = 6$ for HFD pair-fed+endoN. Data are presented as mean \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA and parametric Newman–Keuls multiple comparison test. Bars without a common letter are significantly different.

to dietary fat (Clara et al., 2016). In the skeletal muscle, HFD suppresses lipogenic genes within a week and increases oxidative metabolism and markers of type I fiber, showing the metabolic adaptability of this tissue too (de Fourmestreaux et al., 2004; Wilson et al., 2007; de Wilde et al., 2008). Similar transcriptional effects also occur in the adipose tissue (Voigt et al., 2013). Circuits in the central nervous system control most, if not all, peripheral metabolic responses that are triggered during energy imbalance (Morton et al., 2006; Myers and Olson, 2012). In this work, we bring the first evidence that hypothalamic PSA, a modulator of neuronal function, is critical to maintain LDL-to-HDL ratio upon HFD consumption on the short term. Given the role of PSA in the control of synaptic plasticity (Rutishauser, 2008), these findings suggest that blood cholesterol homeostasis might be regulated via neuronal rewiring within hypothalamic circuits. Above all, this shows that hypothalamic PSA coordinates many aspects of metabolism and energy balance including peripheral lipid metabolism as well as food intake (Benani et al., 2012), osmoregulation (Theodosios et al., 1999), circadian rhythm (Shen et al., 1997; Glass et al., 2000; Fedorkova et al., 2002; Prosser et al., 2003), and sleep (Black et al., 2009). However, mechanisms by which hypothalamic PSA affects plasma levels of LDL and HDL cholesterol remains to be elucidated. Current models suggest that brain controls circulating cholesterol in a neuroendocrine feedback loop through autonomic effects on liver function (Perez-Tilve et al., 2011; Bruinstroop et al., 2014; Geerling et al., 2014). In particular, it has been shown that the melanocortin

system regulates hepatic lipoproteins production and uptake via sympathetic innervation (Bruinstroop et al., 2012; Rojas et al., 2015). Nevertheless, removal of hypothalamic PSA did not alter hepatic VLDL secretion. Thus, to affect plasma levels of LDL and HDL *via* the liver, hypothalamic PSA would act on others hepatic mechanisms that have not been investigated in this work, such as cholesterol uptake, catabolism, or excretion. Since the brain also controls lipid uptake in white adipose tissue and intestinal chylomicron production (Nogueiras et al., 2007; Farr et al., 2015), it is conceivable that hypothalamic PSA modulates lipoprotein metabolism other than in the liver.

Neuronal circuits involved in the PSA-mediated regulation of blood cholesterol metabolism have not been investigated in this study. Previous studies from our group indicate that endoN injections lead to a complete loss of PSA in the whole hypothalamus (Benani et al., 2012). Investigation of circuits underlying the brain control of peripheral lipid metabolism reveals several neuronal targets and signaling pathways located in the hypothalamus, including NPY, POMC, MCH, and glutamatergic neurons (van Den Hoek et al., 2004; Nogueiras et al., 2007; Stafford et al., 2008; Perez-Tilve et al., 2010; Bruinstroop et al., 2012; Rojas et al., 2012; Yue et al., 2012; Imbernon et al., 2013; Rojas et al., 2015). These pharmacological studies show a high degree of specialization among the neuronal circuits that control peripheral lipid metabolism. Actually, distinct neuronal sub-populations are engaged in either adipocyte or hepatocyte metabolism modulation (Imbernon

et al., 2013). Furthermore, hypothalamic pathways seem to control VLDL production and HDL uptake separately (Stafford et al., 2008; Perez-Tilve et al., 2010). Since endoN treatment is not cell-selective, we can suppose that PSA-dependent regulation of plasma cholesterol likely integrates inputs from different neuronal circuits. In addition, astrocytes located in the hypothalamus, which also express PSA (Pierre et al., 2001) and control several aspects of energy homeostasis (García-Cáceres et al., 2012; Argente-Arizón et al., 2015), might be involved in PSA-dependent regulation of peripheral lipoproteins metabolism as well.

Lipoproteins profile and metabolism differ in the peripheral circulation and the central nervous system (Pfrieger and Ungerer, 2011; Mahley, 2016). In the adult, only HDL particles are found in the brain. This peculiar feature in lipoproteins reflects the isolation of the brain from the periphery by the blood-brain barrier and the specific metabolism of lipoproteins in the brain. In particular, astrocytes are responsible for the largest production of the most abundant apoE-containing HDL-like lipoproteins that redistribute lipids in the central nervous system. Further studies are needed to examine the potential role of brain PSA, whose expression declines in Alzheimer's disease (Murray et al., 2016), in the maintenance of cholesterol homeostasis in the central compartment as well.

To conclude, this work uncovers a new role for hypothalamic PSA in modulating plasma lipoprotein profile. Although we show that hypothalamic PSA is beneficial by circumventing elevation of LDL-to-HDL cholesterol ratio during overfeeding, neuronal

pathways and peripheral mechanisms engaged in this control remain to be elucidated. Nonetheless, our findings suggest that reduced level of hypothalamic PSA might be a risk factor for dyslipidemia and cardiovascular diseases.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Study conception and design: XB, TG, LL and AB; Acquisition of data: XB, TG, EN, VD, AmL, DN, CR and ALL; Analysis and interpretation of data: XB, TG, LL and AB; Drafting of manuscript: TG, VD, LP, LL and AB.

FUNDING

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Université de Bourgogne-Franche Comté (grant BQR), the Agence Nationale de la Recherche (ANR; ANR-13-JSV1-0003-01), and by a French Government grant managed by the ANR (Program "Investissements d'Avenir" ANR-11-LABX-0021-01-LipSTIC LabEx).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the animal facility staff, especially to Anne Lefranc for the good care to animals. We also kindly acknowledge Michel Tavan for technical help.

REFERENCES

- Ahrén, B., and Pacini, G. (2002). Insufficient islet compensation to insulin resistance vs. reduced glucose effectiveness in glucose-intolerant mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283, E738–E744. doi: 10.1152/ajpendo.0019.9.2002
- Argente-Arizón, P., Freire-Regatillo, A., Argente, J., and Chowen, J. A. (2015). Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 6:42. doi: 10.3389/fendo.2015.00042
- Benani, A., Hryhorczuk, C., Gouazé, A., Fioramonti, X., Brenachot, X., Guissard, C., et al. (2012). Food intake adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice. *J. Neurosci.* 32, 11970–11979. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0624-12.2012
- Bernardis, L. L., and Schnatz, J. D. (1971). Varying degrees of ventromedial hypothalamic destruction in the weanling rat and its effect on plasma triglyceride and cholesterol levels. *Experientia* 27, 1082–1083. doi: 10.1007/BF02138894
- Black, M. A., Deurveilher, S., Seki, T., Marsh, D. R., Rutishauser, U., Rafuse, V. F., et al. (2009). Role of polysialylated neural cell adhesion molecule in rapid eye movement sleep regulation in rats. *Eur. J. Neurosci.* 30, 2190–2204. doi: 10.1111/j.1460-9568.2009.07000.x
- Brautbar, A., and Ballantyne, C. M. (2011). Pharmacological strategies for lowering LDL cholesterol: statins and beyond. *Nat. Rev. Cardiol.* 8, 253–265. doi: 10.1038/nrcardio.2011.2
- Brenachot, X., Rigault, C., Nédélec, E., Laderrière, A., Khanam, T., Gouazé, A., et al. (2014). The histone acetyltransferase MOF activates hypothalamic polysialylation to prevent diet-induced obesity in mice. *Mol. Metab.* 3, 619–629. doi: 10.1016/j.molmet.2014.05.006
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1996). Heart attacks: gone with the century? *Science* 272:629. doi: 10.1126/science.272.5262.629
- Bruinstroop, E., Fliers, E., and Kalsbeek, A. (2014). Hypothalamic control of hepatic lipid metabolism via the autonomic nervous system. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 28, 673–684. doi: 10.1016/j.beem.2014.05.001
- Bruinstroop, E., Pei, L., Ackermans, M. T., Foppen, E., Borgers, A. J., Kwakkel, J., et al. (2012). Hypothalamic neuropeptide Y (NPY) controls hepatic VLDL-triglyceride secretion in rats via the sympathetic nervous system. *Diabetes* 61, 1043–1050. doi: 10.2337/db11-1142
- Choi, S. H., and Ginsberg, H. N. (2011). Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* 22, 353–363. doi: 10.1016/j.tem.2011.04.007
- Clara, R., Schumacher, M., Ramachandran, D., Fedele, S., Krieger, J. P., Langhans, W., et al. (2016). Metabolic adaptation of the small intestine to short- and medium-term high-fat diet exposure. *J. Cell Physiol.* 232, 167–175. doi: 10.1002/jcp.25402
- de Fourmestraux, V., Neubauer, H., Poussin, C., Farmer, P., Falquet, L., Burcelin, R., et al. (2004). Transcript profiling suggests that differential metabolic adaptation of mice to a high fat diet is associated with changes in liver to muscle lipid fluxes. *J. Biol. Chem.* 279, 50743–50753. doi: 10.1074/jbc.M408014200
- de Wilde, J., Mohren, R., Van Den Berg, S., Boekschoten, M., Dijk, K. W., De Groot, P., et al. (2008). Short-term high fat-feeding results in morphological and metabolic adaptations in the skeletal muscle of C57BL/6 mice. *Physiol. Genomics* 32, 360–369. doi: 10.1152/physiolgenomics.00219.2007
- Farr, S., Baker, C., Naples, M., Taher, J., Iqbal, J., Hussain, M., et al. (2015). Central nervous system regulation of intestinal lipoprotein metabolism by glucagon-like peptide-1 via a brain-gut axis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 35, 1092–1100. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304873
- Fedorokova, L., Rutishauser, U., Prosser, R., Shen, H., and Glass, J. D. (2002). Removal of polysialic acid from the SCN potentiates nonphotic circadian phase resetting. *Physiol. Behav.* 77, 361–369. doi: 10.1016/S0031-9384(02)00880-6

- García-Cáceres, C., Fuente-Martín, E., Argente, J., and Chowen, J. A. (2012). Emerging role of glial cells in the control of body weight. *Mol. Metab.* 1, 37–46. doi: 10.1016/j.molmet.2012.07.001
- Geerling, J. J., Boon, M. R., Kooijman, S., Parlevliet, E. T., Havekes, L. M., Romijn, J. A., et al. (2014). Sympathetic nervous system control of triglyceride metabolism: novel concepts derived from recent studies. *J. Lipid Res.* 55, 180–189. doi: 10.1194/jlr.R045013
- Glass, J. D., Shen, H., Fedorkova, L., Chen, L., Tomasiewicz, H., and Watanabe, M. (2000). Polysialylated neural cell adhesion molecule modulates photic signaling in the mouse suprachiasmatic nucleus. *Neurosci. Lett.* 280, 207–210. doi: 10.1016/S0304-3940(00)00786-2
- Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2015). A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell* 161, 161–172. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.036
- Gunn, C. G., Friedman, M., and Byers, S. O. (1960). Effect of chronic hypothalamic stimulation upon cholesterol-induced atherosclerosis in the rabbit. *J. Clin. Invest.* 39, 1963–1972. doi: 10.1172/JCI104221
- Hegele, R. A. (2009). Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat. Rev. Genet.* 10, 109–121. doi: 10.1038/nrg2481
- Hernández Vallejo, S. J., Alqub, M., Luquet, S., Cruciani-Guglielmacci, C., Delerive, P., Lobaccaro, J. M., et al. (2009). Short-term adaptation of postprandial lipoprotein secretion and intestinal gene expression to a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296, G782–G792. doi: 10.1152/ajpgi.90324.2008
- Horvath, T. L., Sarman, B., García-Cáceres, C., Enriori, P. J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., 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, 14875–14880. doi: 10.1073/pnas.1004282107
- Hurt-Camejo, E., Gautier, T., Rosengren, B., Dikkers, A., Behrendt, M., Grass, D. S., et al. (2013). Expression of type IIA secretory phospholipase A2 inhibits cholesteryl ester transfer protein activity in transgenic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2707–2714. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.301410
- Imbernon, M., Beiroa, D., Vázquez, M. J., Morgan, D. A., Veyrat-Durebex, C., Porteiro, B., et al. (2013). Central melanin-concentrating hormone influences liver and adipose metabolism via specific hypothalamic nuclei and efferent autonomic/JNK1 pathways. *Gastroenterology* 144, 636.e6–649.e6. doi: 10.1053/j.gastro.2012.10.051
- Kahle, M., Horsch, M., Fridrich, B., Seelig, A., Schultheiß, J., Leonhardt, J., et al. (2013). Phenotypic comparison of common mouse strains developing high-fat diet-induced hepatosteatosis. *Mol. Metab.* 2, 435–446. doi: 10.1016/j.molmet.2013.07.009
- Lam, T. K., Gutierrez-Juarez, R., Pocai, A., Bhanot, S., Tso, P., Schwartz, G. J., et al. (2007). Brain glucose metabolism controls the hepatic secretion of triglyceride-rich lipoproteins. *Nat. Med.* 13, 171–180. doi: 10.1038/nm1540
- Lee, Y. S., Li, P., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Lu, M., Kim, J. I., et al. (2011). Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 60, 2474–2483. doi: 10.2337/db11-0194
- Libby, P. (2005). The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 1225–1228. doi: 10.1016/j.jacc.2005.07.006
- Libby, P., Ridker, P. M., and Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317–325. doi: 10.1038/nature10146
- Liu, T., Kong, D., Shah, B. P., Ye, C., Koda, S., Saunders, A., et al. (2012). Fasting activation of AgRP neurons requires NMDA receptors and involves spinogenesis and increased excitatory tone. *Neuron* 73, 511–522. doi: 10.1016/j.neuron.2011.11.027
- Mahley, R. W. (2016). Central nervous system lipoproteins: apoE and regulation of cholesterol metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1305–1315. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307023
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., and Schwartz, M. W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295. doi: 10.1038/nature05026
- Murray, H. C., Low, V. F., Swanson, M. E., Dieriks, B. V., Turner, C., Faull, R. L., et al. (2016). Distribution of PSA-NCAM in normal, Alzheimer's and Parkinson's disease human brain. *Neuroscience* 330, 359–375. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.003
- Myers, M. G. Jr., and Olson, D. P. (2012). Central nervous system control of metabolism. *Nature* 491, 357–363. doi: 10.1038/nature11705
- Nogueiras, R., Wiedmer, P., Perez-Tilve, D., Veyrat-Durebex, C., Keogh, J. M., Sutton, G. M., et al. (2007). The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 117, 3475–3488. doi: 10.1172/JCI31743
- Panjwani, N., Mulvihill, E. E., Longuet, C., Yusta, B., Campbell, J. E., Brown, T. J., et al. (2013). GLP-1 receptor activation indirectly reduces hepatic lipid accumulation but does not attenuate development of atherosclerosis in diabetic male ApoE(-/-) mice. *Endocrinology* 154, 127–139. doi: 10.1210/en.2012-1937
- Parlevliet, E. T., Wang, Y., Geerling, J. J., Schröder-Van Der Elst, J. P., Picha, K., O'neil, K., et al. (2012). GLP-1 receptor activation inhibits VLDL production and reverses hepatic steatosis by decreasing hepatic lipogenesis in high-fat-fed APOE*3-Leiden mice. *PLoS ONE* 7:e49152. doi: 10.1371/journal.pone.0049152
- Perez-Tilve, D., Habbeger, K. M., Tschöp, M. H., and Hofmann, S. M. (2011). Neural regulation of cholesterol metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 22, 283–287. doi: 10.1097/MOL.0b013e328348a459
- Perez-Tilve, D., Hofmann, S. M., Basford, J., Nogueiras, R., Pfluger, P. T., Patterson, J. T., et al. (2010). Melanocortin signaling in the CNS directly regulates circulating cholesterol. *Nat. Neurosci.* 13, 877–882. doi: 10.1038/nn.2569
- Pfriege, F. W., and Ungerer, N. (2011). Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.* 50, 357–371. doi: 10.1016/j.plipres.2011.06.002
- Pierre, K., Bonhomme, R., Dupouy, B., Poulain, D. A., and Theodosis, D. T. (2001). The polysialylated neural cell adhesion molecule reaches cell surfaces of hypothalamic neurons and astrocytes via the constitutive pathway. *Neuroscience* 103, 133–142. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00536-4
- Pinto, S., Roseberry, A. G., Liu, H., Diano, S., Shanabrough, M., Cai, X., et al. (2004). Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin. *Science* 304, 110–115. doi: 10.1126/science.1089459
- Prosser, R. A., Rutishauser, U., Ungers, G., Fedorkova, L., and Glass, J. D. (2003). Intrinsic role of polysialylated neural cell adhesion molecule in photic phase resetting of the Mammalian circadian clock. *J. Neurosci.* 23, 652–658.
- Rojas, J. M., Bruinstroop, E., Printz, R. L., Aljagic-Boers, A., Foppen, E., Turney, M. K., et al. (2015). Central nervous system neuropeptide Y regulates mediators of hepatic phospholipid remodeling and very low-density lipoprotein triglyceride secretion via sympathetic innervation. *Mol. Metab.* 4, 210–221. doi: 10.1016/j.molmet.2015.01.004
- Rojas, J. M., Stafford, J. M., Saadat, S., Printz, R. L., Beck-Sickinger, A. G., and Niswender, K. D. (2012). 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.* 303, E1479–E1488. doi: 10.1152/ajpendo.00351.2012
- Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 26–35. doi: 10.1038/nrn2285
- Rye, K. A., Bursill, C. A., Lambert, G., Tabet, F., and Barter, P. J. (2009). The metabolism and anti-atherogenic properties of HDL. *J. Lipid Res.* 50(Suppl.), S195–S200. doi: 10.1194/jlr.R800034-JLR200
- Sberna, A. L., Assem, M., Xiao, R., Ayers, S., Gautier, T., Guiu, B., et al. (2011). Constitutive androstane receptor activation decreases plasma apolipoprotein B-containing lipoproteins and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2232–2239. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.222497
- Scherer, T., Lindtner, C., O'hare, J., Hackl, M., Zielinski, E., Freudenthaler, A., et al. (2016). Insulin regulates hepatic triglyceride secretion and lipid content via signaling in the brain. *Diabetes* 5, 1511–1520. doi: 10.2337/db15-1552
- Shen, H., Watanabe, M., Tomasiewicz, H., Rutishauser, U., Magnuson, T., and Glass, J. D. (1997). Role of neural cell adhesion molecule and polysialic acid in mouse circadian clock function. *J. Neurosci.* 17, 5221–5229.
- Sparks, J. D., and Sparks, C. E. (1994). Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochim. Biophys. Acta* 1215, 9–32. doi: 10.1016/0005-2760(94)90088-4
- Srivastava, R. A., Jiao, S., Tang, J. J., Pflieger, B. A., Kitchens, R. T., and Schonfeld, G. (1991). *In vivo* regulation of low-density lipoprotein receptor and apolipoprotein B gene expressions by dietary fat and cholesterol in inbred strains of mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1086, 29–43. doi: 10.1016/0005-2760(91)90151-7
- Stafford, J. M., Yu, F., Printz, R., Hasty, A. H., Swift, L. L., and Niswender, K. D. (2008). Central nervous system neuropeptide Y signaling modulates VLDL triglyceride secretion. *Diabetes* 57, 1482–1490. doi: 10.2337/db07-1702

- Stamateris, R. E., Sharma, R. B., Hollern, D. A., and Alonso, L. C. (2013). Adaptive β -cell proliferation increases early in high-fat feeding in mice, concurrent with metabolic changes, with induction of islet cyclin D2 expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 305, E149–E159. doi: 10.1152/ajpendo.0004.0.2013
- Tabas, I., Williams, K. J., and Borén, J. (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* 116, 1832–1844. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.676890
- Taher, J., Baker, C. L., Cuizon, C., Masoudpour, H., Zhang, R., Farr, S., et al. (2014). GLP-1 receptor agonism ameliorates hepatic VLDL overproduction and *de novo* lipogenesis in insulin resistance. *Mol. Metab.* 3, 823–833. doi: 10.1016/j.molmet.2014.09.005
- Theodosis, D. T., Bonhomme, R., Vitiello, S., Rougon, G., and Poulain, D. A. (1999). Cell surface expression of polysialic acid on NCAM is a prerequisite for activity-dependent morphological neuronal and glial plasticity. *J. Neurosci.* 19, 10228–10236.
- van Den Hoek, A. M., Voshol, P. J., Karnekamp, B. N., Buijs, R. M., Romijn, J. A., Havekes, L. M., et al. (2004). Intracerebroventricular neuropeptide Y infusion precludes inhibition of glucose and VLDL production by insulin. *Diabetes* 53, 2529–2534. doi: 10.2337/diabetes.53.10.2529
- Vanpatten, S., Karkanas, G. B., Rossetti, L., and Cohen, D. E. (2004). Intracerebroventricular leptin regulates hepatic cholesterol metabolism. *Biochem. J.* 379, 229–233. doi: 10.1042/bj20040134
- Vimr, E. R., McCoy, R. D., Vollger, H. F., Wilkison, N. C., and Troy, F. A. (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. doi: 10.1073/pnas.81.7.1971
- Voigt, A., Agnew, K., Van Schothorst, E. M., Keijer, J., and Klaus, S. (2013). Short-term, high fat feeding-induced changes in white adipose tissue gene expression are highly predictive for long-term changes. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 1423–1434. doi: 10.1002/mnfr.201200671
- Vong, L., Ye, C., Yang, Z., Choi, B., Chua, S. Jr., and Lowell, B. B. (2011). Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron* 71, 142–154. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.028
- Wang, J., Obici, S., Morgan, K., Barzilai, N., Feng, Z., and Rossetti, L. (2001). Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. *Diabetes* 50, 2786–2791. doi: 10.2337/diabetes.50.12.2786
- Wilson, C. R., Tran, M. K., Salazar, K. L., Young, M. E., and Taegtmeier, H. (2007). Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. *Biochem. J.* 406, 457–467. doi: 10.1042/BJ20070392
- Winzell, M. S., and Ahrén, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53(Suppl. 3), S215–S219. doi: 10.2337/diabetes.53.suppl_3.s215
- Yang, Y., Atasoy, D., Su, H. H., and Sternson, S. M. (2011). Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 146, 992–1003. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.039
- Yue, J. T., Abraham, M. A., LaPierre, M. P., Mighiu, P. I., Light, P. E., Filippi, B. M., et al. (2015). A fatty acid-dependent hypothalamic-DVC neurocircuitry that regulates hepatic secretion of triglyceride-rich lipoproteins. *Nat. Commun.* 6:5970. doi: 10.1038/ncomms6970
- Yue, J. T., Mighiu, P. I., Naples, M., Adeli, K., and Lam, T. K. (2012). Glycine normalizes hepatic triglyceride-rich VLDL secretion by triggering the CNS in high-fat fed rats. *Circ. Res.* 110, 1345–1354. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.268276

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Brenachot, Gautier, Nédélec, Deckert, Laderrière, Nuzzaci, Rigault, Lemoine, Pénicaud, Lagrost and Benani. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.