



**HAL**  
open science

# Rôle de la résistine hypothalamique dans l'installation de l'inflammation hypothalamique et l'insulino-résistance : impact de la consommation aigüe ou chronique d'un régime hyper lipidique

Sarah Al-Rifai

## ► To cite this version:

Sarah Al-Rifai. Rôle de la résistine hypothalamique dans l'installation de l'inflammation hypothalamique et l'insulino-résistance : impact de la consommation aigüe ou chronique d'un régime hyper lipidique. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS095 . tel-02279990

**HAL Id: tel-02279990**

**<https://theses.hal.science/tel-02279990v1>**

Submitted on 5 Sep 2019

**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.

# Rôle de la résistine hypothalamique dans l'installation de l'inflammation hypothalamique et de l'insulino-résistance : impact de la consommation aigüe ou chronique d'un régime hyper lipidique

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Institut de Neurosciences Paris-Saclay (NeuroPSI)

École doctorale n°568 Signalisation et réseaux intégratifs en biologie  
(BIOSIGNE)

Spécialité de doctorat: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Orsay, 19 avril 2019, par

**Sarah Al-Rifai**

Composition du Jury :

<b>Michael Schumacher</b> DR INSERM (– UMR1195)	Président
<b>Ralf Jockers</b> Directeur de recherche, Institut Cochin (-INSERM U1016)	Rapporteur
<b>Christophe Magnan</b> Pr, Université Paris Diderot (– UMR8251)	Rapporteur
<b>Nicolas Venteclef</b> Directeur de recherche, CRC (–UMR1138)	Examineur
<b>Mohammed Taouis</b> Pr, Université Paris Saclay (– UMR9197)	Directeur de thèse
<b>Yacir Benomar</b> Dr, Université Paris Saclay (–UMR9197)	Co-Directeur de thèse

**Titre :** Rôle de la résistine hypothalamique dans l'installation de l'inflammation hypothalamique et l'insulino-résistance : impact de la consommation aigüe ou chronique d'un régime hyper lipidique

**Mots clés :** Résistine, inflammation, Hypothalamus, Obésité, insulino-résistance

### Résumé

La prévalence de l'obésité est en net progrès et constitue un problème majeur de santé publique. Cette pathologie est d'autant plus dangereuse qu'elle s'accompagne d'un *cluster* de désordres métaboliques dont l'inflammation chronique de bas grade et la résistance à l'insuline, principal facteur de risque du diabète de type 2. Les études montrent que la consommation d'un régime hyper lipidique (HFD) représente la cause majeure qui expose à l'obésité et aux pathologies qui lui sont associées. L'obésité induite par un régime HFD s'associe en effet à une inflammation hypothalamique ainsi qu'une altération des circuits neuronaux régissant le contrôle de la balance énergétique, ces altérations sont propices aux développements de résistances à l'insuline et à la leptine. De récentes études montrent que la consommation d'un régime HFD de quelques jours seulement s'accompagne d'une inflammation hypothalamique transitoire, antérieure à l'installation de l'obésité et à l'inflammation périphérique. Ces résultats suggèrent que l'inflammation hypothalamique précoce représente une étape critique dans le développement de l'obésité et de ses altérations. Les médiateurs et les voies de signalisations impliqués dans l'installation de l'inflammation hypothalamique ne sont pas totalement élucidés. Chez les rongeurs, la résistine est associée à l'inflammation et l'insulino-résistance au cours de l'obésité. Bien que majoritairement produite par le tissu adipeux, les études montrent que la résistine est également exprimée par l'hypothalamus ; toutefois, peu d'études renseignent sur son action au niveau central. Notre équipe a démontré chez le rat, qu'une perfusion centrale de résistine altère fortement la sensibilité à l'insuline via l'activation du récepteur TLR4 et l'induction des principales voies de l'inflammation. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude a été d'investiguer le rôle de la voie résistine/TLR4 dans l'installation de l'inflammation hypothalamique associée au régime HFD. Nous montrons pour la première fois que, chez la souris, la consommation d'un régime HFD provoque une augmentation de l'expression génique de la résistine dans l'hypothalamus dès 3 jours de régime HFD. L'expression de la résistine est diminuée jusqu'au niveau basal après 8 jours et est de nouveau fortement augmentée après 8 semaines de régime HFD. Nous montrons que l'augmentation de l'expression de la résistine est concomitante avec la gliose réactionnelle associée au régime HFD de court terme, connue pour précocement altérer l'équilibre de la balance énergétique. De façon intéressante, nous montrons que l'augmentation de l'expression de la résistine est observée dans les neurones anorexigènes POMC, critiques pour le maintien de l'homéostasie énergétique ainsi que dans les tanocytes dont les prolongements contactent les capillaires fenêtrés du sang porte hypothalamo-hypophysaire et dont l'importance pour l'équilibre de la balance énergétique a été démontrée. De façon intéressante, nous montrons que la résistine active l'inflammation dans les tanocytes via TLR4 suggérant que la résistine pourrait promouvoir l'inflammation au sein des tanocytes en réponse au régime HFD, et ce même à court terme. De plus, nous montrons qu'une ICV de 3 jours de résistine chez la souris provoque une inflammation hypothalamique ainsi qu'une gliose réactionnelle au sein de l'ARC qui rappellent les effets du régime HFD. De façon intéressante, nos résultats montrent que l'inactivation du récepteur TLR4 abolit l'inflammation et la gliose réactionnelle hypothalamiques induites par l'ICV de résistine. L'ensemble nos données démontrent que la voie résistine/TLR4 pourrait jouer un rôle critique dans l'inflammation hypothalamique associée au régime HFD de court et long terme, qui prédispose à l'obésité.

**Title :** Role of hypothalamic resistin in the onset of hypothalamic inflammation and insulin resistance : impact of short or long term high fat diet consumption

**Keywords :** Resistin, inflammation, hypothalamus, obesity, insulin resistance

**Abstract**

Obesity is closely linked to a cluster of metabolic disorders including chronic low-grade inflammation and insulin resistance, which constitutes a principal risk factor for type 2 diabetes. In rodents, cumulative evidence support that the consumption of high fat diet (HFD) is among the most important nutritional factors predisposing to obesity associated insulin resistance and low-grade inflammation. Indeed, HFD induces hypothalamic inflammation and deregulates energy homeostasis control through the alteration of hypothalamic insulin and leptin responsiveness, considered as the main anorexigenic hormones. In addition, it has been shown that unlike peripheral inflammation, which occurs as a consequence of obesity, hypothalamic inflammation develops selectively in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) within the first days of HFD exposure. These data suggest that hypothalamic inflammation is a critical step in the early onset of the deregulation of energy homeostasis by HFD. The cellular and molecular mechanisms underlying obesity-induced hypothalamic inflammation are still not fully characterized. In rodents, resistin is described as a causal factor in obesity-mediated insulin resistance and type 2 diabetes. Resistin is mainly secreted by adipose tissue in rodents but an endogenous expression of resistin was also reported in the hypothalamus. However, its action at the central level is not fully understood. Our group recently demonstrated that central resistin, via hypothalamic TLR4, promotes overall insulin resistance through the promotion of inflammatory pathway. In this context, we aimed to investigate the role of resistin/TLR4 pathway in HFD-induced hypothalamic inflammation and insulin resistance. In the present study we report for the first time that both short and long term HFD are associated with a significant increase of resistin expression throughout the MBH. Our results revealed a transient increase in resistin mRNA expression in the ARC after 3 days of HFD, followed by a decline to baseline at day 8 and an expression that increases again after 8 weeks of HFD. We showed that the increase of resistin expression is concomitant with short term HFD-induced ARC reactive gliosis, known to early disrupt energy balance and to predispose to obesity. Interestingly, our results revealed that resistin is expressed by POMC neurons which are critical for energy balance and tanycytes that have the specificity to contact both cerebro-spinal fluid and fenestrated capillary in the median eminence. Interestingly, we show that resistin induces tanycytes inflammation through TLR4 suggesting that resistin could promote inflammation in tanycytes in response to short term HFD. Additionally, we show that ICV resistin markedly increases inflammatory markers in the hypothalamic arcuate nucleus in association with reactive gliosis involving recruitment of both microglia and astrocytes. Interestingly, we report that the knockdown of TLR4 almost completely abolished resistin-dependent both hypothalamic inflammation and reactive gliosis. Our data demonstrate that resistin/TLR4 pathway could play a critical role in HFD-diet induced hypothalamic inflammation in response to short and long term HFD which predispose to obesity, a hallmark of metabolic syndrome.

## REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres du jury qui ont accepté de juger ce travail. Je remercie le Pr Michael SCHUMACHER qui m'a fait honneur en acceptant de présider ce jury de thèse. Je remercie le Dr Ralf JOCKERS et le Pr Christophe MAGNAN pour l'intérêt qu'ils ont porté à l'égard de ces travaux en acceptant d'être rapporteurs et pour l'attention qu'ils ont portée à la lecture de ce manuscrit. Enfin, je remercie le Pr Vincent PREVOT et le Dr Nicolas VENTECLEF de me faire bénéficier de leurs grandes compétences en acceptant d'examiner ce travail scientifique.

Un grand merci au Pr Mohammed TAOUIS pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de son équipe. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour sa gentillesse et ses conseils avisés. Je le remercie de m'avoir encouragée à donner le meilleur de moi-même, toujours avec beaucoup de bienveillance.

Un merci tout particulier au Dr Yacir BENOMAR qui m'a tant appris. Yacir, je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée depuis mes stages de master jusqu'à aujourd'hui. Je te remercie pour ta bienveillance envers moi. Tu as toujours été soucieux de me voir progresser et n'as eu de cesse de m'encourager. J'espère qu'un jour j'aurais de nouveau la chance de travailler sur des projets avec toi. Je te souhaite beaucoup d'épanouissements tant professionnels que personnels.

Merci à Hamza AMINE pour sa gentillesse et son aide pendant ma première année de thèse. Je remercie Coralie ALEXANDRE *alias* Coco pour nos fous rires, nos moments d'ultimes craquages, nos pauses *bora-bora* et surtout pour avoir été mon fournisseur officiel de chocolats quand j'en avais le plus besoin. Plus sérieusement, merci pour tout. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir ! Merci à Jeanne GUITTON pour sa sympathie, sa bonne humeur et son envie très appréciable de toujours vouloir aider.

Merci à Ghislaine POIZAT pour sa gentillesse et son aide, j'ai beaucoup apprécié ton soutien et ton réconfort pendant ma période de grand stress mais également ta bienveillance et ton combat –vain, il faut bien se l'avouer– pour que je m'alimente correctement pendant ma thèse ! Merci à Delphine CREPIN et à Laure RIFFAULT, vous avez été des collègues très agréables et sympathiques, vous me pardonnez toujours –souvent– le désordre sur les paillasses après mes longues journées de manipes, et rien que pour ça, merci !

Enfin, je souhaite remercier ma famille sans qui ce manuscrit n'aurait sans doute jamais vu le jour :

A mon père et ma mère, les premiers à avoir cru en moi. Merci pour votre amour inconditionnel et vos nombreux sacrifices. Les valeurs que vous m'avez inculquées ont fait de moi celle que je suis aujourd'hui et j'espère que vous en êtes fiers. Je vous remercie de tout mon cœur car sans vous rien de tout cela n'aurait été possible, cette réussite est la vôtre.

A ma *golden* fratrie, unie comme les cinq doigts d'une seule main.

Merci... c'est un mot bien trop simple ! A Rim, la gardienne de mes fous rires, ma meilleure, celle avec qui j'ai tout partagé, je ne te remercierai jamais assez pour ton inconditionnel soutien pour que j'en arrive là ! A Rida, la grande sœur parfaite, sur qui je sais que je pourrai toujours compter : *We diiid it !!!*  
A Mohamed, la force tranquille, et à *cheikh* Hassan, parce que nulle enfance n'égale la nôtre : la base c'est vous.

Merci à ma *lady*-Léanne, ma petite nièce d'amour et mon « porte-bonheur ».

A ma belle-famille, j'ai une chance inouïe de vous avoir ! A mes beaux-parents, merci d'être aussi fiers de moi depuis le début et de toujours vous soucier de mon bonheur ! A Laure, *my little sister from another mother*, merci de m'avoir accueillie avec autant d'amour et de sincérité, merci d'avoir été un soutien sans failles. Merci à Myriam ma belle-sœurette bienveillante qui a ce don de toujours tout dédramatiser pour redonner le sourire ; aussi, merci d'avoir mis au monde notre petite Aline chérie.

A mon oncle Omar, merci pour tes sincères encouragements et d'être aussi fier de nous, depuis toujours.

Enfin, je remercie celui à qui j'ai dit, et dirai toujours « *Oui* » pour la vie. Merci pour ton amour qui m'apporte force et courage, merci de me soutenir dans les épreuves, merci de vouloir sans cesse me rendre heureuse. J'ai tant de merci à te dire... Tu fais de moi une personne meilleure. C'est toi qui devine à ma voix quand je suis triste, c'est toi qui me comprends mieux que quiconque. Une page se tourne aujourd'hui et je suis heureuse à l'idée d'en écrire de nouvelles à tes côtés. MS2405<3

*« If you can dream it, you can do it.  
Always remember that this whole thing  
was started by a mouse »*

*Walt Disney*

*A la mémoire de mon grand père paternel,  
pour qui le savoir était une inestimable richesse.*



<b>LISTE DES PRINCIPALES ABREVIATIONS</b>	<b>10</b>
<b>TABLE DES FIGURES</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>12</b>
<b>I. INFLAMMATION ET MALADIES METABOLIQUES</b>	<b>13</b>
<b>Introduction</b>	<b>13</b>
<b>Obésité et inflammation périphérique : rôle du tissu adipeux</b>	<b>14</b>
Tissu adipeux blanc : fonction endocrine	14
Origine de l'inflammation chronique à bas bruit associée à l'obésité	17
Obésité : définition et données épidémiologiques	17
Genèse de l'état inflammatoire associé à l'obésité : rôle des macrophages	18
Rappel sur les macrophages et polarisation M1/M2	19
Mécanismes d'infiltration et d'accumulation des macrophages dans le tissu adipeux obèse	20
Inflammation des autres tissus périphériques	24
Le foie	24
Le muscle squelettique	25
<b>Insulino résistance associée à l'obésité</b>	<b>26</b>
Inflammation et résistance à l'insuline	28
Dérèglement de la sécrétion des adipokines et insulino résistance	30
Adiponectine	30
Leptine	31
Résistine	32
Découverte de la résistine	32
La résistine murine et humaine : présentation	32
Rôle de la résistine murine dans la résistance à l'insuline	33
Rôle de la résistine humaine dans l'inflammation	35
Rôle de la résistine humaine dans la résistance à l'insuline	35
Récepteur TLR4 : lien entre inflammation et résistance à l'insuline	38
Toll-like récepteur : présentation et rappel	38
Signalisation de TLR4 : voie Myd88 dépendante	39
Signalisation de TLR4 : voie Myd88 indépendante	40
Toll-like récepteur : rôle dans l'insulino-résistance associée à l'obésité	41
<b>II. NEURO INFLAMMATION ET OBESITE</b>	<b>42</b>
<b>Introduction</b>	<b>42</b>
<b>Neuro inflammation du SNC et conséquences fonctionnelles</b>	<b>43</b>
<b>III. NEURO-INFLAMMATION HYPOTHALAMIQUE ASSOCIEE A L'OBESITE: CONSEQUENCES SUR L'HOMEOSTASIE ENERGETIQUE</b>	<b>46</b>
<b>Rappel : la régulation de l'homéostasie énergétique par l'hypothalamus</b>	<b>46</b>

L'hypothalamus : définition et rôle dans l'homéostasie énergétique	46
Le noyau arqué (ARC) et l'éminence médiane (ME)	48
Neuro inflammation hypothalamique : <i>driver</i> de l'obésité et de ses conséquences ?	<b>53</b>
Découverte de l'inflammation hypothalamique	53
Voies de signalisation impliquées dans l'inflammation hypothalamique et l'altération de la balance énergétique	54
Voie TLR4 : rôle de IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B et JNK	54
Altération de l'autophagie et inflammation	57
Stress du réticulum endoplasmique	58
Contribution des différents types cellulaires à l'inflammation de l'hypothalamus	59
Microglie et astrocytes : la gliose réactionnelle associée au régime HFD	59
Rappel sur la microglie et les astrocytes	59
Gliose réactionnelle hypothalamique en réponse au régime HFD et à l'obésité	62
Neuro-inflammation et altération de l'homéostasie neuronale	65
Les tanocytes	66
Conséquences fonctionnelles de l'inflammation hypothalamique associée au HFD	68
<b>IV. LA RESISTINE : UN MEDIATEUR POSSIBLE DE L'INFLAMMATION HYPOTHALAMIQUE ?</b>	<b>69</b>
Présence de la résistine dans le LCR	69
Le cerveau exprime la résistine : zoom sur l'hypothalamus	69
Effets centraux de la voie résistine/TLR4	70
<b>RESULTATS</b>	<b>73</b>
<b>CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE</b>	<b>74</b>
<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX</b>	<b>101</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>105</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>111</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>159</b>

# Liste des principales abréviations

**ARC** : Arcuate nucleus  
**BHE** : barrière hémato-encéphalique  
**ERK** : Extracellular signal-regulated kinase  
**EM** : éminence médiane  
**EMR1** : EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1  
**GFAP** : Glial Fibrillary acidic protein  
**IBA1** : Ionized calcium binding adaptor molecule 1  
**CD11B** : Cluster of differentiation 11b  
**CD68** : Cluster of differentiation 68  
**SNC** : système nerveux central  
**IKK** : I $\kappa$ B kinase  
**IL1 $\beta$**  : Interleukin 1 $\beta$   
**IL6** : Interleukin 6  
**IR** : Insulin receptor  
**IRS** : Insulin receptor substrate  
**JNK** : Janus NH<sub>2</sub>-terminal kinase  
**LCR** : Liquide céphalo rachidien  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase  
**MBH** : Medio-basal hypothalamus  
**MyD88** : Myeloid differentiation primary response 88  
**NF $\kappa$ B** : Nuclear factor kappa B  
**NPY** : Neuropeptide Y  
**POMC** : Proopiomelanocortin  
**PTP1B** : Protein tyrosin phosphatase 1B  
**SOCS** : Suppressor of cytokine signaling  
**TA** : Tissu adipeux  
**TIRAP** : Toll-Interleukin 1 receptor adapter protein  
**TLR4** : Toll-like receptor 4  
**TNF $\alpha$**  : Tumour necrosis factor  $\alpha$

# Table des figures

<b>Figure 1: Principales cytokines et adipokines produites et sécrétées par le tissu adipeux blanc</b> .....	16
<b>Figure 2 : Infiltration et accumulation des monocytes au sein du tissu adipeux obèse</b> .....	21
<b>Figure 3 : Altérations cellulaires du tissu adipeux au cours de l'obésité</b> .....	24
<b>Figure 4 : Altérations du tissu adipeux, du foie et du muscle au cours de l'obésité et résistance à l'insuline</b> .....	27
<b>Figure 5 : Altérations de la fonction sécrétoire du tissu adipeux et résistance à l'insuline</b> .....	29
<b>Figure 6 : Mécanisme d'action de la résistine humaine</b> .....	37
<b>Figure 7 : Voies de signalisation du récepteur TLR4</b> .....	40
<b>Figure 8 : L'obésité provoque une inflammation généralisée à tout l'organisme, dont le système nerveux central</b> .....	44
<b>Figure 9 : Positions des différents noyaux hypothalamiques en vue coronale (à gauche) et sagittale (à droite) de cerveau humain</b> .....	48
<b>Figure 10 : Représentation schématique de la distribution des tanocytes à travers l'éminence médiane, le noyau arqué et le noyau ventromédian</b> .....	50
<b>Figure 11 : Contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique</b> .....	52
<b>Figure 12 : Cascades de signalisation de l'inflammation métabolique dans l'hypothalamus</b> .....	56
<b>Figure 13 : States d'activation de la microglie dans le cerveau humain</b> .....	61
<b>Figure 14 : La microglie activée possède des propriétés de phagocytose</b> .....	61
<b>Figure 15 : Gliose réactionnelle hypothalamique et altérations associées au régime HFD</b> .....	63
<b>Figure 16 : L'impact de l'inflammation hypothalamique sur les neurocircuits contrôlant la balance énergétique et sur les tissus périphériques</b> .....	67
<b>Figure 17 : La voie résistine/TLR4 favorise la résistance à l'insuline au niveau neuronal</b> .....	71
<b>Figure 18 : Obésité et altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique : diffusion des adipokines</b> .....	72

---

# **INTRODUCTION**

# **BIBLIOGRAPHIQUE**

---

# I. Inflammation et maladies métaboliques

---

## Introduction

Le syndrome métabolique ou syndrome X désigne la présence, chez un individu, d'un ensemble de signes physiologiques conférant une importante prédisposition au diabète de type 2 et aux risques cardiovasculaires (Alberti, Eckel, Grundy et al., 2009). En effet, le syndrome métabolique n'est pas une maladie en soi mais plutôt un ensemble d'anomalies qui, réuni chez un même individu, constitue un haut facteur de risque de développer ces pathologies. L'essence de ce syndrome découle de l'existence de prédispositions génétiques et de facteurs environnementaux.

On parle de syndrome métabolique lorsqu'au moins trois de ces facteurs sont retrouvés chez une même personne :

- Obésité abdominale
- Hyperglycémie à jeun (supérieure ou égale à 100mg/dL)
- Triglycéridémie élevée (supérieure à 150mg/dL)
- Faible niveau de HDL cholestérol (inférieur à 40mg/dL chez l'homme et inférieure à 50 mg/dL chez la femme)
- Hypertension artérielle

Il existe d'autres facteurs de risques comme l'inflammation. En effet, Le syndrome métabolique est associé à une inflammation chronique de bas grade qui affecte l'ensemble de l'organisme notamment les organes et tissus impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique tels que le foie, le tissu adipeux et le système nerveux central (Bassuk et al., 2004 ; Lumeng and Saltiel, 2011).

L'inflammation se définit par un ensemble de réactions générées par l'organisme en réponse à un stimulus nocif. Conçue pour restaurer les tissus à leur état initial, elle permet la destruction de l'agent nocif ainsi que des tissus lésés et favorise ainsi le maintien de

l'homéostasie tissulaire (Romano, 2008). Il existe deux types d'inflammation. D'une part, l'inflammation dite « aigüe », qui se manifeste immédiatement après l'intrusion du pathogène et dont la durée s'étend jusqu'à 48 heures environ jusqu'à la guérison. Elle représente la réponse typique du système immunitaire inné. D'autre part, la réponse inflammatoire « chronique », correspondant à une inflammation qui peut persister des semaines, voire des années.

Loin d'être simplement associée à une surcharge pondérale, l'obésité est généralement une cause fondamentale du syndrome métabolique. L'obésité est associée à un état inflammatoire chronique de bas grade (Hotamisligil et al., 1993). Ce concept repose sur le fait que les sujets obèses présentent une augmentation modérée, mais chronique, des taux circulants des facteurs pro-inflammatoires. En effet, l'état inflammatoire observée chez l'obèse ne se caractérise pas par les symptômes présents classiquement en cas d'inflammation (augmentation de la température corporelle, rougeur, douleur, gonflement). De même, l'inflammation associée à l'obésité est bien particulière puisqu'elle n'est pas provoquée par un stimulus infectieux (type agent pathogène), mais par un excès de masse adipeuse. L'obésité est délétère pour l'organisme puisqu'elle est considérée comme un facteur à risque majeur des nombreuses perturbations métaboliques qui composent le syndrome métabolique. En effet, il est clairement établi que la genèse de l'état inflammatoire au cours de l'obésité représente un risque majeur de développer un diabète de type 2.

Dans ce chapitre, nous détaillerons les prémices de cet état inflammatoire chez l'obèse ainsi que ses conséquences délétères sur les tissus impliqués dans le maintien de l'homéostasie énergétique.

## **Obésité et inflammation périphérique : rôle du tissu adipeux**

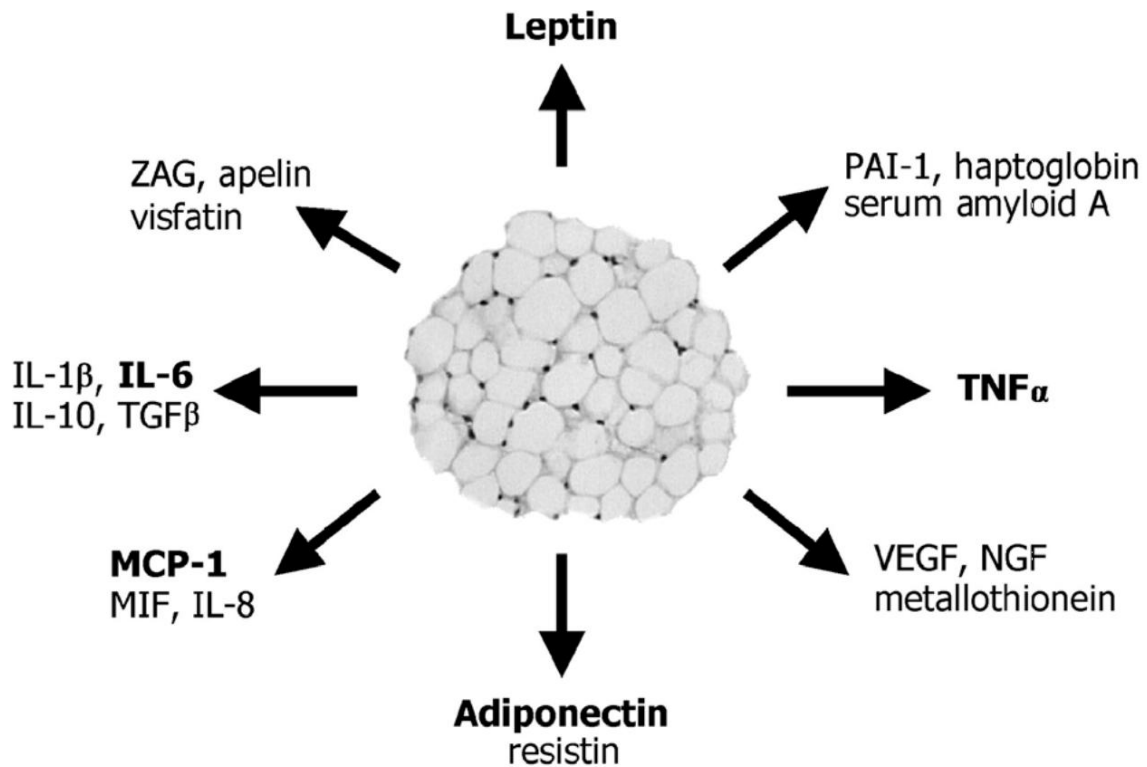
### **Tissu adipeux blanc : fonction endocrine**

Le tissu adipeux est un organe complexe composé de différents types cellulaires. Il est majoritairement composé d'adipocytes, mais également de pré-adipocytes, de macrophages, de cellules endothéliales, de fibroblastes et de leucocytes (Juge-Aubry et al., 2005). Le tissu adipeux occupe une place prépondérante dans le contrôle du

métabolisme lipidique (Sethi and Vidal-Puig, 2007). Il représente en effet la principale réserve énergétique de l'organisme. Il participe au maintien de la balance énergétique en stockant l'excès énergétique sous forme de triglycérides. Ce stock est mobilisable en fonction des besoins de l'organisme, sa gestion repose sur deux voies principales : la lipogénèse et la lipolyse. En effet, après un apport énergétique, l'excédent d'énergie est stocké sous forme de triglycérides au sein du tissu adipeux blanc via le mécanisme de lipogénèse, protégeant ainsi les autres organes, comme le foie ou les muscles, de la lipotoxicité (Tan and Vidal-Puig, 2008). Au contraire, en cas de pénurie énergétique les voies de lipolyse sont activées et permettent la libération de glycérol et d'acides gras dans le sang, ceux-ci vont infiltrer le muscle, le foie et d'autres organes qui participent à la modulation de la balance énergétique (Lafontan and Langin, 2009 ; Frayn, 2002).

Longtemps considéré comme un simple tissu de stockage d'excédents énergétiques, le tissu adipeux est aujourd'hui reconnu en tant que véritable tissu endocrinien actif (**figure 1**). Les recherches des 20 dernières années ont permis de mettre en évidence son activité endocrinienne par la découverte de nombreuses hormones secrétées par le tissu adipeux. En effet, les études pionnières de Spiegelman et Flier menées au milieu des années 1980 ont tout d'abord montré que les adipocytes étaient une source sécrétrice d'adipsine, protéine impliquée dans la voie immune du système du complément (Flier et al., 1987). En 1994, le groupe de Jeffrey Friedman identifie la leptine en tant qu'hormone secrétée par les adipocytes et impliquée dans le contrôle de l'homéostasie énergétique en agissant au niveau cérébral (Friedman et al., 1991). Plus tard, d'autres adipokines se sont ajoutées au tableau comme l'adiponectine, connue pour ses effets insulino-sensibilisateurs ainsi que la résistine décrite, au contraire, pour son action insulino-résistante et pro-inflammatoire (Scherer et al., 1995, Stepan et al., 2001). Ainsi, ces molécules secrétées par le tissu adipeux, sont biologiquement actives et circulent dans le sang afin de relayer les informations du statut énergétique à d'autres tissus impliqués dans le métabolisme énergétique comme le cerveau, le foie, les muscles et le pancréas (Rosen and Spiegelman 2014 ; Parimisetty et al., 2016). L'action des adipokines est principalement médiée par des récepteurs présents sur les membranes des cellules cibles et initiant leur voie de signalisation, influençant ainsi la sensibilité à l'insuline, l'homéostasie énergétique, l'oxydation des lipides, l'immunité ainsi que les fonctions vasculaires (Reaven et al., 2004).





**Figure 1: Principales cytokines et adipokines produites et sécrétées par le tissu adipeux blanc**

*IL1 $\beta$* , Interleukin 1 $\beta$  ; *IL6*, Interleukin 6 ; *IL8*, Interleukin 8 ; *IL10*, Interleukin 10 ; *MCP1*, monocyte chimoattractant protein 1 ; *MIF*, macrophage migration inhibitory factor ; *NGF*, nerve growth factor ; *PAI1*, Plasminogen activator inhibitor-1 ; *TNF $\alpha$* , tumor necrosis factor  $\alpha$  ; *VEGF*, Vascular endothelial growth factor ; *TGF- $\beta$* , transforming growth factor- $\beta$  ; *ZAG*, zinc- $\alpha$ 2-glycoprotein. (Trayhurn and Beattie., 2001b)

De même, les cellules endothéliales et immunes résidentes du tissu adipeux constituent une source importante de production de molécules impliquées dans l'inflammation. En effet, de nombreuses données récentes montrent que le tissu adipeux exprime également un panel de facteurs pro- et anti-inflammatoires et contribue vraisemblablement à l'augmentation de leurs taux circulants chez l'obèse. Les études montrent que le tissu adipeux produit des cytokines inflammatoires ( $TNF\alpha$ ,  $TGF\beta$ , interféron  $\gamma$ , IL1, IL6, IL10 et IL8), des facteurs du complément, mais également des chimiokines (MIP1 $\alpha$ , MCP1)(Loskutoff et Samad., 1998 ; Weisberg *et al.*, 2003 ; Boucher *et al.*, 2005 ; Kanda *et al.*, 2006 ; Saddi-Rosa *et al.*, 2010).

Ainsi, en tant que régulateur principal du métabolisme lipidique et de par sa capacité à sécréter de nombreuses hormones et cytokines, le tissu adipeux se situe à l'interface de la régulation du métabolisme énergétique et de la modulation de l'inflammation, et semble de

ce fait étroitement impliqué dans les pathologies associées à l'obésité. En tant que tissu endocrinien, il présente une particularité, contrairement aux autres glandes endocrines, le tissu adipeux peut excessivement varier en taille d'un individu à l'autre, ce qui lui confère des propriétés très différentes au cours de l'obésité.

## Origine de l'inflammation chronique à bas bruit associée à l'obésité

### *Obésité : définition et données épidémiologiques*

L'obésité se définit comme une accumulation anormale et excessive de graisse corporelle pouvant nuire à la santé. L'augmentation de la masse adipeuse résulte d'une alimentation trop riche associée à la sédentarité. L'obésité progresse de façon alarmante et concerne aujourd'hui la quasi-totalité du globe, elle est considérée par l'OMS comme une épidémie mondiale et représente le cinquième facteur de risque de décès dans le monde. En France, la prévalence de l'obésité a augmenté de manière dramatique ces dernières années et touche aussi bien les adultes que les enfants. Selon une étude ObEpi-Roche, 15% de la population française adulte était obèse en 2012, ce qui correspond à environ 6,9 millions de personnes obèses, soit 3,3 millions de personnes supplémentaires par rapport au chiffre de 1997 (figure 1). D'après un rapport de l'OCDE, la prévalence de l'obésité est supérieure à 30 % aux USA, 11 % en France et est inférieure à 5 % au Japon, en Corée, en Chine, et en Inde (Sassi F. OCDE, 2010). La hausse rapide du niveau d'obésité est toutefois comparable dans l'ensemble des pays. En effet, en Chine le taux de surpoids a doublé entre 1991 et 2006, celui de l'obésité a, quant à lui, triplé. Cette maladie chronique est d'autant plus dangereuse, qu'elle est souvent associée à de nombreuses pathologies dévastatrices tel que le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives et certaines formes de cancer (Hotamisligil, 2006).

L'obésité est à l'origine d'altérations cellulaires majeures dans le tissu adipeux, caractérisées principalement par l'hypertrophie et l'hyperplasie des adipocytes et l'accumulation de cellules immunitaires. Le tissu adipeux est en effet le tissu périphérique dont les changements morphologiques sont les plus importants au cours de l'obésité, ces anomalies conduisent à une pathologie tissulaire qui altère les fonctions métaboliques et sécrétoires du tissu adipeux et participe aux complications de l'obésité. Parmi ces modifications, l'accumulation locale des macrophages semble être le point de départ de

l'état inflammatoire chronique de bas grade observé au cours de l'obésité (Weisberg et al., 2003).

### *Genèse de l'état inflammatoire associé à l'obésité : rôle des macrophages*

L'existence d'une inflammation chronique de bas grade provenant du tissu adipeux au cours de l'obésité a été démontré pour la première fois en 1993 par l'équipe de Gokan Hotamisligil (Hotamisligil et al., 1993). Cette étude a montré la production de cytokines pro inflammatoires par le tissu adipeux, en particulier le TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*) et l'augmentation significative de l'expression de facteurs pro inflammatoires dans les adipocytes d'animaux obèses. Il est décrit chez l'obèse une élévation des concentrations circulantes des protéines de la phase aiguë de l'inflammation comme la CRP (protéine C-réactive), de l'antagoniste du récepteur de l'IL1 (IL-1Ra), et de cytokines comme l'IL6 et le TNF $\alpha$ . Dans de nombreuses études, les taux circulants des cytokines pro inflammatoires TNF $\alpha$  et IL6 sont corrélés à la masse adipeuse.

Chez un sujet obèse, les macrophages peuvent composer jusqu'à 40% du tissu adipeux total, contre seulement 10% chez un sujet à la corpulence normale (Weisberg et al., 2003). L'évolution de cet état inflammatoire caractérisée par un enrichissement en macrophages ont fait l'objet d'études récentes, réalisées sur des modèles murins d'obésité (Xu et al., 2003 ; Weisberg et al., 2003), et chez l'homme (Curat et al., 2004 ; Canello et al., 2005). Les résultats obtenus au cours de ces études sont en faveur d'une origine macrophagique de l'inflammation. En effet, des expériences d'immunohistochimie sur coupes de tissu adipeux humain démontrent qu'une perte importante de masse grasse s'accompagne d'une diminution du nombre des macrophages infiltrant ce tissu (Canello et al., 2005). De même, en réponse à un régime faiblement calorique chez des individus obèses, les niveaux d'expression des cytokines pro-inflammatoires sont diminués notamment dans la fraction non adipocytaire du tissu adipeux (Clement et al., 2004). Néanmoins, l'origine cellulaire de ces facteurs pro-inflammatoires qui proviennent du tissu adipeux obèse n'est pas exclusive aux macrophages, en effet, l'analyse après isolement des différentes composantes cellulaires montrent que les adipocytes expriment et secrètent *in vitro* des cytokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$  (Hotamisligil et al., 1993) et IL-6 (Fried et al., 1998). L'accumulation macrophagique au sein du tissu adipeux blanc est corrélée à l'indice de masse corporelle (IMC) et à l'hypertrophie des adipocytes (Weisberg et al., 2003 ; Curat et al. 2004). Des similitudes au niveau des profils d'expression de gènes

entre les adipocytes et les macrophages ont également été relevées. En effet, dans un environnement inflammatoire les adipocytes adoptent des propriétés macrophagiques (Cousin et al., 1999 ; Charriere et al., 2003). Toutefois, des expériences de transplantation de moelle osseuse, réalisées chez la souris, ont démontré que les monocytes circulants sont les précurseurs de la majorité des macrophages présents dans le tissu adipeux obèse, suggérant une infiltration de monocytes circulants dans le tissu adipeux (Weisberg et al. 2003). Ainsi, il semble qu'au cours de l'obésité, de puissants facteurs chimio-attractants attirent les monocytes circulants vers le tissu adipeux. Les mécanismes impliqués dans l'infiltration et l'activation des macrophages semblent être multiples et complexes.

#### Rappel sur les macrophages et polarisation M1/M2

Les macrophages représentent une population hétérogène de cellules myéloïdes impliquées dans l'immunité innée. Par l'intermédiaire de la phagocytose, ils permettent l'élimination de débris cellulaires, de pathogènes ainsi que de cellules apoptotiques ou nécrosées. Les macrophages d'un même tissu, comme par exemple le tissu adipeux, peuvent présenter des aspects et des phénotypes hétérogènes. En fonction de leur profil d'expression protéique, les macrophages peuvent présenter un phénotype pro- ou anti-inflammatoire. Cela a été proposé dès les années 1990, les études ont montré qu'un traitement de macrophages par la cytokine IL-4 ou le lipopolysaccharide (LPS) n'induisait pas la même réponse, et celle induite par IL4 fut nommée « phénotype d'activation alternative » (Nathan et al., 1983 ; Steim et al., 1992). Ce n'est que dans les années 2000 que Mills et ses collaborateurs proposèrent la classification M1 ou M2 toujours d'usage aujourd'hui. En effet, les études menées par cette équipe ont abouti à un consensus, approuvé par la communauté scientifique, selon lesquelles macrophages M1 présentent des fonctions pro-inflammatoires alors que les macrophages M2 présentent un profil anti-inflammatoire nommé aussi activation alternative (Mills et al., 2000)

Les macrophages dérivent des monocytes circulant qui, en fonction du tissu qu'ils infiltrent, entrent dans une différenciation spécifique en vue de devenir des macrophages résidents. Ils interagissent avec leur environnement tissulaire afin de maintenir son homéostasie et se différencient en deux phénotypes aux fonctions différentes.

Les **macrophages M1** se caractérisent par une forte expression de cytokines pro-

inflammatoires, leur capacité à résister aux pathogènes, leurs fortes propriétés anti microbiennes ainsi que la capacité à promouvoir la réponse inflammatoire des lymphocytes T. Le LPS et IFN-gamma polarisent les macrophages vers le phénotype d'activation M1 ce qui induit une large sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18 et IL-23. D'un point de vue phénotypique, les macrophages M1 expriment fortement le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II), le marqueur CD68 (*cluster of differentiation 68*), les intégrines Cd11c et Cd11b ainsi que le récepteur EMR-1. En outre, il a également été montré que les macrophages M1 sur-expriment SOCS-3 (Suppressor Of Cytokine Signaling 3). Dans un contexte pathologique, les macrophages M1 sont impliqués dans l'initiation et le maintien de l'inflammation et peuvent, à ce titre, être néfaste pour l'organisme.

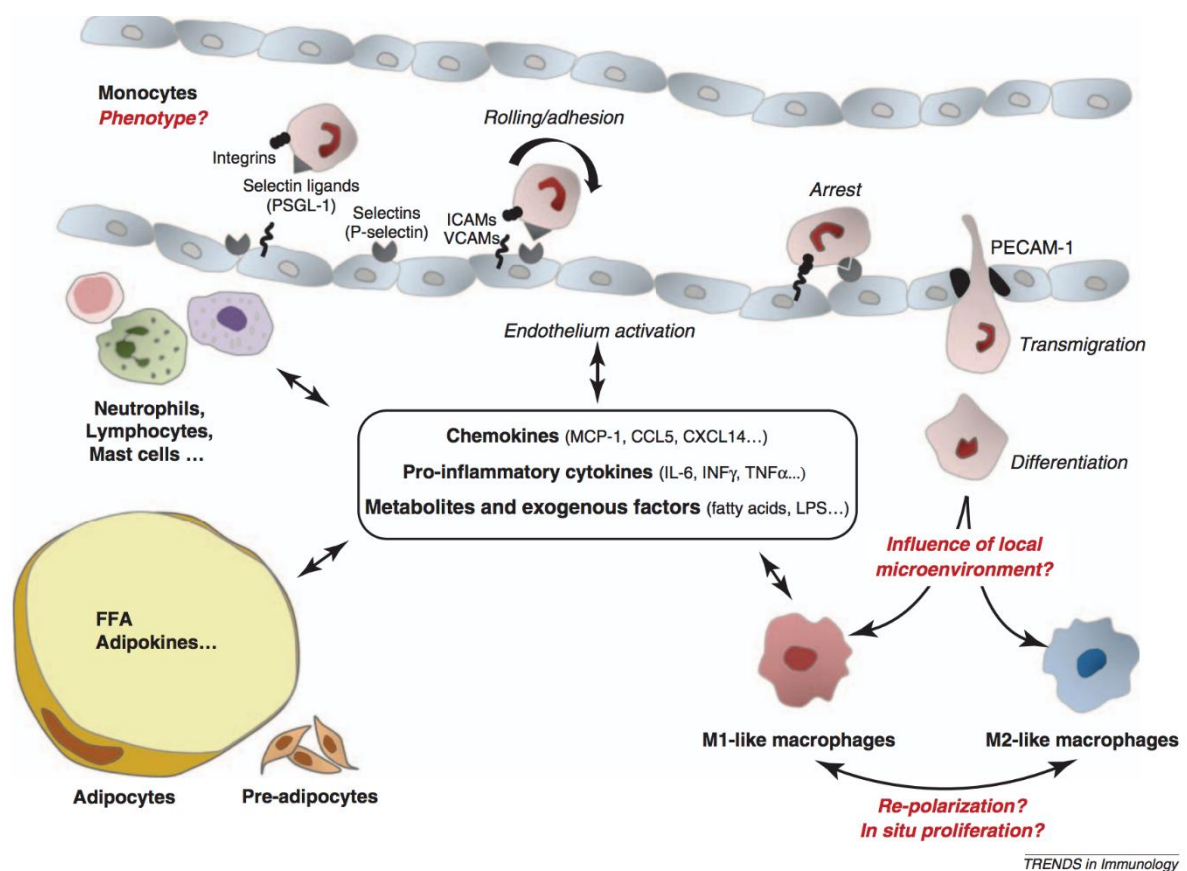
En revanche, les **macrophages M2** sont activés par les cellules fongiques, les complexes immuns, les cellules apoptotiques ainsi que des cytokines comme IL-4, IL-13, IL-10 et TGF- $\beta$ . Cette activation aboutit à une importante sécrétion d'IL-10 et une faible sécrétion de IL-12. IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire qui agit notamment en inhibant la production de certaines cytokines pro-inflammatoires comme IL-2 et IL-3 et certains interférons (Fiorentino et al. 1989).

Récemment, il a été montré que les macrophages sont dotés d'une capacité de passer du stade M2 au stade M1. Cette polarisation est par conséquent réversible et dépend de l'environnement chimiotactique (Davis et al., 2013). Comme évoqué précédemment, au cours de l'obésité, la part de macrophages composant le tissu adipeux est fortement augmentée. De nombreuses raisons expliquent ce phénomène, parmi elles, l'infiltration des monocytes circulants au sein du tissu adipeux, par divers mécanismes.

#### Mécanismes d'infiltration et d'accumulation des macrophages dans le tissu adipeux obèse

Les mécanismes cellulaires et moléculaires qui permettent le recrutement des monocytes par leur diapédèse (**figure 2**) à travers l'endothélium vasculaire sont peu explorés dans le tissu adipeux. Toutefois, des études ont proposé des mécanismes possibles. Le tissu adipeux de sujets obèses exprime en forte quantité des protéines impliquées dans l'attraction des monocytes. Parmi elles, le facteur MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), il s'agit d'une cytokine de type chimiokine, elle possède un pouvoir attractif sur certaines cellules immunitaires, dont les monocytes, qu'elle attire par un gradient de

concentration (**figure 2**). Chez la souris, il a été montré qu'une délétion du gène qui code pour le récepteur CCR2 de la chimiokine MCP-1, atténue l'inflammation induite par le régime hyper lipidique dans le tissu adipeux (Weisberg et al., 2006 ; Kamei et al., 2006). Ces études soulèvent l'importance et l'implication de la liaison MCP-1/CCR2 dans l'infiltration du tissu adipeux par les macrophages au cours de l'obésité. Toutefois certaines études contredisent ces résultats et rapportent que les macrophages peuvent s'accumuler dans le tissu adipeux de façon tout à fait indépendante de la chimiokine MCP-1 et de son récepteur CCR2, et que cette infiltration a lieu en réponse au régime gras (Chen et al. 2005 ; Kirk et al. 2008).



**Figure 2 : Infiltration et accumulation des monocytes au sein du tissu adipeux obèse**

*Au cours de l'obésité, les macrophages et les adipocytes hypertrophiés du tissu adipeux produisent un panel de chimiokines, cytokines pro inflammatoires et métabolites qui provoquent l'infiltration des monocytes circulants vers le tissu adipeux, par un processus d'activation endothéliale. Au cours du rolling, les monocytes roulent sur les cellules endothéliales, l'activation des intégrines permet l'adhésion irréversible des monocytes sur l'endothélium vasculaire via les molécules d'adhésion ICAMs. Les monocytes transmigrent par la suite vers l'espace sous-endothélial. Au niveau du tissu adipeux, ils se différencient en macrophages et peuvent se*

Parallèlement, l'hypoxie est aujourd'hui proposée comme un autre mécanisme probablement impliqué dans le recrutement des monocytes circulants au sein du tissu adipeux hypertrophié. En raison de son hypertrophie, le tissu adipeux présente des zones hypoxiques. Les effets de l'hypoxie sont relayés par le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ , dont les niveaux d'expression sont augmentés dans le tissu adipeux obèse, alors qu'elle est significativement réduite en réponse à une perte de poids (**Cancello et al. 2005**). L'hypoxie serait également impliquée dans l'attraction des monocytes circulants, soit par un effet direct soit *via* l'augmentation de l'expression locale de leptine dont le gène est inductible par HIF-1 ; qui favoriserait à son tour l'expression de MCP-1. Ainsi, ces données suggèrent que l'infiltration des monocytes circulants dans le tissu adipeux contribuent à l'augmentation des macrophages infiltrés dans le tissu adipeux au cours de l'obésité. Dès lors, il est intéressant de se demander par quel(s) mécanisme(s) les macrophages sont retenus au sein du tissu adipeux obèse et comment cette rétention persiste au cours de l'obésité ?

Outre le phénomène d'infiltration des macrophages, des études plus récentes ont levé le jour sur d'autres mécanismes entrant en jeu dans l'accumulation et la rétention des macrophages au sein du tissu adipeux obèse. En effet, ces études montrent que les macrophages résidants dans le tissu adipeux, bien que considérés comme des cellules *post* mitotiques, peuvent subir une prolifération *in situ* et ainsi participer à la croissance de la fraction des macrophages au sein du tissu adipeux et à son maintien au cours de l'obésité (Amano et al., 2014 ; Zheng et al., 2016). De même, une autre étude a montré que l'inflammation, et plus particulièrement l'activation du facteur de transcription NF-kB dans les macrophages, contribue à la survie des macrophages du tissu adipeux au cours de l'obésité. En effet, il a été montré que l'activation des voies apoptotiques est significativement réduite dans les macrophages du tissu adipeux issus de souris soumises à un régime hyper-lipidique, et que ce phénomène est dépendant du facteur de transcription NF-kB (Hill et al., 2015).

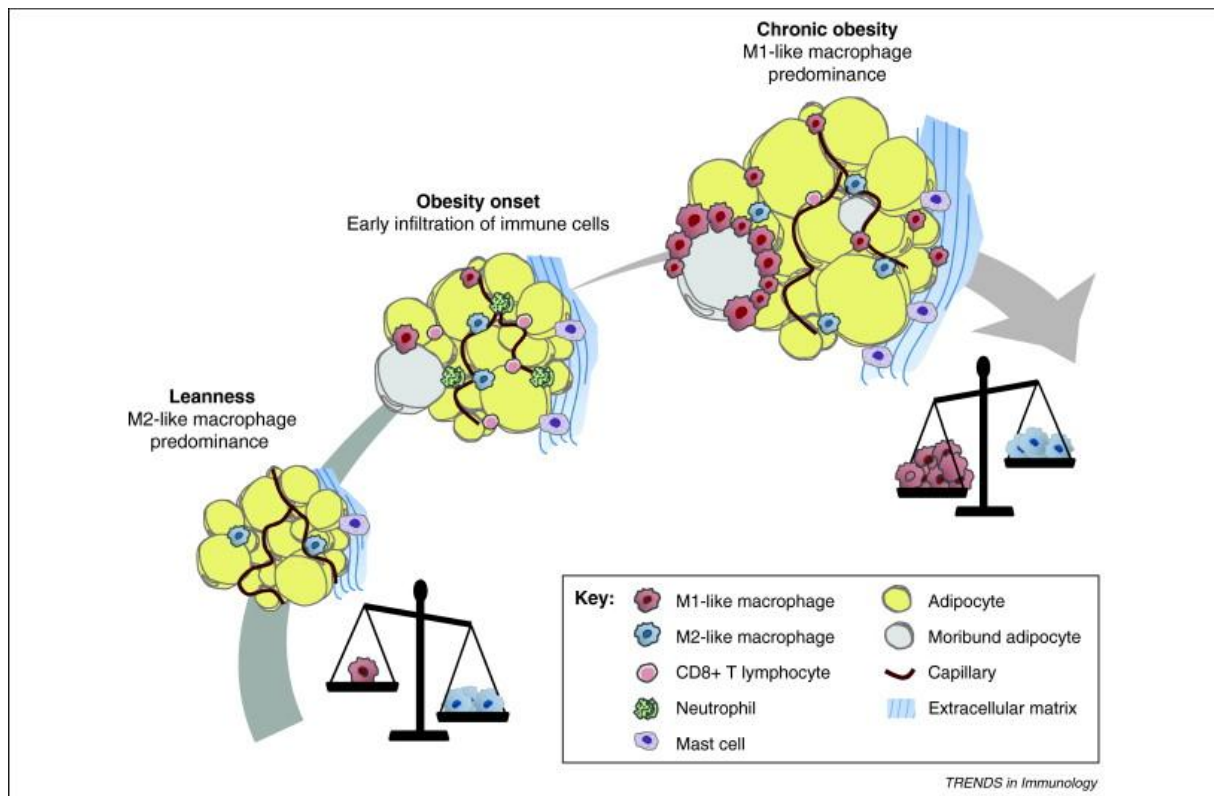
Par ailleurs, il a été montré que les cellules du lignage adipocytaire présentent des caractéristiques communes à celles du lignage macrophagique, incluant à la fois

similarité phénotypique mais surtout fonctionnelle (Ailhaud et al., 1992). Le tissu adipeux blanc est reconnu pour sa capacité à évoluer au cours de la vie, de façon très hétérogène en fonction des individus et de l'environnement. Il se développe principalement après la naissance et peut s'accroître de manière importante, conduisant à l'obésité, ou au contraire disparaître ou être quasiment inexistant dans des cas de jeûne ou de cachexie (Tisdale, 1997). L'accroissement de ce tissu est principalement causé par l'hypertrophie et/ou l'hyperplasie des adipocytes. Ces derniers sont issus de la maturation des pré-adipocytes présents dans la fraction de stroma vasculaire (SVF) (Ailhaud et al. 1992). En effet, les pré-adipocytes sont présents durant toute la vie adulte au sein du tissu adipeux et peuvent proliférer et se différencier en adipocyte mature en fonction de la balance énergétique. Ce phénomène de différenciation de pré-adipocytes en adipocytes matures semble réversible et des études décrivent une dé-différenciation d'adipocytes matures en pré-adipocytes (Zhang et al., 1996 ; Negrel et al., 1985). Ce point met en exergue la plasticité cellulaire dont les adipocytes sont dotés. En effet, l'analyse de la littérature révèle en outre, que les pré-adipocytes seraient capables, dans certains cas, de se convertir en macrophages et de présenter des fonctions phagocytaires et pro inflammatoires (Charrière et al., 2003). Chez des animaux obèses, il a en effet été montré que le potentiel cytotoxique des préadipocytes augmente, ce qui met en évidence leur activité *macrophage-like* dans un environnement de type inflammatoire (Cousin et al., 2001). Il a été montré que les pré-adipocytes en culture présentent une activité phagocytaire importante, cette capacité a été mise en évidence dans les pré-adipocytes murins et humains qu'ils soient issus de culture primaire ou de lignées. En outre, les pré-adipocytes humains présentent également une activité de phagocytose de corps apoptotiques (Cousin et al., 1999). Ainsi, l'augmentation du nombre de macrophages dans le tissu adipeux associée à l'obésité n'exclue pas la possibilité d'un *switch* pré-adipocytaire en macrophages, il a en effet été montré *in vivo* que la conversion des pré-adipocytes en macrophages existe et qu'elle est efficace et rapide (Charrière et al., 2003).

Ainsi, ces données mettent en exergue les divers mécanismes impliqués dans l'infiltration, l'accumulation et le maintien des macrophages M1 au sein du tissu adipeux obèse (**figure 3**). D'un point de vue physiologique, l'ensemble de ces modifications morphologiques du tissu adipeux vont fortement altérer sa fonction sécrétoire et dérégler sa physiologie, cette inflammation du tissu adipeux aura notamment pour conséquence l'installation d'une insulino-résistance dont nous discuterons les aspects



dans les parties suivantes.



### Figure 3 : Altérations cellulaires du tissu adipeux au cours de l'obésité

Le tissu adipeux sain renferme des macrophages résidents de phénotype M2, ces macrophages maintiennent l'homéostasie tissulaire. En cours de l'obésité, diverses cellules immunitaires infiltrent ce tissu parmi elles : les neutrophiles, les lymphocytes T CD8+ et les mastocytes. Lorsque l'obésité est chronique, les adipocytes sont hypertrophiés et les macrophages de polarisation M1, pro inflammatoires, prédominent. Dalmas et al., 2011

## Inflammation des autres tissus périphériques

### Le foie

L'obésité est actuellement la première cause de maladies hépatiques qui évoluent selon plusieurs stades. Au cours de l'obésité, le foie est également le siège d'une inflammation. Néanmoins, chez la souris sous régime hyperlipidique, il semble que l'inflammation hépatique apparait après celle du tissu adipeux (van der Heijden et al., 2015). En effet, l'obésité s'accompagne dans un premier temps d'une stéatose hépatique caractérisé par

une accumulation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme des hépatocytes (Festi et al., 2004). Le foie est caractérisé par la présence, en plus des hépatocytes, de cellules de Kupffer qui sont les macrophages résidants du foie. Ainsi, cette accumulation excessive de lipides au sein des hépatocytes déclenche l'évolution vers l'inflammation hépatique ou stéatohépatite non alcoolique (NASH) (Milic et al. 2014). Cette dernière se caractérise par l'activation des cellules de Kupffer vers un stade de type M1 et par l'apparition d'infiltrats inflammatoires composés de monocytes circulants et de lymphocytes. Le recrutement et l'activation des cellules immunitaires au niveau hépatique représente une étape cruciale dans la progression de la stéatose pure à l'inflammation, les cellules de Kupffer vont, par l'activation du facteur NF- $\kappa$ B, produire des cytokines pro inflammatoire comme le TNF- $\alpha$  et IL-6 mais également des chimiokines au fort pouvoir attracteur (Ghosh and Hayden 2008 ; Perlemuter et al., 2007). Lorsque cette inflammation persiste et devient chronique, une fibrose apparait. Cette dernière correspond à une formation excessive de tissu cicatriciel en vue de réparer et remplacer les cellules hépatiques endommagées. Le stade le plus aggravé de la fibrose est la cirrhose, sur laquelle se développe généralement un carcinome hépatocellulaire (Kleiner et al., 2005). Le foie joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie énergétique et la régulation du métabolisme glucidique, de ce fait, l'excès calorique et l'inflammation du foie associée à l'obésité ont des effets délétères sur le métabolisme hépatique notamment l'altération de l'insulino-sensibilité.

### *Le muscle squelettique*

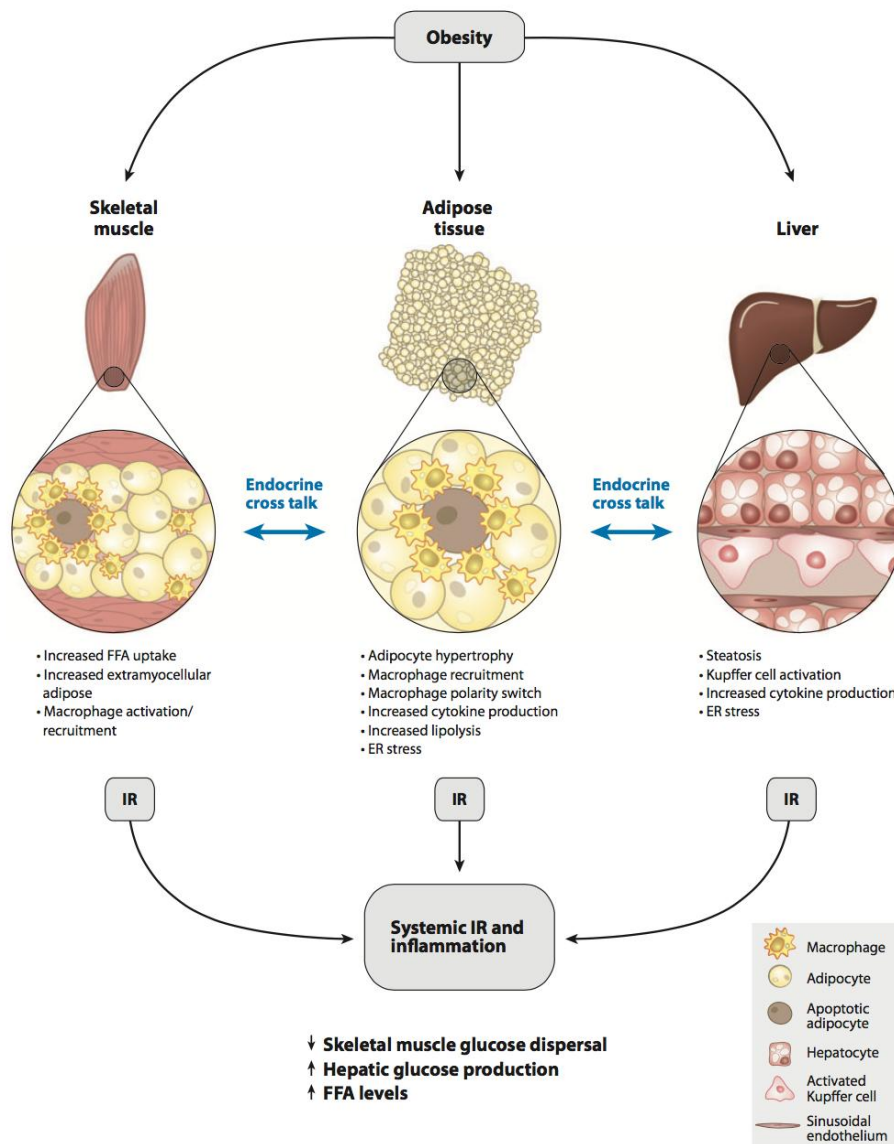
Le muscle squelettique est également sujet à une inflammation au cours de l'obésité. En effet, l'obésité est associée à un recrutement de macrophages au sein du muscle squelettique, ces macrophages présentent un phénotype M1 et expriment les marqueurs EMR1, CD11b et CD11c (Nguyen et al., 2007 ; Patsouris et al. 2008). Des études histologiques montrent que ces macrophages sont majoritairement localisés au sein des dépôts adipeux inter-musculaires qui s'accumulent en excès au cours de l'obésité. Toutefois le nombre de macrophages recrutés au sein du muscle squelettique au cours de l'obésité représente une moindre quantité par rapport à celui du tissu adipeux et du foie.

Ainsi, au cours de l'obésité, la suralimentation favorise l'installation de l'inflammation de bas grade et l'infiltration des macrophages au sein des tissus dont ils vont affecter le fonctionnement et l'intégrité. Chez le sujet obèse, cette inflammation favorise l'insulino-résistance notamment au niveau du tissu adipeux, du foie et du muscle. De ce fait, les

macrophages se placent au centre de ce dialogue entre inflammation et métabolisme.

## Insulino résistance associée à l'obésité

Afin de réguler la glycémie, l'insuline agit principalement sur les muscles, le foie et le tissu adipeux. L'efficacité de cette réponse définit les niveaux circulants de glucose, d'acides gras et autres métabolites (Schenk et al., 2008 ; De Luca and Olefsky 2008). Les niveaux sanguins de glucose sont principalement déterminés par la production hépatique de glucose, inhibée par l'insuline et la captation de glucose par les muscles, que l'insuline stimule. Au niveau du tissu adipeux, l'insuline active le transport et le stockage des acides gras sous la forme de triglycérides et inhibe la lipolyse des triglycérides. L'obésité est associée à une insulino-résistance au niveau de ces trois tissus cibles, il en résulte une diminution du transport insulino-dépendante de glucose par les muscles, une augmentation de la production hépatique de glucose et de la libération d'acide gras issus du tissu adipeux (Schenk et al., 2008 ; De Luca and Olefsky 2008). **(Figure 4)**. L'obésité est un déterminant majeur de l'insulino-résistance (Kahn et al., 2000). En effet, le risque d'insulino-résistance et de diabète de type 2 (DT2) est positivement corrélé à l'indice de masse corporelle (IMC) et à la masse du tissu adipeux. Nous avons précédemment décrit que l'obésité est associée à une inflammation chronique de bas grade ; or, les études ont montré que l'activation de voies pro-inflammatoires au cours de l'obésité – notamment la voie TLR4 que nous détaillerons – favorise l'installation de l'insulino-résistance (Schenk et al., 2008).



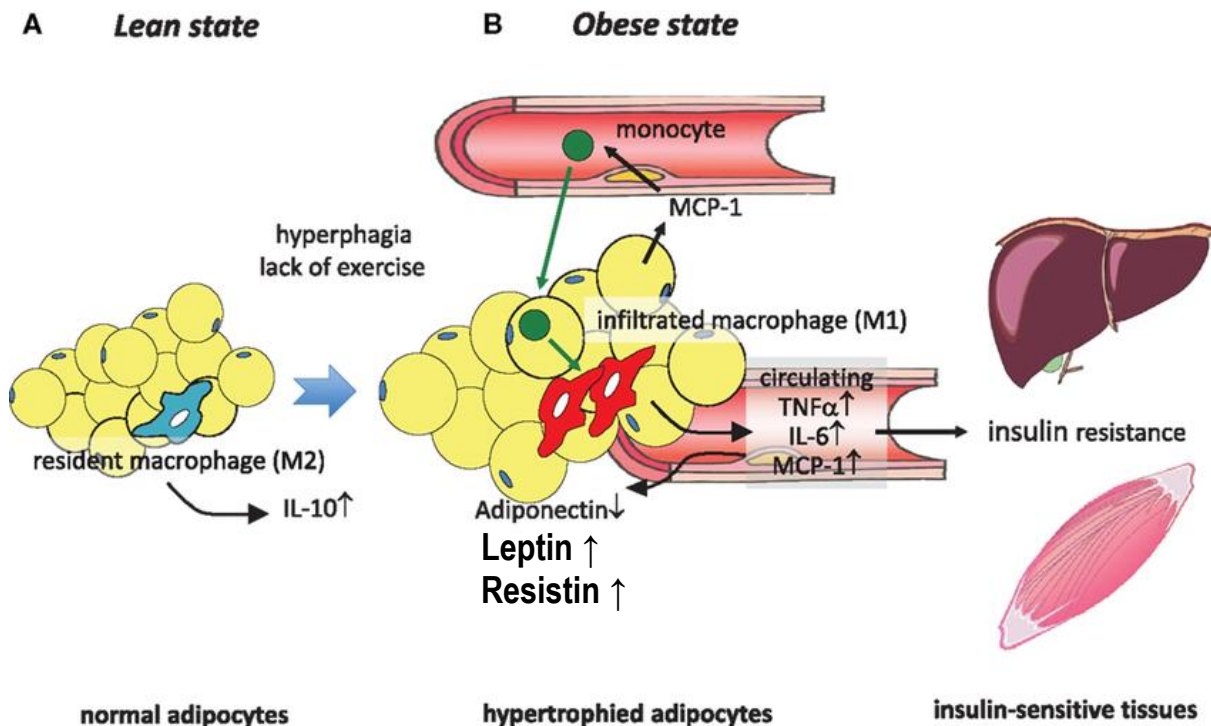
#### Figure 4 : Altérations du tissu adipeux, du foie et du muscle au cours de l'obésité et résistance à l'insuline

L'obésité induit des altérations dans le tissu adipeux dont l'hypertrophie des adipocytes et le recrutement accru de macrophages de polarisation M1 qui vont promouvoir l'inflammation. Ces altérations conduisent à une inflammation chronique et affecte les principaux tissus sensibles à l'insuline. En effet, au cours de l'obésité, le foie subit une stéatose et une activation des cellules de Kupffer, macrophages résidents de ce tissu. Dans le muscle, la capture d'acides gras libres augmente et provoque une augmentation du gras intercellulaire. L'ensemble de ces altérations renforcent l'inflammation chronique et l'installation de la résistance à l'insuline.

Source : Olefsky and Glass, 2010.

## Inflammation et résistance à l'insuline

Au cours de l'obésité, le tissu adipeux est infiltré par les macrophages provoquant une propagation de l'inflammation et une altération de la fonction sécrétoire de ce tissu (Weisberg et al., 2003 ; Xu et al. 2003). Or, il est maintenant bien admis que cette inflammation chronique associée à l'obésité constitue un facteur de risque majeur pour le développement de la résistance à l'insuline et du diabète de type 2 chez l'homme et dans des modèles animaux (Hotamisligil, 2006 ; Olefsky and Glass, 2010 ; Ouchi et al., 2011 ; Schenk et al., 2008 ; Shoelson et al., 2007). Les macrophages infiltrant le tissu adipeux constituent une source importante de molécules pro-inflammatoires. Ces dernières, associées à l'altération de la fonction sécrétoire du tissu adipeux, agissent de façon paracrine ou endocrine et provoquent une diminution de la sensibilité à l'insuline (**figure 5**). En effet, il a été montré que les adipocytes d'animaux obèses sont caractérisés par une augmentation des niveaux d'expression des facteurs pro-inflammatoires. D'une manière intéressante la neutralisation de l'expression de TNF $\alpha$  chez ces animaux améliore la sensibilité à l'insuline. Ces observations ont mis en évidence, pour la première fois, le lien entre une cytokine pro-inflammatoire produite par le tissu adipeux et la résistance à l'insuline (Hotamisligil et al. 1993). Ces données suggèrent la possibilité d'une action endocrine de ces cytokines pro-inflammatoires qui généraliseraient l'inflammation et l'altération de la sensibilité à l'insuline dans d'autres tissus (Hotamisligil et al., 1993 ; Shoelson et al., 2003). En effet, de nombreuses études montrent que l'élévation des niveaux plasmatiques de TNF-a, IL-6 ou IL-1b altèrent la sensibilité à l'insuline dans les cellules insulino-sensibles (Hirosumi et al. 2002 ; Hotamisligil et al. 1995, Itani et al., 2002). Il en découle l'activation de la kinase JNK, de IKK $\beta$  (inhibiteur de la kinase  $\kappa$ B) et d'autres serine kinases. En effet, chez l'homme et le rongeur insulino-résistants, l'activation des kinases JNK1 est plus élevée dans le muscle, le tissu adipeux et le foie. Ces kinases activent les facteurs de transcription comme NF $\kappa$ B (*nuclear factor  $\kappa$ B*) ou AP-1 (*activator protein 1*) qui, à leur tour, provoquent la transcription de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire (Nguyen et al., 2007).



**Figure 5 : Altérations de la fonction sécrétoire du tissu adipeux et résistance à l'insuline**

*Au cours de l'obésité, le tissu adipeux s'hypertrophie et subit une infiltration macrophagique qui va promouvoir l'inflammation et l'altération de sa fonction sécrétoire. En effet, en tant que tissu endocrine, le tissu adipeux produit et sécrète des adipokines ayant un rôle dans l'homéostasie énergétique. Au cours de l'obésité, le tissu adipeux produit d'avantage de cytokines pro inflammatoires qui vont gagner la circulation et promouvoir une inflammation chronique généralisée. De même, la production d'adiponectine, hormone insulino-sensibilisatrice, est fortement diminuée alors que la leptine et la résistine, qui favorise la résistance à l'insuline, sont davantage exprimées. L'inflammation chronique, de paire avec l'altération de la production d'adipokines par le tissu adipeux va promouvoir la résistance à l'insuline dans les principaux tissu insulino-sensibles (foie et muscle). Tateya et al.,2013*

De même, une des actions majeures de ces sérines kinases est la diminution de la sensibilité à l'insuline par la phosphorylation en résidus sérine des principaux acteurs de la signalisation de l'insuline. Ces phosphorylations sur résidus sérine interfèrent avec l'action de l'insuline ce qui crée un état de résistance cellulaire à l'insuline. En effet, le KO (knockout) ou l'inhibition de JNK1 ou de IKK $\beta$  protège contre l'insulino-résistance dans des

modèles cellulaires et murins (Hirosumi et al., 2002, Solinas et al., 2007, Hundal et al., 2002). Par ailleurs, JNK inhibe aussi la sécrétion de l'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques, ce mécanisme passe par la cytokine pro-inflammatoire IL1 $\beta$  (Lanuza-Masdeu et al., 2013). L'inactivation de JNK1 dans le foie, le tissu adipeux et le muscle améliore la sensibilité à l'insuline (Nakatani et al., 2004 ; Zhang et al., 2011) alors que son activation est associée avec l'obésité et la résistance à l'insuline (Han et al., 2013 ; Lanuza-Masdeu et al., 2013).

Nous avons précédemment évoqué la fonction endocrine du tissu adipeux qui sécrète des adipokines qui affectent positivement ou négativement la sensibilité à l'insuline. Produites par le tissu adipeux, toute hausse ou baisse de la masse adipeuse s'accompagne inévitablement d'une altération de la production de ces hormones. Les études montrent que l'inflammation chronique de bas grade provoque une modification du profil sécrétoire du tissu adipeux au cours de l'obésité, et que cette fluctuation favorise l'installation de l'insulino-résistance (Trayhum, 2005 ; Xu et al., 2003).

## Dérèglement de la sécrétion des adipokines et insulino résistance

### *Adiponectine*

Majoritairement produite par le tissu adipeux blanc, l'adiponectine est une protéine de 244 acides aminés (Lord et al., 2005 ; Berner et al., 2004). Elle est impliquée dans le métabolisme glucidique et lipidique et joue un rôle primordial dans la physiopathologie de l'obésité et du diabète de type 2. En effet, une adiponectinémie basse est prédictive d'une résistance à l'insuline ou d'un diabète de type 2. Au niveau plasmatique, l'adiponectine existe sous des formes monomériques et multimériques de haut, moyen ou bas poids moléculaire. Afin d'exercer son action cellulaire, l'adiponectine se lie à deux récepteurs : AdipoR1 et AdipoR2, principalement exprimés dans le muscle et le foie, respectivement. Les AdipoR sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui présentent toutefois une singularité par rapport aux récepteurs couplés aux protéines G : leur partie N-terminale est intracellulaire et la partie C-terminale extracellulaire (Yamauchi et al., 2003). Lorsqu'ils sont activés par l'adiponectine, les AdipoR lient APPL, protéine adaptatrice qui va relayer l'activation de l'AMPK (adenosine monophosphate activated kinase) (Tosca et al. 2003). L'activation indirecte de l'AMPK par l'adiponectine augmente la sensibilité à l'insuline. En effet, dans le foie, l'adiponectine augmente la phosphorylation

du récepteur à l'insuline, diminue la néoglucogenèse et augmente l'oxydation des acides gras (Berg et al. 2001 ; Yamauchi et al., 2002). Au niveau musculaire, l'activation de l'AMPK conduit à l'inactivation de l'acétylCoA, ce qui a pour conséquence une augmentation de l'oxydation des acides gras (Yamauchi et al., 2002 ; Fruebis et al., 2001). De même, l'adiponectine facilite la translocation des transporteurs GLUT4 dans le muscle, ce qui a pour conséquence d'abaisser la glycémie (Ceddia et al., 2005).

Au cours de l'obésité, la fonction sécrétoire du tissu adipeux est altérée et conduit à une diminution de la production d'adiponectine. Les études montrent en effet que les niveaux d'adiponectine sont diminués chez les sujets insulino-résistants ou souffrant de diabète de type 2 (Frystyk et al. 2007). Il a été montré et observé que TNF- et IL-6 inhibent la production d'adiponectine, ce qui expliquerait l'hypoadiponectinémie chez les sujets obèses (Lumeng et al., 2007).

## *Leptine*

La leptine est une hormone principalement produite par le tissu adipeux ; ses niveaux plasmatiques sont proportionnels au degré d'adiposité (Zhang et al., 1994). Codée par le gène *ob*, la leptine régule le comportement alimentaire ainsi que la balance énergétique. En effet, lorsqu'elle est injectée chez le rongeur génétiquement obèse ou rendu obèse par un régime hyper-lipidique, la leptine diminue le poids corporel et la masse adipeuse (Campfield et al., 1995). De même, une déficience en leptine chez la souris (Zhang et al., 1994) ou chez des sujets humains (Montague et al., 1997) est associée à une obésité massive. Ainsi, le taux circulant de leptine, principalement d'origine adipocytaire, est perçu comme un signal d'adiposité informant le système nerveux central de l'état des réserves lipidiques de l'organisme et modulant le comportement alimentaire et les dépenses énergétiques en fonction de celles-ci (Zhang et al., 1994 ; Maffei et al., 1995). L'action anorexigène de la leptine au niveau hypothalamique sera évoquée dans le chapitre II.

Chez les personnes obèses, un excès de masse adipeuse s'associe systématiquement à des taux élevés de leptine dans le sang (Friedman et al., 1997). Paradoxalement, cette hyper-leptinémie ne réduit pas la prise alimentaire et n'augmente pas les dépenses énergétiques (Maffei et al., 1995). De ces observations, la notion de résistance à la leptine a vu le jour, il s'agit de l'incapacité de l'organisme à répondre de manière adaptée à la leptine endogène ou exogène. Cette résistance à la leptine chez les individus obèses



altère l'action anorexigène de la leptine (Klein et al., 2006 ; Myers 2008). En outre, la résistance à la leptine est considérée comme un facteur qui contribue au développement du diabète de type 2 au cours de l'obésité. En effet, des niveaux élevés de leptine peuvent constituer un risque important de développer une résistance à l'insuline (Jialal et al., 2014). Il existe en effet un dialogue entre la voie de signalisation de la leptine et celle de l'insuline. Ainsi, la résistance à la leptine chez l'obèse contribue à l'installation de la résistance à l'insuline (Benomar et al., 2005a ; Benomar et al., 2005b).

## *Résistine*

### Découverte de la résistine

La résistine est un polypeptide riche en cystéine, de 12,5-kDa. La résistine est une hormone dont le nom provient de son effet tissulaire : l'insulino-résistance. En effet, l'étude ayant conduit à la découverte de la résistine démontre que les adipocytes murins produisent la résistine et que ses niveaux circulants sont fortement réduits suite à un traitement de rosiglitazone, un puissant anti-diabétique (Steppan et al., 2001). De même, l'étude montre que les niveaux circulants de résistine sont augmentés chez les souris rendues obèses par la consommation d'un régime hyper lipidique ou présentant une obésité génétique, suggérant ainsi que la résistinémie serait corrélée à la masse adipeuse. Les effets insulino-résistants de la résistine ont de même été relatés par cette étude pionnière qui démontre que l'administration d'anticorps dirigés contre la résistine améliore la glycémie et la sensibilité à l'insuline de souris rendues obèses. Inversement, le traitement de souris saines par la résistine recombinante provoque une intolérance au glucose ; si la résistine est neutralisée, le transport du glucose dans les adipocytes est amélioré. Les taux de résistine sont élevés chez le sujet obèse prédisposant à l'insulino-résistance. L'étude propose ainsi, et pour la première fois, que la résistine serait une cause d'installation du diabète chez les sujets obèses.

### La résistine murine et humaine : présentation

Le profil d'expression de la résistine diffère considérablement entre l'homme et les rongeurs, elle est en effet essentiellement sécrétée par les adipocytes matures chez les rongeurs et par les cellules mononuclées du sang périphériques (PBMC) ainsi que les macrophages chez l'homme (Steppan et al., 2001 ; Patel et al., 2003 ; Verma et al., 2003). Chez la souris, le gène qui code pour la résistine est situé sur le chromosome 8A1 et code

pour un précurseur de 114 acides aminés qui sera clivé pour donner la forme mature de la résistine qui comporte 94 acides aminés (Ghosh et al., 2003). L'extrémité N-terminale de la résistine forme une structure en super hélice  $\alpha$  tandis que la partie C-terminale se compose de plusieurs feuillets  $\beta$  antiparallèles (Patel et al., 2004). On retrouve la résistine sous deux formes dans la circulation, une forme hexamérique et une forme trimérique, moins présente mais plus réactive (Patel et al., 2004).

Chez l'homme, la résistine se compose de 108 acides aminés, riche en cystéine, elle est codée par le gène *Retn* qui se situe sur le chromosome 19p13.3 (Ghosh et al., 2003). La résistine humaine présente également des différences structurales par rapport à la résistine murine. En effet les deux protéines ne possèdent que 54% de similarité de séquence en acides aminés. La partie N-terminale de la résistine humaine est également constituée d'une structure en super hélice  $\alpha$  cependant, cette dernière ne contient pas de structure en feuillets  $\beta$  dans la partie C-terminale mais des hélices  $\alpha$  (Ghosh et al., 2003). La résistine humaine est capable de former des dimères, des trimères et des multimères (Raghu et al., 2004). Les études montrent que l'oligomérisation de la résistine joue un rôle crucial dans ses effets pro-inflammatoires, en effet plus le niveau d'oligomérisation est élevé, plus l'action pro-inflammatoire de la résistine est importante (Aruna et al., 2008).

A l'échelle génique, les séquences qui codent pour la résistine possèdent des régions régulatrices différentes entre l'homme et les rongeurs, ceci suggèrent que la résistine humaine et murine sont régulées de façons différentes et qu'elle peut agir de façon distincte chez ces deux espèces. Dans les adipocytes murins, les études montrent que l'expression de la résistine est stimulée par des niveaux élevés de glucose mais abaissée par la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  (Schwartz et al., 2011). A l'inverse, l'expression de la résistine humaine est fortement induite dans les macrophages et les cellules PBMC par des stimuli inflammatoires incluant le LPS (lipopolysaccharide), le TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  ainsi que la résistine elle-même (Schwartz et al., 2011). De façon similaire aux rongeurs, le traitement par l'antidiabétique thiazolidinedione provoque une baisse de l'expression de la résistine dans les macrophages humains et réduit les niveaux circulants de résistine.

#### Rôle de la résistine murine dans la résistance à l'insuline

Chez les rongeurs, la résistine est un médiateur de la résistance à l'insuline. En effet, les niveaux circulants de résistine sont élevés chez les souris obèses et l'administration de résistine recombinante chez des souris normales altère l'action de l'insuline (Steppan et al.,

2001). De même, l'administration centrale et périphérique de résistine recombinante et la surexpression de la résistine induit une résistance hépatique à l'insuline chez la souris. Le traitement d'adipocytes 3T3-L1, de cardiomyocytes murins et de cellules de muscles squelettiques en culture par de la résistine murine diminue le transport du glucose insulino dépendante (Lazar, 2007). De même, l'invalidation du gène de la résistine améliore la sensibilité hépatique à l'insuline chez des souris consommant un régime hyper-lipidique (HFD) (Schwartz et al., 2011). La résistine murine induit de même une diminution de la phosphorylation de l'AMPK (5' adenosine monosphosphate-activated protein kinase) dans le foie, le muscle squelettique et le tissu adipeux blanc (Banerjee et al., 2004). Inversement, l'inhibition de la résistine conduit à l'augmentation de la phosphorylation de l'AMPK (Muse et al., 2004). En outre, la résistine murine interfère avec de nombreuses étapes de la cascade de signalisation de l'insuline, incluant la phosphorylation des IRS (Insulin Receptor Substrate) et l'activation de la protéine kinase Akt dans le foie, le muscle et le tissu adipeux blanc (Muse et al., 2004 ; Stepan et al., 2005). Le traitement par la résistine chez les rongeurs induit une augmentation de l'expression de SOCS-3, connu pour ses effets dans la régulation négative de l'insuline dans le foie, le muscle et le tissu adipeux blanc (Stepan et al., 2005). Le mécanisme exacte entrant en jeu dans la médiation des effets insulino-résistants de la résistine murine n'est toutefois pas totalement clair. En effet, de nombreuses études proposent des récepteurs possibles pour la résistine, parmi eux :

- Une étude de 2011 montre qu'un isoforme de la Décorine ( $\Delta$ DCN) serait un récepteur de la résistine. Présent sur les cellules adipocytaires progénitrices, la résistine lierait le récepteur  $\Delta$ DCN et contribuerait à la régulation de l'expansion du tissu adipeux blanc (Daquinag et al., 2011)
- De plus, une interaction entre la résistine et le récepteur ROR1 a été montrée en 2012 dans des cellules murines adipeuses 3T3-L1. L'étude montre que l'interaction de la résistine avec ROR1 provoque l'inhibition de la phosphorylation de ROR1 qui module la phosphorylation de la kinase ERK  $\frac{1}{2}$  (extracellular signal regulated kinase) et régule l'expression du régulateur négatif de la voie de l'insuline SOCS-3 ainsi que celle des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT4 (Sanchez Solana et al., 2012).

## Rôle de la résistine humaine dans l'inflammation

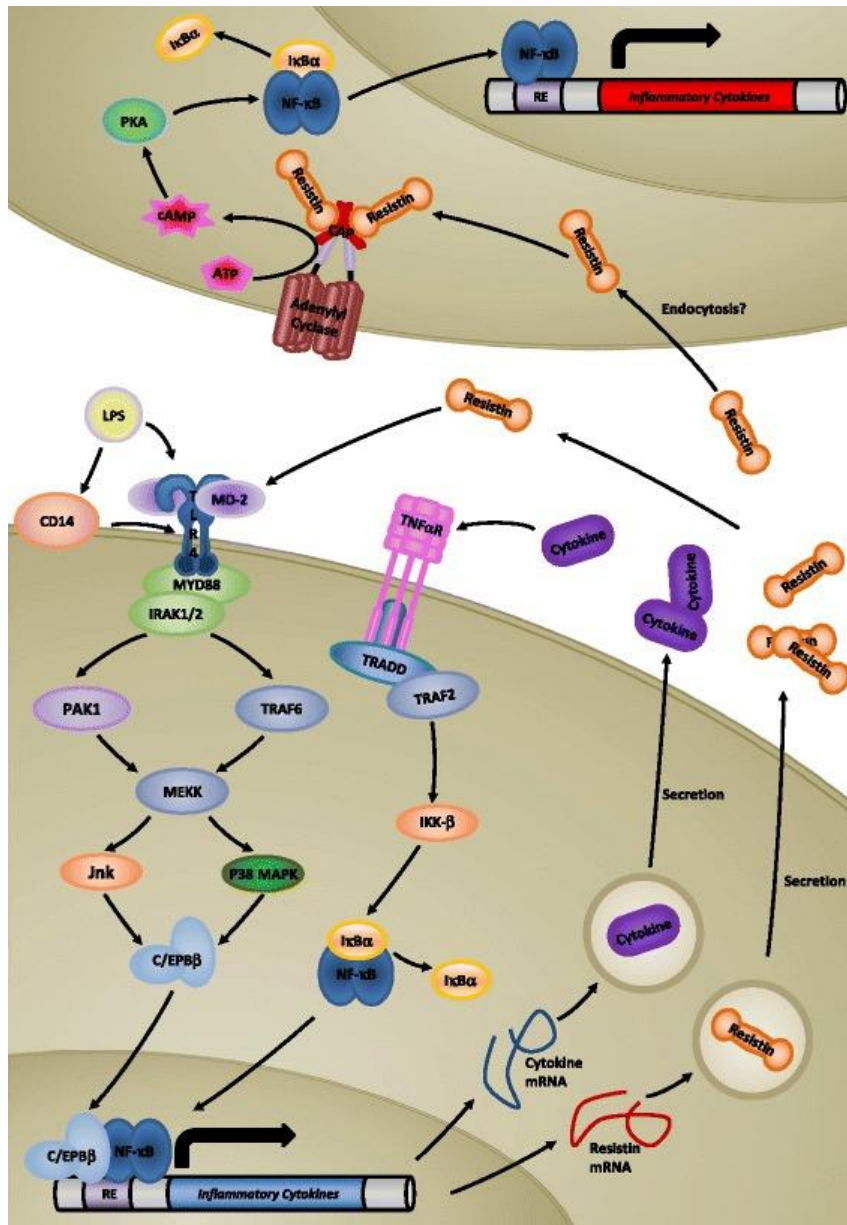
La résistine humaine joue un rôle majeur dans la régulation de la réponse inflammatoire (Filkova et al., 2009) au cours de laquelle, les macrophages et les cellules vasculaires sont des cibles de l'action de la résistine (Jamaluddin et al., 2012). La résistine induit une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 ainsi que celle de la chimiokine MCP-1 dans les cellules PBMCs, les macrophages et les cellules de Kupffer. Ces effets sont médiés par la voie de signalisation impliquant le facteur de transcription NF $\kappa$ B (Bokarewa et al., 2005). L'expression de la résistine chez l'homme a également été identifiée dans la fraction du stroma vasculaire du tissu adipeux blanc, dans le foie stéatosé ainsi que des lésions d'athérosclérose (Jung et al., 2006). En effet, les taux circulants de résistine chez l'homme sont corrélés aux marqueurs de l'inflammation chez les individus atteints de diabète de type 2 mais également d'athérosclérose coronarienne ou de maladies chroniques des reins (Park et al., 2013). L'ensemble de ces observations suggèrent que la résistine humaine possède des propriétés pro-inflammatoires évidentes et qu'elle intervient dans différentes pathologies inflammatoires.

## Rôle de la résistine humaine dans la résistance à l'insuline

Au vue de l'action de la résistine chez le rongeur sur la sensibilité à l'insuline, de nombreuses études cliniques ont examiné la relation entre les taux circulants de résistine chez l'homme et la résistance à l'insuline chez des individus obèses diabétiques ou non (Park et al., 2013). Alors que certaines études montrent une corrélation positive entre la résistine et l'insulino-résistance, d'autres ne parviennent pas à la même conclusion (Codoner-Franch et al., 2015). Toutefois, ces divergences dans les résultats peuvent s'expliquer par des études réalisées sur des échantillons trop petits, une disparité importante dans les populations analysées, ainsi qu'une variation dans le degré d'obésité. Afin de déterminer si la résistine humaine peut contribuer à la résistance à l'insuline, l'équipe de Lazar a produit un modèle murin transgénique exprimant la résistine humaine et non murine, le modèle Hum-Retn (Park et al., 2011). Les souris Hum-Retn présentent une résistinémie identique à celle observée chez l'homme. Les chercheurs de cette étude ont soumis les souris Hum-Retn à une endotoxémie chronique et ont montré qu'en réponse à ce traitement par le LPS, les niveaux circulants de résistine ont augmenté, de façon similaire à l'homme (Park et al., 2011). De plus, les souris Hum-Retn soumises à l'endotoxémie chronique et dont le taux de résistine était élevé ont développé une

résistance à l'insuline aux niveaux hépatiques et musculaires. Ces résultats suggèrent fortement que la résistine humaine est également impliquée dans la résistance à l'insuline associée à l'inflammation. De même, une étude de cas a montré que les individus dont le niveau basal de résistine est plus élevé présentent un risque significativement plus élevé de développer un diabète de type 2 (Schwartz et al., 2011 ; Chen et al. 2009).

Le récepteur humain de la résistine reste pour le moment inconnu, toutefois, le récepteur TLR4 (Toll-like receptor) et le récepteur CAP1 (adenylyl cyclase associated protein 1) ont récemment été proposés en tant que candidats putatifs (Tarkowski et al., 2010 ; Lee et al., 2014). En effet, les études montrent que la résistine recombinante humaine passe par le récepteur TLR4 pour initier ses effets pro-inflammatoires dans les cellules myéloïdes et épithéliales humaines (**figure 6**) (Tarkowski et al., 2010). De même, notre équipe a démontré pour la première fois en 2013 chez le rat, que la résistine humaine peut directement lier le récepteur TLR4 dans l'hypothalamus pour promouvoir ses effets pro-inflammatoires et insulino-résistants (Benomar et al., 2013). Une étude menée en 2014 soutient que CAP1 (adenylyl cyclase associated protein 1) serait le récepteur de la résistine humaine au sein des monocytes (Lee et al 2014).



**Figure 6 : Mécanisme d'action de la résistine humaine**

La résistine lie et active TLR4, il résulterait de cette liaison une autorégulation positive de l'expression de la résistine et une induction de l'expression des cytokines pro inflammatoires. Alternativement, la résistine serait capable d'activer le récepteur CAP-1, il en résulterait une augmentation de l'AMPC intracellulaire qui induit l'expression génique de NF-κB qui active lui même l'expression des cytokines pro inflammatoire. Afin d'activer CAP-1, la résistine doit être internalisée, il est possible qu'un mécanisme d'endocytose soit mis en jeu. Hannan and Culligan, 2015

L'étude montre, dans des monocytes humains THP-1, que la résistine, interagit avec CAP1 et induit une augmentation de la concentration en AMPc intracellulaire, provoquant ainsi l'activation d'une cascade de signalisation qui aboutit à l'activation de NFkB et l'expression des gènes codant pour les cytokines pro inflammatoires TNF-a, IL-6 et IL-1b. Toutefois, l'étude ne démontre pas clairement comment l'interaction entre la résistine et CAP1 a lieu. En effet, CAP1 est une protéine cytosolique qui ne possède pas de domaine transmembranaire (Hubberstey and Mottillo, 2002) alors que la résistine est une protéine circulante (**figure 6**). Au vu de ces observations et du fait que TLR4 soit un récepteur de l'immunité innée hautement impliqué dans les réponses inflammatoires, il semblerait qu'il soit un sérieux candidat. En effet, de nombreuses études placent TLR4 au centre de la médiation de l'inflammation métabolique conduisant à la résistance à l'insuline au cours de l'obésité.

## Récepteur TLR4 : lien entre inflammation et résistance à l'insuline

### *Toll-like récepteur : présentation et rappel*

Les récepteurs *Toll-Like* existent chez l'homme et les mammifères, ils doivent leur appellation au fait qu'ils possèdent une homologie avec les récepteurs de type *Toll* décrits précédemment chez la drosophile. Très conservés au cours de l'évolution, ces récepteurs jouent un rôle vital dans l'immunité innée (Takeda et al., 2003). En effet, ils sont membres de la superfamille des PRR (Pattern-Recognition Receptor), dont la fonction est de détecter des motifs répétés et fonctionnels des pathogènes, nommés PAMP pour « Pathogen-Associated Molecular Patterns » (Medzhitov and Janewat 1997 ; Akira and Takeda 2004). Les TLR sont des récepteurs transmembranaires de type 1, ils possèdent des ectodomains LRR riches en leucine (Leucine-Rich Repeat) favorisant l'interaction avec les PAMP, un domaine transmembranaire, ainsi qu'un domaine cytoplasmique TIR (Toll-Interleukin-1 Receptor) dont la présence est fondamentale pour la transduction du signal (Takeuchi and Akira 2010). Des études de cristallographie des ectodomains des TLR ont permis de décrire de façon structurelle les interactions entre les TLR et leurs ligands, les PAMP (Jin et Lee, 2008). En effet, ceux-ci peuvent être des lipides, des lipoprotéines, des protéines ou des acides nucléiques dont la provenance peut être bactérienne, virale, parasitaire ou issue de champignons. La reconnaissance des ligands PAMP par les TLR peut avoir lieu dans différents compartiments cellulaires y compris la

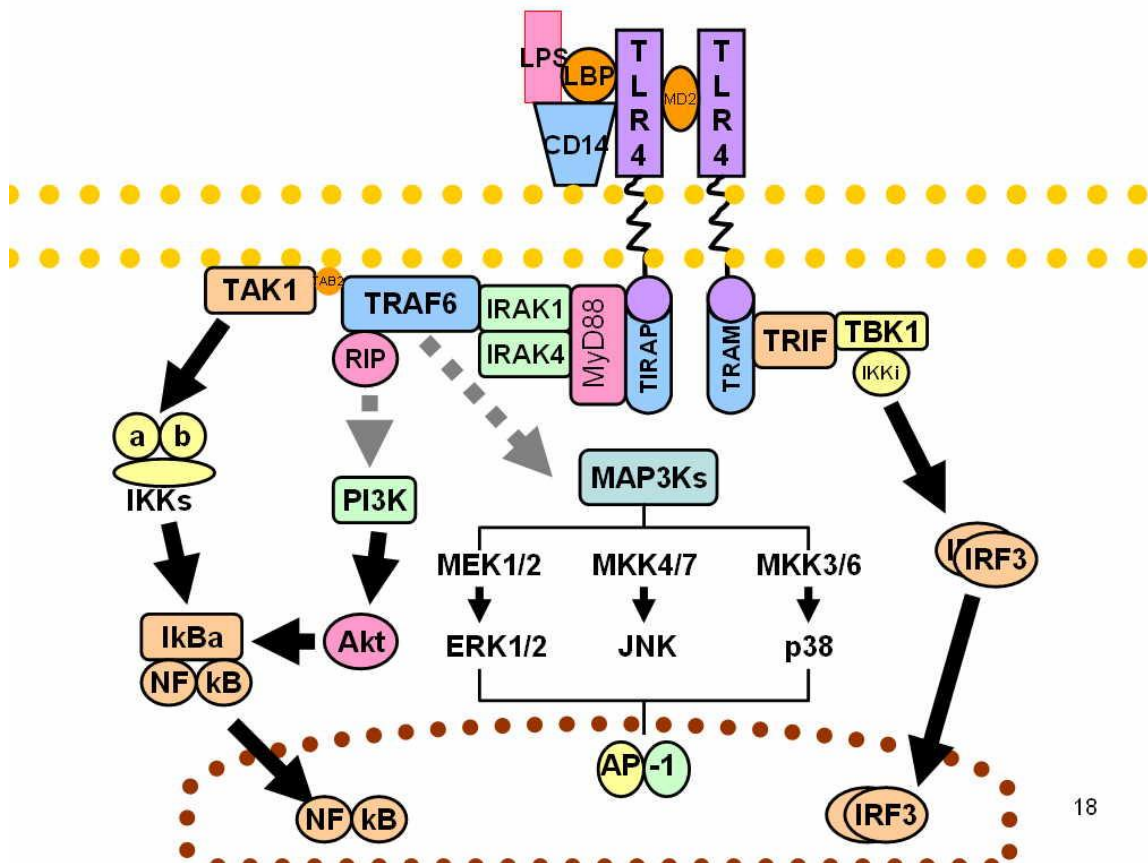
membrane plasmique, les endosomes, les lysosomes ou les endolysosomes (Akira et al., 2006). Les TLR sont exprimés par la plupart des cellules immunitaires comme les macrophages, les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques et les plaquettes. En outre, ils sont largement exprimés par des tissus chez les mammifères (Vahanan et al 2008, Menzies et al 2006). Alors que les TLR sont essentiels pour l'immunité, des réponses inappropriées peuvent provoquer des inflammations chroniques et aiguës, voire même des maladies auto-immunes. Dans la suite de ce chapitre, l'attention sera portée sur le rôle du récepteur TLR4 dans l'inflammation et l'insulino résistance associées à l'obésité.

TLR4 est le premier récepteur TLR à avoir été identifié chez les mammifères (Medzhitov et al 1997). Il est le principal récepteur de l'endotoxine bactérienne : le lipopolysaccharide (LPS). Ce composant des parois bactériennes gram négatives est reconnu par le TLR4 par sa partie lipidique A. De même, TLR4 reconnaît également certains acides gras saturés qui peuvent induire la transduction de son signal (Pal et al, 2012).

#### *Signalisation de TLR4 : voie Myd88 dépendante*

La voie myd88 dépendante est celle qu'emprunte le LPS afin d'induire la transduction du signal via son récepteur TLR4. Au niveau systémique, le LPS est tout d'abord reconnu par la protéine LBP (LPS binding protein) (Chaby et al., 2004). Ce complexe LBP/LPS se lie alors au co-récepteur du TLR4, le CD14. Par la suite, l'ensemble s'associe au complexe TLR4/MD-2 (Kornbluth, Oh et al 1989). La liaison du LPS au TLR4 provoque le recrutement de l'adaptateur Myd88 (Myeloid Differentiation 88) au niveau de son propre domaine TIR et vers le domaine TIR de TLR4 (Bruns, Martinon et al 1998 ; Kawai and akira 2007). Cette interaction TIR-TIR provoque le recrutement de la protéine IRAK4 (IL-1 receptor associated kinase) qui va phosphoryler la protéine IRAK1 et permettre son association avec TRAF6 (TNF receptor activating factor). Une fois activé, TRAF6 se dissocie de cette association et se lie à TAB2 (TAK1 binding protein 2) activant ainsi TAK1 (Transforming growth factor  $\beta$  activated protein) (Gohda et al 2004). TAK1 va par la suite activer les voies IKK/NF $\kappa$ B et des MAP kinases P38, JNK et ERK1/2 (Sato et al, 2005) (**figure 7**).





18

**Figure 7 : Voies de signalisation du récepteur TLR4**

Deux principales voies de signalisation sont activées par le récepteur TLR4. La voie MyD88 dépendante aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires, alors que la voie dépendante de TRIF (aussi appelée voie MyD88 indépendante) conduit à la synthèse d'interférons de type 1.

**Signalisation de TLR4 : voie Myd88 indépendante**

Par ailleurs, TLR4 présente également une voie de signalisation indépendante de l'adaptateur Myd88. Dans cette voie, la protéine TRIF remplace Myd88. TRIF possède également un domaine TIR et trois domaines de liaisons à TRAF6 qu'elle va ainsi pouvoir recruter (Akira and Takeda 2004). Ceci aboutit à l'activation de NFκB de façon similaire à la voie Myd88. De même, le recrutement de TRAF3 par TRIF aboutit à l'activation du facteur de transcription IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) qui contrôle la transcription de l'interféron β (Lu et al 2008b) (figure 7).

## *Toll-like récepteur : rôle dans l'insulino-résistance associée à l'obésité*

L'implication du récepteur TLR4 dans l'installation de l'obésité et la résistance à l'insuline est fortement suggérée. En effet, le récepteur TLR4 est exprimé dans les cellules immunitaires mais aussi dans les principaux tissus impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique comme le tissu adipeux, le foie, le muscle et l'hypothalamus (Tanti et al., 2012). De plus, les niveaux d'expression du récepteur TLR4 sont augmentés chez les souris obèses et les patients diabétiques (Catalán et al., 2012; Mraz et al., 2011; Reyna et al., 2008; Shi et al., 2006; Song et al., 2006). En outre, l'expression de TLR4 est négativement corrélée avec la sensibilité à l'insuline (Könner and Brüning 2011). Ainsi, ces études suggèrent que TLR4 contribue fortement à la résistance à l'insuline associée à l'obésité. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ces observations.

D'une part, l'augmentation des niveaux circulants d'acides gras saturés libre contribue fortement au développement de l'insulino-résistance associée à l'obésité, et ceci en partie *via* le récepteur TLR4. En effet, les acides gras saturés conduisent à l'activation du récepteur TLR4 initiant ainsi la production de molécules pro-inflammatoires (Fresno et al 2011, Milanski et al 2009). Une étude a montré qu'une perfusion de lipides provoque une insulino-résistance chez des souris de phénotype sauvage, alors que des souris déficientes en TLR4 ayant reçu le même traitement ne présentent pas cette altération (Shi et al., 2006). Ces résultats mettent en évidence le rôle central de TLR4 dans la médiation de l'insulino-résistance induite par les acides gras. En outre, il a été montré qu'une mutation perte de fonction de TLR4 chez la souris protège contre le développement de l'obésité induite par un régime riche en lipides. Ces souris présentent une diminution de l'adiposité ainsi qu'une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans le tissu adipeux, les muscles et le foie comparées aux souris témoins (Tsukumo et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'obésité s'accompagne d'une endotoxémie métabolique. Celle-ci se traduit par des niveaux circulants plus élevés de LPS (lipopolysaccharides) qui proviennent majoritairement des bactéries à Gram négatives de la flore intestinale. En effet, il a été montré qu'un régime hyperlipidique modifie la flore et la perméabilité intestinale, ceci contribue à l'endotoxémie métabolique (Amar et al 2011 ; Cani et al 2007). Chez la souris, la consommation d'un régime hyper-lipidique augmente la part de LPS au sein du microbiote intestinal et, après 4 semaines de régime hyper-lipidique, l'endotoxémie apparaît (Cani et al., 2007). Ces niveaux élevés de LPS activeraient la voie LPS/TLR4 qui participe à l'inflammation de bas grade caractérisant l'obésité et l'insulino-résistance. La stimulation anormalement élevée du récepteur TLR4 au cours de l'obésité conduit, en plus

de l'inflammation, à une résistance à l'insuline. En effet, les études ont montré que la stimulation de TLR4 active la phosphorylation de la kinase JNK qui à son tour augmente la phosphorylation de IRS1 (Insulin receptor substrate 1) sur résidus sérine inhibant ainsi la voie de signalisation IR/IRS1 (Hirosumi et al, 2002 ; Tsukumo et al., 2007).

Ainsi, la consommation d'un régime hyper lipidique provoque une surexposition à des nutriments riches en énergie dont l'organisme n'a pas besoin, provoquant une inflammation chronique à bas bruit qui favorise la résistance à la leptine et à l'insuline. Nous avons vu que divers tissus périphériques sont fortement affectés par ces désordres métaboliques. Le système nerveux central et plus particulièrement l'hypothalamus, est également sensible aux surplus énergétiques (De Souza et al., 2005). Il est décrit au cours de l'obésité une inflammation du système nerveux central.

## II. Neuro inflammation et obésité

---

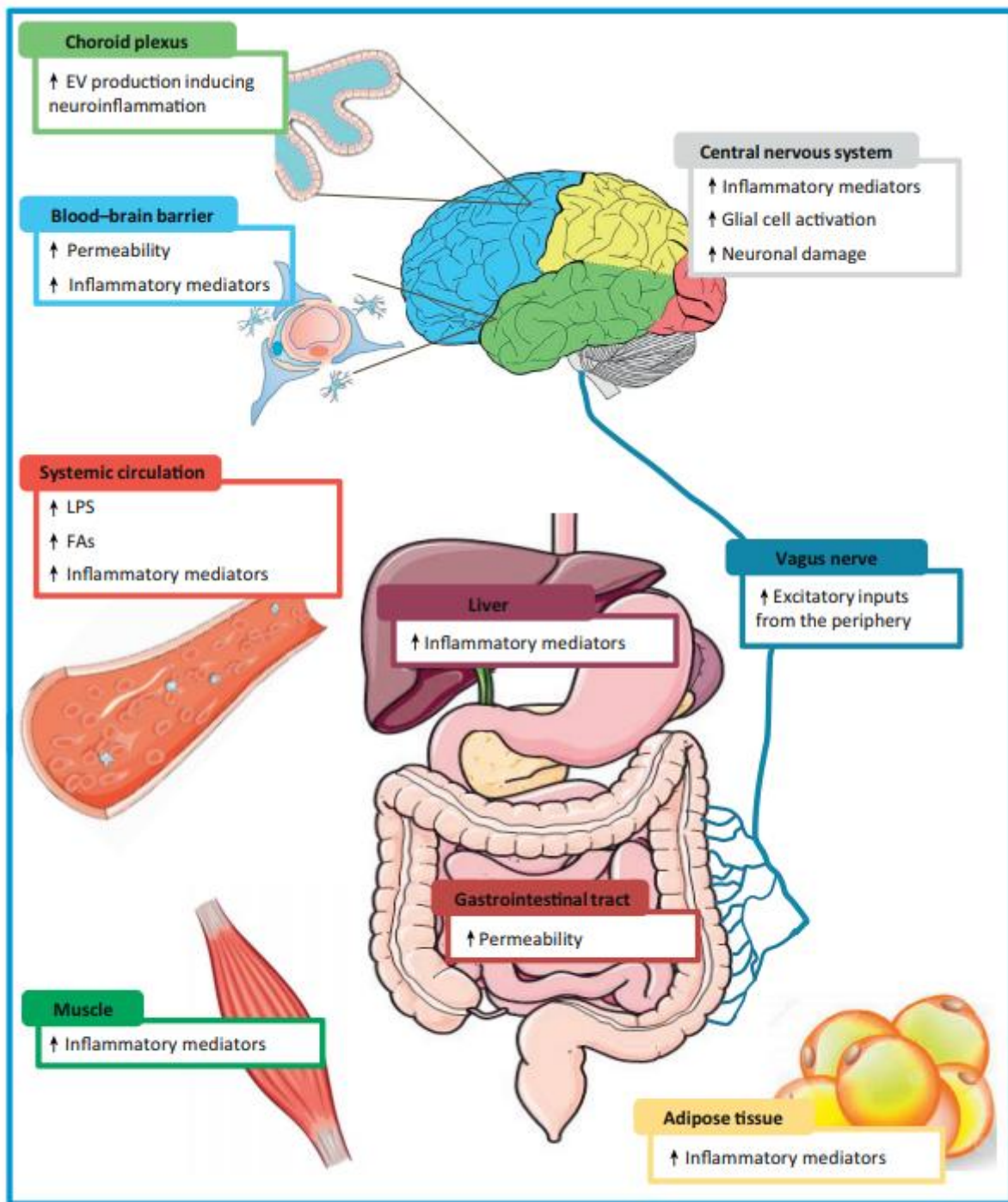
### Introduction

Outre les dysfonctionnements métaboliques observés dans les divers tissus périphériques, l'obésité provoque de nombreuses altérations au niveau du cerveau. L'inflammation du système nerveux central est plus complexe. En effet, le SNC bénéficie du privilège immun par la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette dernière fait en effet office de bouclier sélectif qui rend le passage des cellules immunes comme les lymphocytes très limité en condition physiologique (Chow and Gu., 2015). L'immunité du SNC repose essentiellement sur la microglie, cellules immunes résidentes du SNC. Il n'existe pas de définition exacte de la neuro-inflammation ; cette dernière s'associe en effet à une activation des cellules gliales (astrocytes, microglie) mais n'implique pas nécessairement une infiltration de cellules immunitaires en provenance de la périphérie. Ainsi, bien qu'elle partage des signaux communs avec l'inflammation classique (cytokines, chemokines, prostaglandines...) les processus engagés dans la neuro-inflammation ne sont pas identiques à ceux observés en périphérie (Graeber et al., 2011). Nous avons précédemment décrit que l'obésité est caractérisée par une inflammation chronique de bas grade affectant l'ensemble de l'organisme, dont le cerveau (**figure 8**). En effet, au cours de l'obésité, la perméabilité de la BHE est altérée et peut exposer le SNC à l'excès nutritif et aux signaux pro-inflammatoires provenant de la périphérie. Nerurkar et ses

collaborateurs ont évalué la perméabilité de la BHE en utilisant un marqueur au bleu Evans ; ils démontrent ainsi que, chez des souris nourries au régime HFD pendant 16 semaines, le passage du marqueur est fortement augmenté, témoignant de l'augmentation de la perméabilité de la BHE (Nerurkar et al., 2011).

## **Neuro inflammation du SNC et conséquences fonctionnelles**

Au cours de l'obésité, l'augmentation des niveaux de facteurs pro-inflammatoires et celle des adipokines (adiponectine, leptine, résistine) favorisent la neuro- inflammation dans de nombreuses structures du SNC. En effet, de récentes études mettent en évidence la présence de la neuro-inflammation dans l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex et le cervelet au cours de l'obésité (De Souza et al., 2005 ; Lu et al., 2011 ; Beilharz et al., 2016 ; Guillemot-Legris, 2016 ; Tapia-Gonzalez, 2011). Pour exemple, les études montrent que 16 semaines de régime HFD augmentent l'expression du récepteur TLR4 dans l'hippocampe ainsi qu'une activation de l'inflammation médiée par la voie IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B (Dutheil et al., 2016, Lu et al., 2011). Cette dernière provoque une augmentation de l'expression des principales cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) (Dutheil et al., 2016 ; Kang et al., 2016).



Trends in Neurosciences

**Figure 8 : L'obésité provoque une inflammation généralisée à tout l'organisme, dont le système nerveux central**

*Guillemot-Legris et Muccioli, 2017*

De façon intéressante, un nombre important d'études ont établi le lien entre obésité, diabète de type 2, et fonctionnement et homéostasie du cerveau (Arnoldussen et al., 2014 ; Letra et al., 2014 ; Lee, 2011 ; Zhang and Tian., 2014 ; Nguyen et al., 2014). En effet, les

premières études à ce sujet ont permis de démontrer que le surpoids et l'obésité sont associés à une diminution du volume ou à des altérations morphologiques cérébrales (Bruce-Keller et al., 2009 ; Taki et al., 2008 ; Ward et al., 2005). De même, certaines études ont établi le lien entre obésité abdominale et modification du volume de l'hippocampe (DeBette et al., 2010 ; Gustafson et al., 2004). Plus récemment, il a fortement été suggéré que l'obésité peut causer des altérations de la cognition et de la mémoire à court terme (Nguyen et al., 2014 ; Cournot et al., 2006 ; Lokken et al., 2009). De même, la consommation d'un régime hyper-lipidique même à court terme chez le rongeur provoque une altération des fonctions cognitives ainsi qu'une diminution de la mémoire dans l'apprentissage et l'exécution de tâches (McNeilly et al., 2011 ; Murray et al., 2009), un phénotype qui rappelle fortement celui observé dans le cadre de maladies neurodégénératives. Or, il est aujourd'hui clairement démontré que la neuro-inflammation est une des caractéristiques de la plupart des pathologies neurodégénératives. En ce sens, de nombreuses études ont établi le lien entre neuro-inflammation associée à l'obésité et dégénérescence neuronale (Thaler et al., 2012 ; Li et al., 2012 ; McNay et al., 2012 ; Pierce and Xu, 2010) voire même maladies neurodégénératives (Lees et al., 2009 ; Beydoun et al., 2008)

Ainsi, au cours de l'obésité, l'excès nutritif auquel est exposé le SNC favorise l'installation de la neuro-inflammation et expose fortement les neurones à la dégénérescence. L'hypothalamus se place en tête des structures cérébrales affectées par la neuro-inflammation associée à l'obésité. Il faut rappeler que l'hypothalamus est le centre régulateur de l'homéostasie énergétique, ainsi, toute perturbation de son intégrité altère le contrôle de l'homéostasie énergétique. Le chapitre suivant sera dédié à l'hypothalamus et à son inflammation au cours de l'obésité, structure sur laquelle je me suis focalisée au cours de ma thèse.

# III. Neuro-inflammation hypothalamique associée à l'obésité: conséquences sur l'homéostasie énergétique

---

## Rappel : la régulation de l'homéostasie énergétique par l'hypothalamus

L'homéostasie énergétique se caractérise par un état d'équilibre entre la prise alimentaire et les dépenses énergétiques nécessaire pour la stabilité et le maintien du poids corporel. Cet équilibre est dépendant des différents signaux périphériques qui renseignent sur le statut énergétique de l'organisme et qui engendrent différentes voies de signalisation au niveau du système nerveux central (SNC), en particulier dans l'hypothalamus et le tronc cérébral. Afin de maintenir un état d'équilibre, le SNC est en permanence informé des fluctuations du statut énergétique *via*, d'une part, les tissus périphériques qui lui transmettent des afférences nerveuses et, d'autre part, *via* les signaux métaboliques et hormonaux circulants. Ces signaux sont intégrés au niveau hypothalamique et permettent d'adapter la réponse physiologique qui se traduira soit par une augmentation ou baisse de la prise alimentaire maintenant ainsi la balance énergétique. Cette réponse est modulée par des facteurs psychologiques, sociaux et environnementaux.

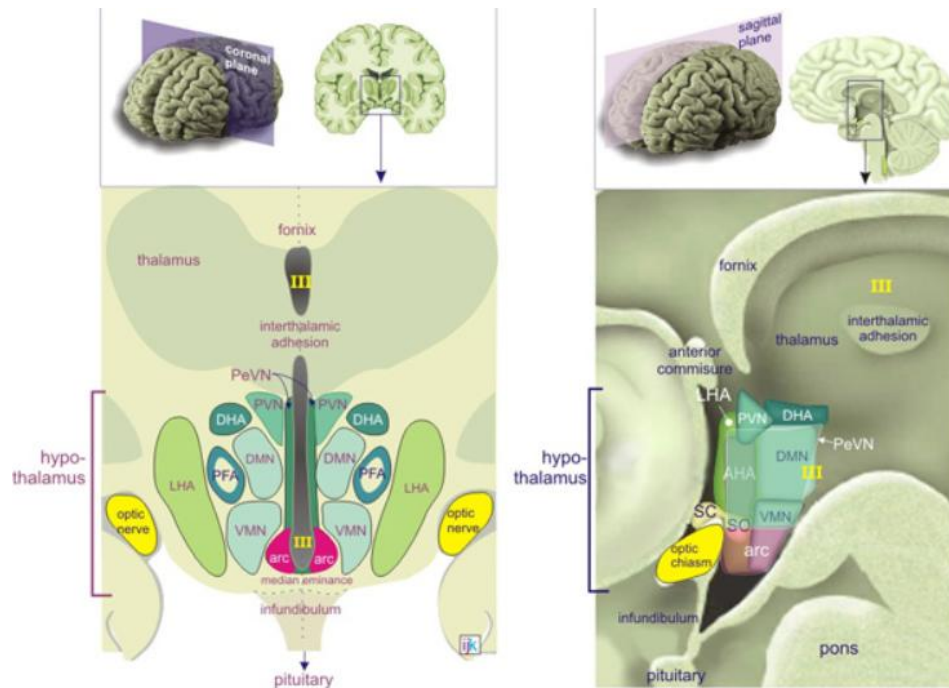
## L'hypothalamus : définition et rôle dans l'homéostasie énergétique

L'hypothalamus est une structure du SNC appartenant au diencephale. Situé à la base du cerveau sous le thalamus et au-dessus du tronc cérébral, il est divisé par le troisième ventricule (Baroncini et al., 2012). L'une des fonctions les plus importantes de l'hypothalamus est d'établir la liaison entre le système nerveux et le système endocrinien

et ceci via l'hypophyse à laquelle il est relié par la tige pituitaire. L'hypothalamus est une glande abritant plusieurs noyaux hypothalamiques, eux-mêmes constitués d'un ensemble de neurones exprimant des récepteurs sensibles aux variations hormonales (et des neuropeptides) assurant une réponse adaptative de l'hypothalamus ce qui est crucial pour le maintien de la balance énergétique (**figure 9**).

Menées dès le début des années 1940, des expériences ont en effet permis de mettre en évidence le rôle de l'hypothalamus dans le contrôle de la régulation de la prise alimentaire. Ces expériences, réalisées chez le rongeur, le chat ainsi que le singe ont montré que des stimulations électriques ou des lésions ciblant des régions spécifiques de l'hypothalamus avaient des répercussions importantes sur la prise alimentaire et le poids corporel des animaux (Brobeck et al, 1943). Ces expériences ont contribué à l'identification d'un « centre de la faim » situé dans l'aire hypothalamique latérale, dont la lésion est associée à une perte de poids ; et d'un « centre de la satiété » situé dans l'hypothalamus ventromédian dont la lésion provoque une hyperphagie conduisant à l'obésité (Anand et al., 1955 ; Anand and Brobeck 1951). Enfin, les travaux de recherche de ces dernières années ont démontré, chez l'animal, l'existence de noyaux hypothalamiques complexes, abritant des populations neuronales qui expriment des neuromédiateurs spécifiques impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et les dépenses énergétiques (Schwartz et al., 2000; Williams et al., 2001).





**Figure 9 : Positions des différents noyaux hypothalamiques en vue coronale (à gauche) et sagittale (à droite) de cerveau humain**

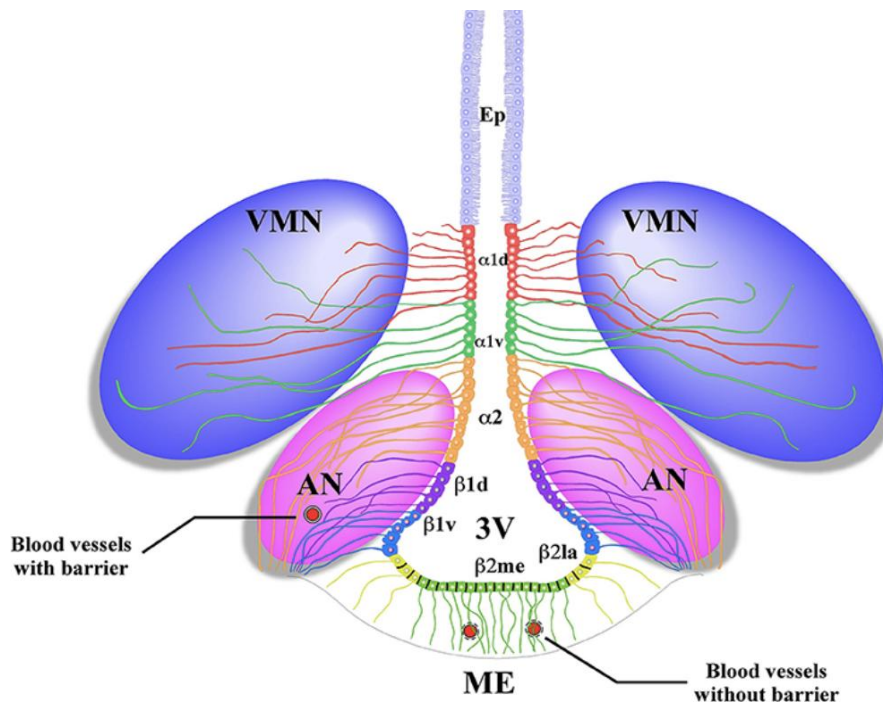
*L'hypothalamus se compose de noyaux répartis symétriquement de part et d'autre du troisième ventricule (3V). Les noyaux hypothalamiques sont des amas de neurones impliqués dans des fonctions physiologiques. Cinq de ces noyaux sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique, parmi eux : le noyau arqué (ARC), situé à la base du troisième ventricule et accolé à l'éminence médiane ; le noyau ventromédian (VMN) ; le noyau dorsomédian (DMN) ; l'aire hypothalamique latérale (LHA) et le noyau paraventriculaire (PVN). ARC : arcuate nucleus ; DHA : dorsal hypothalamic area ; DMN : dorsomedial nucleus ; LHA : lateral hypothalamic area ; PeVN : periventricular nucleus ; PFA : perifornicular area ; PVN : paraventricular nucleus ; VMN : ventromedial nucleus ; SO : supraoptic nucleus ; SC : suprachiasmatic nucleus ; III : third ventricle. (Morton et al.,2006)*

### ***Le noyau arqué (ARC) et l'éminence médiane (ME)***

Situé dans l'hypothalamus médio-basal (MBH) à la base du troisième ventricule (3V), le noyau arqué (ARC) s'étend symétriquement de part et d'autre du troisième ventricule. Il est adjacent à l'éminence médiane dont l'endothélium vasculaire a la particularité d'être

fenêtré. L'éminence médiane (ME) fait en effet partie des organes circumventriculaires. Afin de maintenir la balance énergétique, une communication à double sens entre le cerveau et la périphérie est nécessaire, cela est possible par l'existence de ces organes circumventriculaires (OCV) (Herde et al. 2011, Langlet et al., 2013, Prager-Khoutorsky et al. 2016, Djogo et al., 2016). Dans les OCV, le type cellulaire impliqué dans la barrière hémato-encéphalique est représenté par les tanycytes, et non les cellules endothéliales. En effet, dans l'EM, ce sont les tanycytes qui arborent des jonctions serrées alors que les cellules endothéliales en sont dépourvues. Au niveau de l'éminence médiane, les tanycytes s'étendent de la surface épendymale du troisième ventricule à un plexus vasculaire fenêtré et perméable aux facteurs circulants. Les tanycytes tapissent la paroi du troisième ventricule et sont impliqués dans la régulation du métabolisme, ils sont en effet capables de régir le passage de neuropeptides hypothalamiques dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Parkash et al. 2015). Ils forment ainsi une sorte de « barrière tanycytaire » puisqu'ils se placent à l'interface du liquide céphalo rachidien et des vaisseaux fenêtrés (Balland et al. 2014) (**figure 10**).

Ainsi, en raison de cette absence de véritable barrière hématoencéphalique, le noyau arqué possède un emplacement stratégique lui permettant de relayer les informations du statut énergétique depuis la périphérie vers le système nerveux central (Kalra et al., 1999). Du fait de leur localisation au sein du noyau arqué, à proximité de l'éminence médiane, les neurones de premier ordre vont recevoir les signaux hormonaux (leptine, insuline...) et métaboliques (glucose, acide gras...) en provenance de la périphérie (Schwartz et al. 2000). Ces signaux seront intégrés vers les noyaux hypothalamiques de second ordre en vue d'adapter la prise alimentaire aux besoins énergétiques de l'organisme (Kalra et al., 1999). Le noyau arqué est majoritairement peuplé de deux types neuronaux exerçant deux fonctions antagonistes sur la balance énergétique.



**Figure 10 : Représentation schématique de la distribution des tanocytes à travers l'éminence médiane, le noyau arcué et le noyau ventromédian**

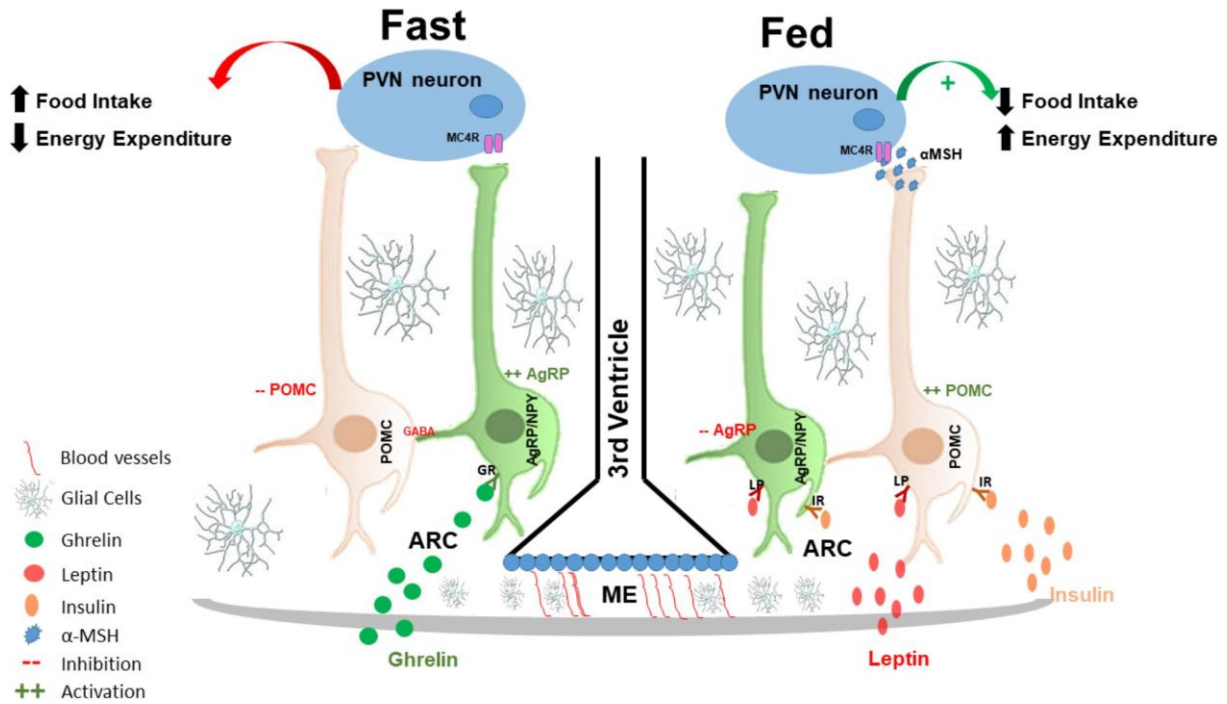
*Les tanocytes  $\beta_{1me}$  (représentés en vert) tapissent le plancher du troisième ventricule. Ils sont reliés entre eux par des jonctions serrées, formant ainsi une barrière tanocytaire séparant l'éminence médiane du liquide céphalo rachidien. Les projections de ces tanocytes sont en contact avec les vaisseaux fenêtrés de l'éminence médiane. Les autres tanocytes  $\beta$  possèdent des projections qui se déploient au sein du noyau arcué, elles sont en contact avec les neurones qui régissent l'homéostasie énergétique et les vaisseaux sanguins non fenêtrés. Les tanocytes  $\alpha$  présentent de longues projections qui se projettent dans le noyau ventro médian. AN : arcuate nucleus, ME : médiane eminence, Ep : ependymocytes, III-V : third ventricle. Elizondo-Vega et al., 2015*

Il existe, d'une part, une population neuronale dite « orexigène » exprimant le neuropeptide Y (NPY) et *Agouti-Related Peptide* (AgRP). Chez le rongeur, l'administration du NPY au niveau du troisième ventricule augmente la prise alimentaire et une hyperphagie (Geerling et al., 2013). De même, des injections journalières répétitives de NPY au sein du noyau paraventriculaire (PVN) provoquent une hyperphagie, une prise de poids ainsi qu'une augmentation significative de la masse adipeuse (Stanley et al., 1986). En outre, il a également été montré que le peptide NPY exerce une partie de ses effets anaboliques à travers la diminution de la thermogénèse dans le tissu adipeux brun (Egawa et al., 1990 ; Billington et al., 1991). Ainsi, NPY induit une augmentation de la prise

alimentaire accompagnée par une diminution des dépenses énergétiques.

D'autre part il existe, au sein du noyau arqué, une population neuronale dite anorexigène qui exprime les neuropeptides POMC (Pro-opiomélanocortine), pré-curseur protéique de  $\alpha$ -MSH (*alpha melanocyte stimulating hormone*) et CART (*cocaine-and-amphetamine-regulated transcript*) (Parker et al., 2012). L'implication de ces neurones dans la régulation négative de la prise alimentaire a été démontrée par de nombreuses études. En effet, une mutation du gène codant pour le peptide POMC conduit à l'obésité aussi bien chez l'homme que chez le rongeur (Coll et al., 2004 ; Yaswen et al., 1999 ; Challis et al., 2004). De même, il a été montré chez le rat, qu'une restriction alimentaire réduit, au niveau hypothalamique, l'expression de l'ARN messager codant pour POMC (Mizuno et al., 1998) ; alors qu'une suralimentation augmente son expression (Hagan et al., 1999).

Comme évoqué précédemment, ces neurones sont qualifiés de neurones de premier ordre et interagissent entre eux en exerçant des fonctions opposées sur la régulation de la prise alimentaire (Csiffary et al., 1990). Cette fonction antagoniste résulte principalement de l'inhibition GABAergique induite par les neurones AgRP sur les neurones POMC (Horvath et al 1992, Broberger et Hokfelt 2001, Cowlet et al 2001, Williams et al 2001, Pinto et al 2004). De même, il a été montré que l'AgRP est un antagoniste naturel du récepteur MC4-R (*melanocortin 4 receptor*) ; ce dernier, présent majoritairement dans les noyaux hypothalamiques de second ordre, provoque une augmentation de la prise alimentaire suite à la liaison de  $\alpha$ -MSH. (Balthasar et al., 2005). (**figure 11**)



### Figure 11 : Contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique

Deux populations neuronales antagonistes dans l'ARC régissent le contrôle de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques. Ces neurones sont régulés par les hormones circulantes, notamment la leptine, l'insuline. Ces dernières inhibent les neurones orexigènes AgRP/NPY et stimulent les neurones anorexigènes POMC/CART. Les neurones de l'ARC projettent au niveau du PVN et de la LHA. Les neurones du PVN expriment la forme 1 du récepteur au NPY (Y1R) et la forme 4 du récepteur à la mélanocortine (MC4R). Dans une condition où la balance énergétique doit être négative, le PVN synthétise des neuropeptides anorexigènes de second ordre comme la CRH (corticotropin releasing hormone) ou la TRH (thyrotropin releasing hormone). En condition de pénurie énergétique, la LHA quant à elle va exprimer des neuropeptides orexigènes : orexines A et B et MCH (melanin concentrating hormone). POMC, proopiomelanocortin ; CART, cocaine and amphetamine-related transcript; AgRP, agouti related peptide ; NPY, neuropeptide Y ; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid. Gaspar and Velloso, 2018.

Ainsi, les études des 20 dernières années ont permis la compréhension du contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique. Toute perturbation de ce système de contrôle, notamment l'altération des fonctions hypothalamiques qui se traduit par une mauvaise perception des signaux périphériques, entraîne des désordres métaboliques majeurs qui vont favoriser le développement de l'obésité. Cette dernière se caractérise par un état inflammatoire aux niveaux central et périphérique. En outre, l'obésité est généralement associée à l'insulino-résistance, principal facteur de risque du diabète de type 2 (DT2).

# Neuro inflammation hypothalamique : *driver* de l'obésité et de ses conséquences ?

## Découverte de l'inflammation hypothalamique

L'inflammation hypothalamique associée à l'obésité a été initialement décrite en 2005. En effet, le groupe de Lício Velloso a montré, chez le rat, que la consommation d'un régime alimentaire riche en lipides pendant 16 semaines provoque une réponse inflammatoire hypothalamique associée à une augmentation importante de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-6, ainsi qu'une perte de l'effet anorexigène de l'insuline (De Souza et al., 2005). Suite à cette étude pionnière, l'inflammation hypothalamique associée au régime hyper-lipidique a été reproduite et observée chez la souris puis reconfirmée chez le rat (Thaler et al., 2012 ; Holland et al., 2011 ; Zhang et al., 2008).

Plus récemment, il a été montré que l'inflammation hypothalamique se distingue de l'inflammation périphérique par sa cinétique d'apparition. Il a en effet été montré qu'un unique jour de consommation de régime HFD chez les rongeurs provoque une augmentation hypothalamique de l'expression de IL-6 et TNF- $\alpha$  ainsi qu'une activation des cellules microgliales hypothalamiques (Waize et al., 2015). De même, la consommation d'un régime HFD pendant 3 jours chez le rongeur augmente la neuroinflammation et la gliose réactionnelle et provoque des lésions neuronales (Thaler et al., 2012). De façon intéressante, cette neuroinflammation apparaît bien avant l'inflammation périphérique et l'obésité (Waize et al., 2015 ; Thaler et al., 2012). Cette réponse inflammatoire aiguë et précoce persiste pendant les premiers jours de régime HFD puis se dissipe et ne devient chronique que si le régime HFD est maintenu pendant une longue durée (Thaler et al., 2012). De même, une administration centrale et aiguë de glucose (Valdearcos et al., 2014) ou de lipides (Martinez de Morentin et al., 2010 ; Benoit et al., 2009) provoquent une inflammation hypothalamique au bout de quelques heures. Parallèlement, il a été montré que 3 jours de régime HFD suffisent à significativement réduire la sensibilité hypothalamique à l'insuline (Clegg et al., 2011). Ces effets précèdent largement l'obésité et l'épisode inflammatoire dans les tissus périphériques (Clegg et al., 2011).

L'ensemble de ces données suggèrent une implication causale de l'inflammation hypothalamique dans les désordres métaboliques menant à l'obésité et au syndrome

métabolique (Cai et Liu, 2011 ; Valdearcos et al., 2015 ; Thaler et al., 2013).

## Voies de signalisation impliquées dans l'inflammation hypothalamique et l'altération de la balance énergétique

### Voie TLR4 : rôle de IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B et JNK

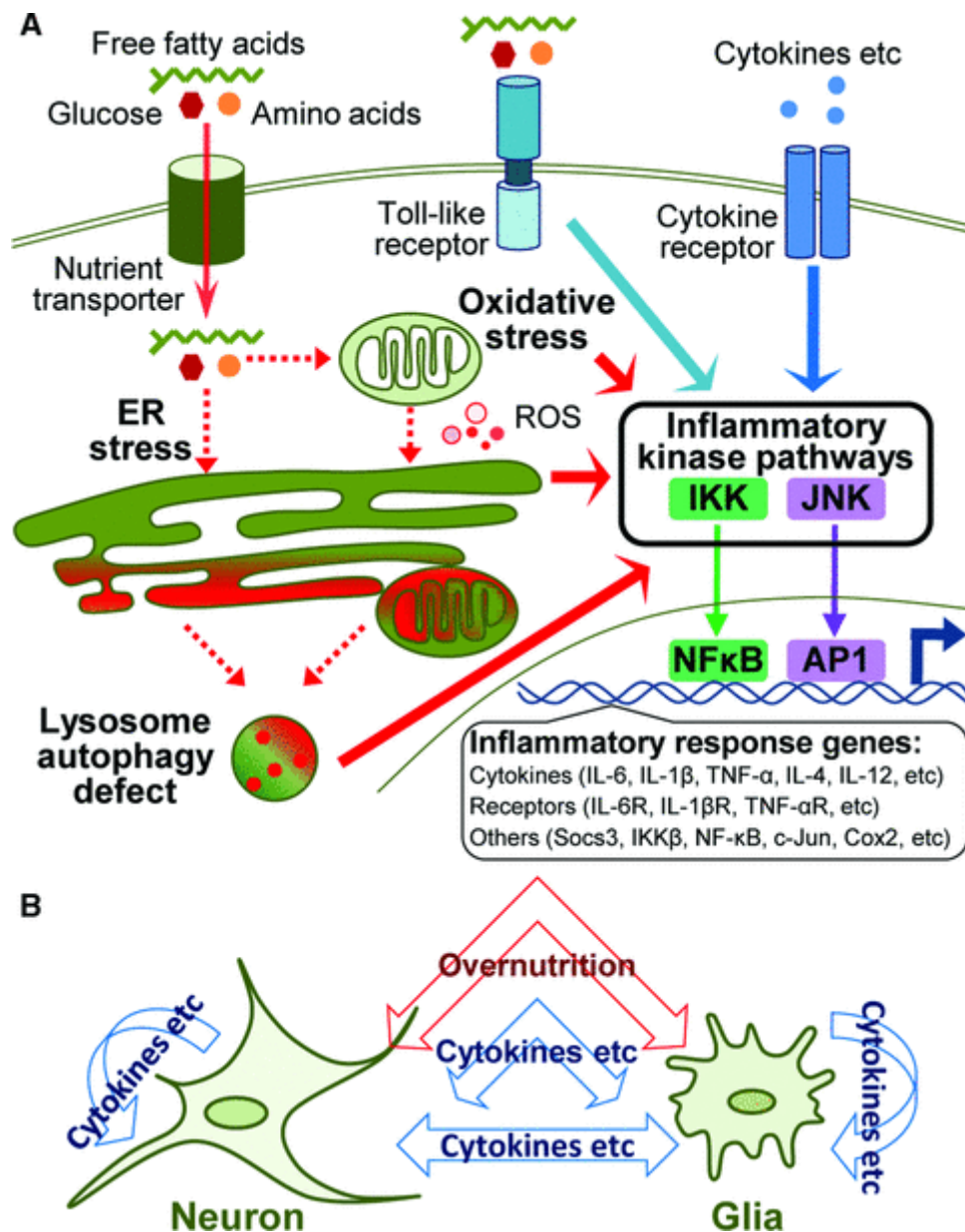
La présence de capillaires fenêtrés et de tanycytes au sein de l'éminence médiane confère à l'hypothalamus un emplacement stratégique qui le rend rapidement sensible aux variations hormonales et aux nutriments circulants (Balland et al., 2014). Les nutriments représentent un indicateur énergétique nécessaire pour la régulation de l'homéostasie énergétique par le SNC, néanmoins, il semblerait que leur présence – en excès – soit fortement impliquée dans le déclenchement de l'inflammation de l'hypothalamus médio-basal (MBH). En effet, il a été montré chez la souris qu'une administration aigüe de glucose dans le troisième ventricule provoque une augmentation de l'expression du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B au niveau hypothalamique et reste inchangée au niveau périphérique (Zhang et al., 2008). De même, une étude menée chez le rat montre que certains acides gras saturés s'accumulent dans l'hypothalamus en réponse à un régime hyper-lipidique provoquant une activation des voies de l'inflammation, en particulier la voie TLR4, et favorisant l'installation des résistances à l'insuline et la leptine (Posey et al., 2009). Il a été aussi montré que des injections ICV de l'acide stéarique, un acide gras saturé, augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL6 et active JNK et NF- $\kappa$ B dans l'hypothalamus (Calegari et al., 2011). Une autre étude a montré que l'administration d'acides gras saturés par gavage chez la souris induit rapidement une inflammation hypothalamique, similaire à celle observée au cours de la consommation d'un régime hyper-lipidique (Valdearcos et al., 2014). Or, il a été montré que les acides gras saturés sont capables d'activer TLR4 au niveau hypothalamique et de stimuler les voies de signalisation pro-inflammatoires qui lui sont associées (Milanski et al., 2009) (**figure 12**)

En effet, l'administration centrale d'acides gras saturés (AGS) active TLR4 ce qui aboutit à l'activation de NF- $\kappa$ B dans l'hypothalamus et provoque une altération de la voie centrale de la leptine ainsi que de celle de l'insuline (Zhang et al., 2008 ; Posey et al., 2009) (**figure 12**). De plus, le blocage de la signalisation de TLR4, par l'inactivation de son adaptateur MyD88 dans le cerveau de souris, contrecarre l'inflammation hypothalamique provoquée

par les AGS. Il en résulte une atténuation de la résistance centrale à la leptine, une amélioration de la sensibilité générale à l'insuline et une limitation de la prise de poids (Milanski et al., 2009 ; Kleinridders et al., 2009). Ces résultats mettent en évidence le rôle de TLR4 et de ses voies de signalisation dans la médiation de l'inflammation hypothalamique associée au régime HFD et l'altération de l'homéostasie énergétique.

En effet, il a été montré que l'obésité s'accompagne d'une augmentation de l'activité hypothalamique de IKK $\beta$  qui active à son tour le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Zhang et al., 2008). Ce dernier reste normalement inactif dans le cytoplasme, inhibé par la protéine I $\kappa$ B $\alpha$ . En condition inflammatoire, IKK $\beta$  est activée et phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$  ce qui conduit à sa dégradation et à la libération du NF- $\kappa$ B qui sera transporté dans le noyau où il induit la transcription d'une myriade de gènes pro-inflammatoires au niveau hypothalamique (Posey et al., 2009 ; Milanski et al., 2009 ; Zhang et al., 2008). En effet, un régime HFD provoque une augmentation des cytokines pro-inflammatoires au niveau hypothalamique (De Souza et al., 2005 ; Thaler et al., 2012). Or, les données de la littérature démontrent que les cytokines pro-inflammatoires ont un effet délétère sur la balance énergétique. Il a été montré que l'administration par ICV de TNF- $\alpha$  à faible dose augmente la prise alimentaire et diminue les dépenses énergétiques (Arruda et al., 2011), ces effets rappellent ceux observés au cours de l'obésité.





**Figure 12 : Cascades de signalisation de l'inflammation métabolique dans l'hypothalamus**

Au cours de l'obésité, l'excès de nutriments comme les acides gras saturés provoquent une inflammation via le récepteur TLR4. Cet environnement est propice au stress du RE et au stress oxydatif. Il en résulte une activation exacerbée des voies IKK/NF-κB et JNK qui vont promouvoir d'autant plus l'inflammation et vont affecter les cellules gliales et les neurones. Cai et Liu, 2012

En ce sens, les études montrent que le couple IKKβ/NF-κB joue un rôle majeur dans l'induction de l'inflammation hypothalamique qui conduit à l'altération de la balance énergétique au cours du régime HFD (Kleinridders et al., 2009 ; Zhang et al., 2008). L'activation pharmacologique de la voie IKKβ/NF-κB dans le cerveau augmente la prise

alimentaire et le poids corporel, et altère la signalisation hypothalamique de l'insuline et la leptine (Zhang et al., 2008). Au contraire, cette même étude montre que l'inhibition du NF- $\kappa$ B maintient la sensibilité à l'insuline et à la leptine et protège contre l'obésité (Zhang et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré que la neuro-inflammation hypothalamique augmente les niveaux d'expression de PTP1B et de SOCS-3 dans l'hypothalamus, deux principaux régulateurs négatifs de la voie de signalisation de l'insuline et de la leptine (Zabolotony et al., 2002 ; Ito et al., 2012, Zhang et al., 2008). Parallèlement à l'activation de la voie IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B, la signalisation dépendante de TLR4 aboutit également à l'activation de la voie des MAPK, JNK et p38. La suralimentation active aussi la voie de signalisation impliquant JNK au niveau hypothalamique (**figure 12**) (Sabio et al., 2010, Belgardt et al., 2010 ; Unger et al., 2010). De plus l'inactivation du gène JNK1 au niveau neuronal diminue fortement l'obésité induite par le régime HFD et protège contre l'intolérance au glucose (Sabio et al., 2010). De même, Unger et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition centrale de JNK1 améliore la sensibilité à l'insuline (Unger et al., 2010). En effet, il a été montré que JNK peut inhiber le signal insulinique à travers au moins deux mécanismes : d'une part *via* l'induction de SOCS-3 et d'autre part *via* la phosphorylation sur résidus sérine des IRS, ces phosphorylations en sérine sont inhibitrices de la voie de signalisation de l'insuline (Velloso et Schwartz, 2011 ; Gregor et al., 2011). L'activation constitutive de JNK au sein des neurones hypothalamiques AgRP chez la souris provoque une hyperphagie qui aboutit à une prise de poids et à une augmentation de l'adiposité (Tsaousidou et al., 2014).

Ces résultats mettent en évidence les effets délétères de l'inflammation hypothalamique sur la balance énergétique contribuant aux désordres métaboliques. D'autre part, de nombreux mécanismes contribuent fortement à l'exacerbation de l'inflammation hypothalamique au cours du régime HFD et de l'obésité. Parmi eux, l'altération de l'autophagie et le stress du réticulum endoplasmique ont été le sujet de nombreuses recherches.

### *Altération de l'autophagie et inflammation*

Il a été montré que l'obésité affecte négativement l'autophagie au niveau hypothalamique (Meng and Cai, 2011) (**figure 12**). L'autophagie joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, il s'agit d'un processus au cours duquel une cellule peut éliminer ses propres organelles endommagées afin de maintenir une homéostasie interne et une

intégrité structurelle (Yorimitsu et al., 2006). Stimulée en cas de pénurie énergétique, l'importance de l'autophagie au niveau hypothalamique a été révélée par une étude qui montre que la délétion du gène codant ATG7, un médiateur clé de l'autophagie, provoque une augmentation de la prise alimentaire et une diminution des dépenses énergétiques chez la souris (Meng and Cai, 2011). Ces souris présentent aussi une activation de la voie IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B au niveau hypothalamique, suggérant qu'un défaut dans le processus d'autophagie peut engendrer des voies de l'inflammation. De façon intéressante, dans ce même modèle murin dépourvu de ATG7, l'inhibition de IKK $\beta$  induit améliore ces dysfonctionnements métaboliques. Ces observations mettent en évidence l'association entre, obésité, inhibition de l'autophagie et inflammation, suggérant que l'altération de l'autophagie associée à l'obésité serait impliquée dans l'inflammation hypothalamique. Toutefois, le(s) médiateur(s) impliqué(s) dans l'inhibition de l'autophagie au cours de l'obésité reste(nt) à déterminer.

### *Stress du réticulum endoplasmique*

Le réticulum endoplasmique est primordial pour la synthèse et la maturation des protéines (Gething and Sambrook, 1992). Lorsque l'environnement cellulaire est inapproprié (par exemple : lipotoxicité, glucotoxicité), des protéines mal repliées s'accumulent au sein du RE et aboutit à un stress du réticulum endoplasmique appelé également réponse UPR (Unfolded Protein Response) (Schröder et al., 2005). Un nombre croissant d'études suggèrent que le stress du RE contribue à l'inflammation hypothalamique associée au régime HFD et à l'obésité. En effet, il a été montré que l'excès nutritif peut induire l'activation du stress du RE au sein de l'hypothalamus (Zhang et al., 2008 ; Milanski et al., 2009). Le stress du RE implique l'activation de la voie IKK- $\beta$ /NF- $\kappa$ B qui aboutit à l'activation du facteur pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B (Hu et al., 2006). Réciproquement, les études montrent que l'activation hypothalamique de la voie IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B favorise le stress du RE au niveau neuronal (Zhang et al., 2008, Purkayastha et al., 2011). Par ailleurs, l'induction pharmacologique ou génétique du stress du RE dans l'hypothalamus provoque une inflammation et favorise les résistances centrales à la leptine et à l'insuline (Won et al., 2009). Il en résulte divers désordres métaboliques dont l'hyperphagie et l'intolérance au glucose (Purkayastha et al., 2011, Ozcan et al., 2009, Won et al., 2009). Ainsi, un cercle vicieux s'installe où l'inflammation hypothalamique associée au régime HFD provoque un stress du RE qui va lui-même alimenter l'inflammation et altérer l'homéostasie énergétique. Par ailleurs, il a été montré qu'un stress du RE chronique provoque une augmentation

intracellulaire du niveau de ROS (*reactive oxygen species*), ces derniers vont promouvoir le stress oxydatif, exacerber le stress du RE et maintenir l'inflammation (Cullinan et al., 2006) (**figure 12**).

## Contribution des différents types cellulaires à l'inflammation de l'hypothalamus

### *Microglie et astrocytes : la gliose réactionnelle associée au régime HFD*

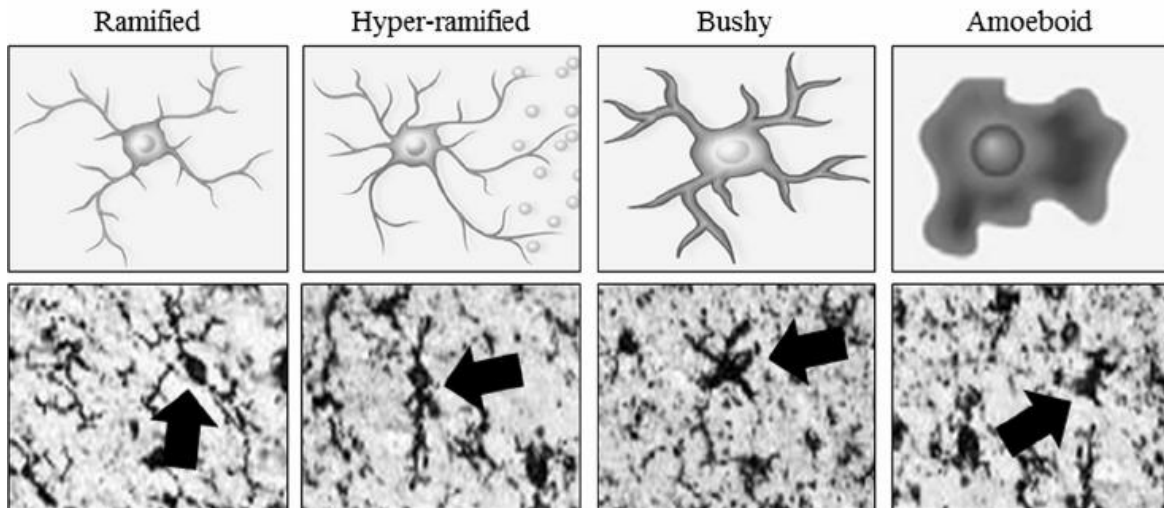
#### Rappel sur la microglie et les astrocytes

Les cellules microgliales jouent un rôle prépondérant dans la surveillance du SNC. Ce sont les macrophages résidents du SNC et, de ce fait, les acteurs clés de l'immunité innée cérébrale ; notamment grâce aux récepteurs qu'elles expriment à leur surface, les TLR. Une des principales caractéristiques des cellules microgliales est leur activation très rapide en réponse à toute perturbation touchant le SNC. A l'état « activé », les cellules microgliales acquièrent des propriétés phagocytaires et vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires, elles peuvent ainsi éliminer des bactéries, des débris cellulaires ou des cellules endommagées. Outre son rôle dans l'immunité innée cérébrale, il a été montré que la microglie maintient l'architecture cellulaire et l'intégrité des réseaux neuronaux (Wake et al., 2013). Elle est en effet impliquée dans le remodelage des circuits neuronaux (Schafer et al., 2012) et dans la neurogénèse (Gemma et al., 2013). La microglie se caractérise par l'expression de nombreuses molécules dont Iba1 (Ito et al., 1998), CD68, CD11b, CD45, EMR1 et ICAM-1 (Werner et al., 1998). L'expression de la plupart de ces marqueurs augmente au cours de l'activation de la microglie (Tanaka et al., 2001).

De nombreuses molécules et conditions peuvent activer la microglie, elles ont en commun de représenter une menace pour l'intégrité structurelle et fonctionnelle du SNC. Les cellules de la microglie expriment de très nombreux récepteurs à leur surface, elles sont de ce fait capables de reconnaître et réagir à divers signaux. Au cours de son activation, la microglie passe de sa forme ramifiée dite « au repos » à sa forme active, observée dans la majorité des pathologies cérébrales. Morphologiquement, la microglie activée se caractérise par un épaississement des prolongements, une diminution de leur nombre, un rétrécissement des ramifications ainsi qu'une augmentation du volume du corps cellulaire (Kreutzberg 1996). L'ensemble des paramètres peut être quantifié et permet ainsi de distinguer divers phénotypes microgliaux s'associant à des stades d'activations différents :

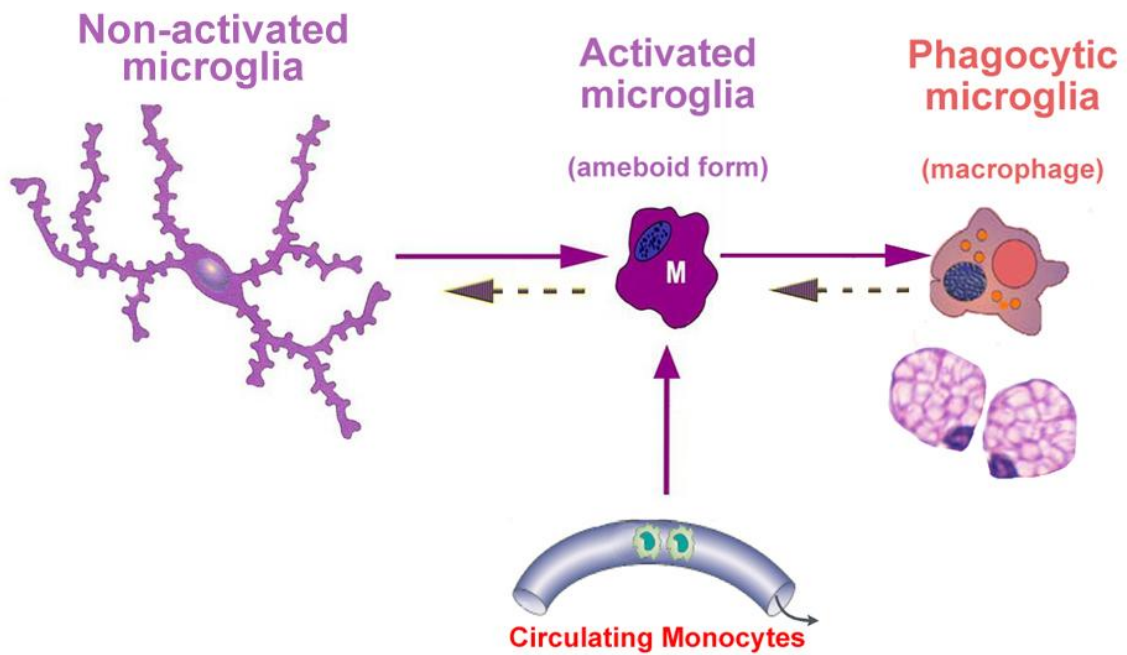
microglie ramifiée, amorcée, réactive et amiboïde (Kreutzberg, 1996 ; Soltys 2001) (**figure 13**). Toutefois, en dépit du fait que ces stades d'activation sont controversés dans certaines études (Davis 1994 ; Streit et al., 1999), il existe un consensus pour affirmer que la microglie activée réoriente ses processus au niveau du site de lésion, perd ensuite ses ramifications afin d'adopter une forme amiboïde et développe des filopodes qui lui permettent d'acquérir une plus grande mobilité et d'entamer la phagocytose des pathogènes et débris cellulaire (Walker et al. 2014) (**figure 14**). En outre, en condition pathologique, la microglie est également recrutée *in situ*, au sein du site lésé, ce recrutement est médié par des mécanismes de migration, de prolifération et s'accompagne parfois de l'invasion de monocytes circulants (Gomez-Nicola and Perr, 2015). L'ensemble de ces mécanismes déployés par la microglie en condition pathologique aboutit à la microgliose. Le but étant de corriger et maintenir l'homéostasie du SNC, néanmoins lorsque la lésion est chronique, la microgliose devient excessive et peut aboutir à diverses complications.

### Microglial States in the Human Brain



**Figure 13 : States d'activation de la microglie dans le cerveau humain.**

*Crews FT et Vetreno RP, 2016*



**Figure 14 : La microglie activée possède des propriétés de phagocytose**

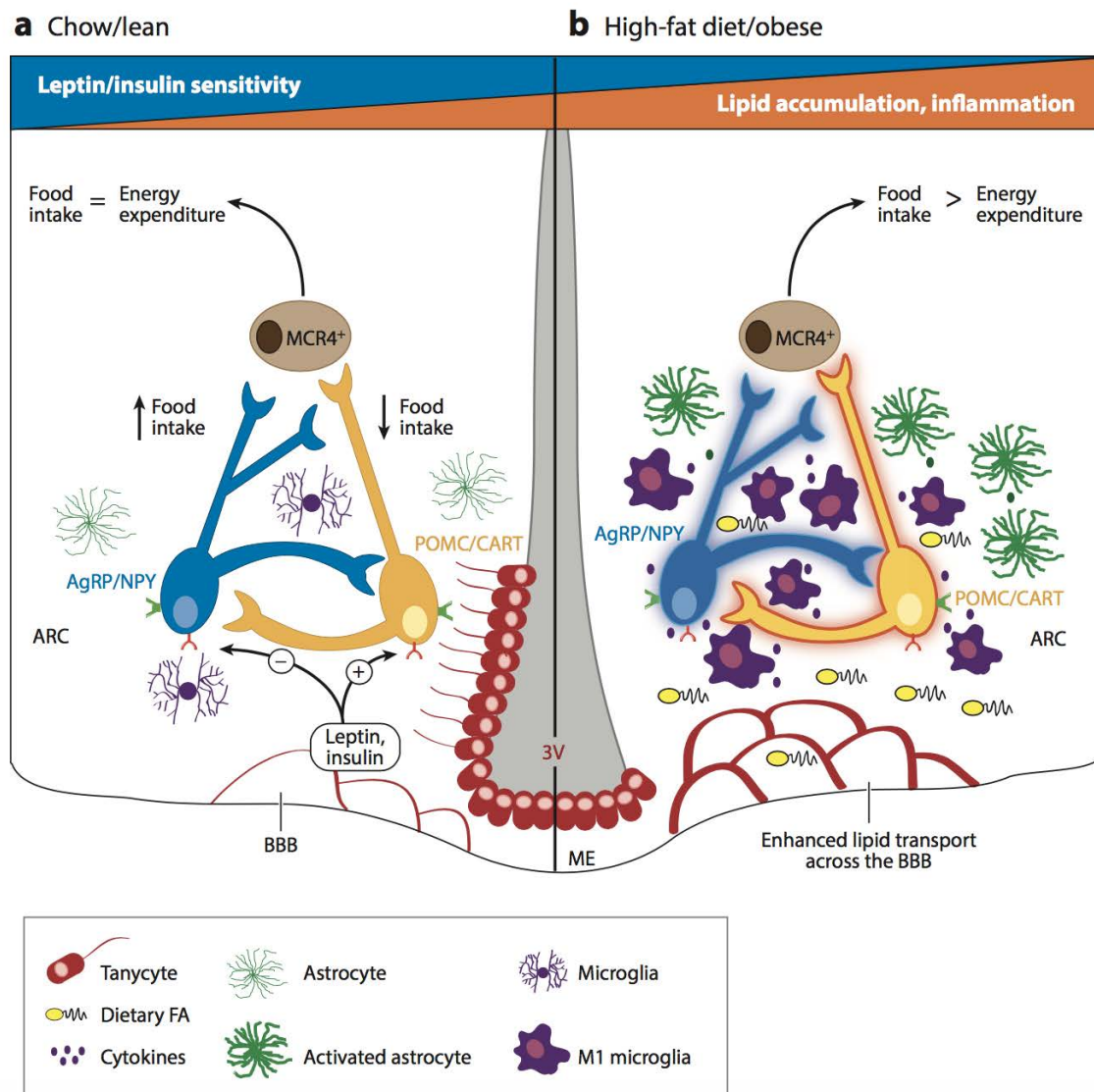
adaptée de Fujita, S et Kitamura, T, 1976

Les astrocytes sont des cellules gliales du système nerveux central assurant diverses fonctions, parmi elles, la protection des neurones et leur apport en nutriments. Les astrocytes constituent une population cellulaire hétérogène, exprimant différents récepteurs en fonction de leur localisation anatomique (Oberheim et al., 2006). De même, les astrocytes jouent un rôle clé dans la structure et le maintien de la barrière hémato-encéphalique. Cette dernière est formée de cellules endothéliales liées par des jonctions serrées, d'une membrane basale et des pieds astrocytaires. Il a été montré que les astrocytes participent fortement aux propriétés de perméabilité de la BHE (Janzer et Raff 1987, Ballabh 2004).

Les astrocytes s'activent en réponse à des stimuli nocifs ou pathogènes de nature diverse comme l'ischémie, les infections virales, les maladies démyélinisantes ou neurodégénératives (Kalman 2004). En effet, au cours de ces pathologies, les astrocytes deviennent réactifs : ils s'hypertrophient, leurs prolongements s'élargissent et ils surexpriment le filament intermédiaire GFAP (Kalman, 2004). Cette réponse est nommée astrogliose, elle se met en place très rapidement. Par exemple, en cas d'accident ischémique (Mucke et al 1991). L'astrogliose se caractérise également par une augmentation du nombre d'astrocytes au sein du site lésé, toutefois, la prolifération des astrocytes est le plus souvent très limitée (Kalman, 2004). Il semblerait donc que l'augmentation du nombre d'astrocytes visibles est due à une plus grande immunoréactivité pour la GFAP. En condition pathologique, l'astrogliose se met en place pour restaurer, protéger et limiter les dommages tissulaires, par ailleurs, une astrogliose persistante peut être délétère pour les neurones (Pekny 2016).

#### Gliose réactionnelle hypothalamique en réponse au régime HFD et à l'obésité

Il est maintenant clairement démontré que l'obésité est associée à une gliose réactionnelle hypothalamique aussi bien dans des modèles animaux que chez l'homme (**figure 15**). En effet, une étude qui repose sur la technique d'IRM (imagerie par résonance magnétique) a montré la présence de gliose réactionnelle dans l'hypothalamus de sujets obèses (Thaler et al., 2012). Ces données ont de même été confirmées par une approche histologique sur des cerveaux humains d'individus obèses *post mortem* qui montrent une activation exacerbée de la microglie en comparaison aux sujets non atteints d'obésité (Baufeld et al., 2016).



**Figure 15 : Gliose réactionnelle hypothalamique et altérations associées au régime HFD**

(a) La fonction normale de l'hypothalamus implique une interaction réciproque entre les neurones AgRP/NPY et POMC/CART de l'ARC. Ces neurones répondent à la leptine et à l'insuline et régulent la prise alimentaire et les dépenses énergétiques. (b) Pendant la consommation d'un régime HFD, cette régulation fine est altérée par l'accumulation d'acides gras, par la microgliose et l'astrogliose et l'augmentation des cytokines pro inflammatoires qui altèrent les cellules environnantes. Les tanocytes qui tapissent le 3V ne sont pas représentés pour illustrer l'impact du régime HFD sur leur capacité neurogénique.

3V : third ventricle ; AgRP : agouti-related peptide ; ARC arcuate nucleus ; BBB blood-brain barrier ; CART cocaine and amphetamine regulated transcript ; FA fatty acid ; ME median eminence ; NPY neuropeptide Y ; POMC pro-opiomelanocortin



Les études menées chez le rongeur montrent que cette gliose réactionnelle est très précoce, dès les premiers jours de consommation de régime HFD indépendamment de l'inflammation périphérique et de l'obésité (Thaler et al., 2012 ; Waise et al., 2015). En effet, on observe chez l'homme obèse et le rongeur soumis au régime HFD, une accumulation de cellules microgliales et astrocytaires de phénotypes activés au sein du noyau arqué ; ces cellules se caractérisent par l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Milanski et al., 2009 ; Valdearcos et al., 2014). L'origine de l'accumulation des cellules gliales au cours du régime HFD n'est pas clairement déterminée. Plusieurs hypothèses sont toutefois proposées, un gradient de chimiokines attirerait la microglie depuis différentes régions cérébrales vers l'hypothalamus (Valdearcos et al., 2015) ; il a également été montré que l'obésité induite par un régime HFD augmente l'infiltration des monocytes dans le SNC (Buckman et al., 2013). Une autre possibilité serait la prolifération *in situ* de progéniteurs qui pourraient se différencier en cellules microgliales dans des situations où le taux de microglie doit s'élever (Varvel et al., 2012). Concernant les astrocytes, leur recrutement serait postérieur à l'activation microgliale. Valdearcos et ses collaborateurs ont en effet démontré que les astrocytes ne sont pas activés en réponse aux acides gras saturés, contrairement à la microglie. Les auteurs de l'étude suggèrent qu'au cours du régime HFD la microglie pourrait être rapidement activée par les acides gras saturés ce qui provoquerait l'activation des astrocytes (Valdearcos et al., 2014).

Outre leur activation précoce, l'astrogliose et la microgliose sont toujours présentes au cours de l'obésité chronique et contribuent fortement au maintien de la neuroinflammation hypothalamique (Buckman et al., 2013). Par conséquent, la neuro-inflammation hypothalamique serait un acteur clé dans l'installation du syndrome métabolique. En effet, une étude récente montre que contrecarrer le processus de gliose réactionnelle chez le rat atténue fortement les marqueurs de l'obésité et du syndrome métabolique en périphérie (Milanski et al., 2012). Il existe un dialogue entre les cellules gliales et les neurones. Par exemple, une récente étude montre que la délétion du récepteur de la leptine dans les astrocytes altère les connections synaptiques des circuits neuronaux hypothalamiques (Kim et al., 2014). De même, les astrocytes contribuent à la recapture du glucose (Levin et al., 2011) et des lipides (Shen et al., 2009) par les neurones. Ainsi, la gliose réactionnelle associée au régime HFD perturbe l'organisation neuronale hypothalamique et promeut un environnement pro-inflammatoire de façon très précoce. Ces perturbations vont fortement altérer l'organisation des circuits neuronaux impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

## *Neuro-inflammation et altération de l'homéostasie neuronale*

L'étude de Thaler et de ses collaborateurs montrent que les neurones hypothalamiques sont rapidement affectés en réponse à la consommation d'un régime hyper-lipidique (Thaler et al., 2012). En effet, les résultats de ces travaux montrent qu'après une semaine de régime HFD, des marqueurs de lésions et stress neuronaux sont repérés aux niveaux du noyau arqué et de l'éminence médiane, ils se traduisent par une augmentation de l'expression du marqueur Hsp72 (*Heat shock protein 72*), une protéine impliquée dans la réponse au stress cellulaire (Sharp et al., 1999). En particulier, l'expression de Hsp72 est majoritairement observée au sein des neurones anorexigènes POMC. Ces lésions précoces aboutissent à une diminution de 25% du nombre de neurones POMC dans le noyau arqué, chez des souris ayant été soumises à 8 semaines de régime HFD (Thaler et al., 2012). De même, Moraes et ses collaborateurs ont montré que la consommation d'un régime HFD chez le rat provoque une activation de l'apoptose dans les neurones hypothalamiques en particulier au sein du noyau arqué (Moraes et al., 2009). Une autre étude a montré que l'administration par ICV de TNF- $\alpha$  est suffisante pour induire l'apoptose des neurones hypothalamiques (Choi et al., 2002), suggérant ainsi que les facteurs inflammatoires peuvent fortement favoriser la mort neuronale au cours de la neuro inflammation associée à l'excès nutritif.

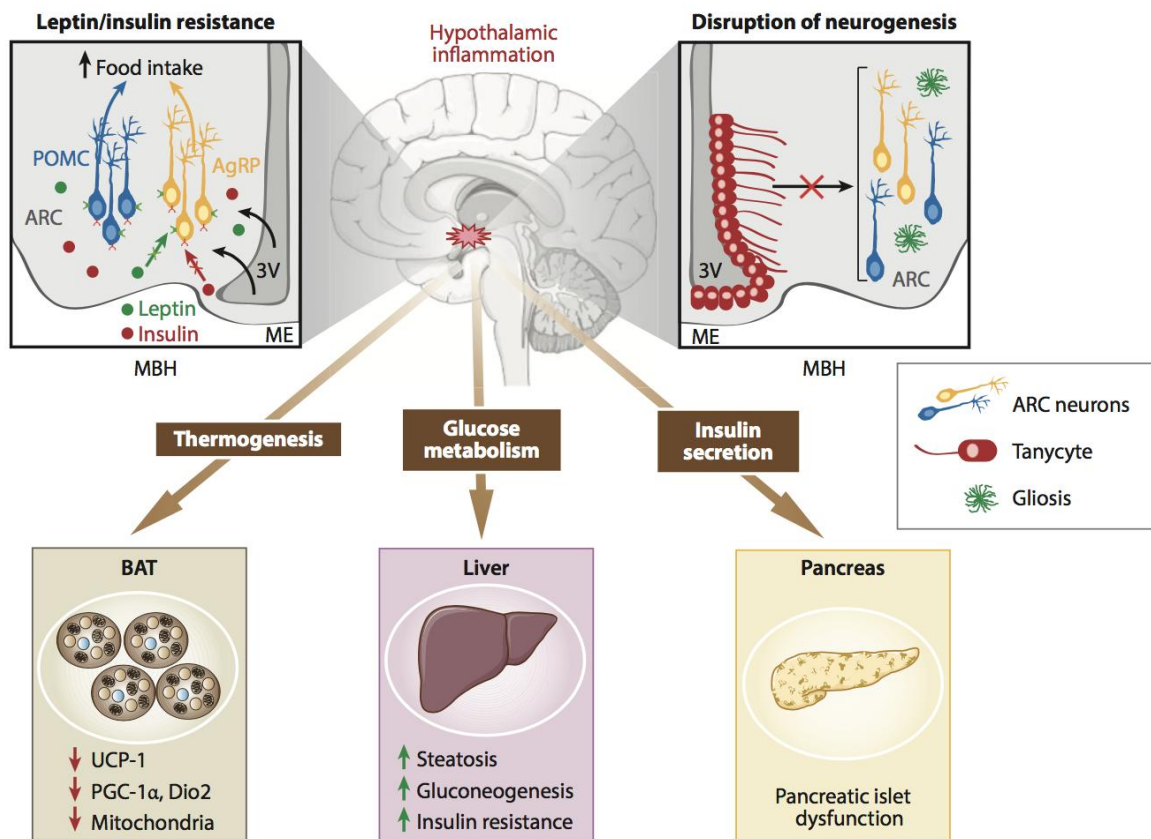
De même, il a été montré que l'inflammation hypothalamique provoque une dégénérescence neuronale chez la souris (Li et al., 2012), et de ce fait peut fortement impacter les circuits neuronaux clés dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. La perturbation de ce remodelage cellulaire par la neuro-inflammation hypothalamique est aujourd'hui fortement soupçonnée d'être impliquée dans le développement de l'obésité et des maladies métaboliques (McNay et al., 2012). En effet, il a clairement été démontré qu'un régime HFD de court terme peut rapidement affecter la sensibilité centrale à l'insuline et à la leptine bien avant l'installation de l'obésité (Wang et al., 2011 ; Woods et al., 2004). Ces résultats suggèrent que la neuro-inflammation associée au régime HFD provoque une altération précoce des circuits neuronaux impliqués dans le contrôle de l'homéostasie énergétique (**figure 15**).

Par ailleurs, l'inflammation hypothalamique perturbe la neurogénèse des cellules souches multipotentes nichées dans l'hypothalamus, qui peuvent se différencier naturellement en

neurones *in vivo* et *in vitro* (Li et al., 2012). Cette neurogénèse de l'hypothalamus adulte préserverait l'intégrité des cellules impliquées dans le contrôle de l'homéostasie énergétique au cours de la vie (Sousa-Ferreira et al., 2014). En effet, les cellules souches hypothalamiques issues de souris obèses surproduisent anormalement des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  (Li et al., 2012).

### *Les tanocytes*

Les tanocytes sont des cellules gliales spécialisées localisées sur le plancher du troisième ventriculaire dans l'hypothalamus tubérale. Ce sont des cellules hautement polarisées, leur corps cellulaire est niché dans les parois du troisième ventricule alors que leurs prolongements s'étendent pour se connecter vers les différents noyaux hypothalamiques (Rodriguez et al., 2005 ; Goodman et al., 2015). Les études des dernières années présentent les tanocytes comme des cellules hautement impliquées dans le métabolisme énergétique. L'équipe de Vincent Prévot a en effet montré que les tanocytes permettent le transport de la leptine du sang vers l'hypothalamus, à travers la barrière hémato-encéphalique (Balland et al., 2014). De même des études récentes montrent que les tanocytes sont sensibles au glucose et à l'ATP (Frayling et al., 2011 ; Dale et al., 2011). Par ailleurs, il semble que les tanocytes sont des progéniteurs neuronaux importants dont la prolifération est modulée par l'alimentation. En effet, la consommation d'un régime HFD de court terme chez la souris stimule la prolifération des tanocytes et la différenciation potentielle en neurones (Lee et al., 2012). Toutefois il a été montré qu'une obésité induite par la consommation d'un régime HFD conduit à une déplétion des cellules progénitrices dans l'hypothalamus, incluant les tanocytes (**figure 16**) (McNay et al., 2012).



**Figure 16 : L'impact de l'inflammation hypothalamique sur les neurocircuits contrôlant la balance énergétique et sur les tissus périphériques**

*L'inflammation hypothalamique est associée à une résistance à la leptine et à l'insuline des neurones POMC et AgRP de l'ARC. La résistance à ces hormones anorexigènes provoque une augmentation de la prise alimentaire et une diminution des dépenses énergétiques. De plus, cette inflammation provoque également une réduction de la capacité des tanocytes et autres progéniteurs cellulaires à entamer la neurogénèse. L'inflammation hypothalamique altère également le métabolisme hépatique, la sécrétion pancréatique d'insuline et la thermogénèse du tissu adipeux brun.*

*Valdearcos et al. 2015*

Il semblerait que les tanocytes participent également à l'inflammation hypothalamique associée au régime HFD et à l'obésité, néanmoins peu d'études existent à ce sujet. Il a toutefois été montré que l'administration de LPS chez le rat conduit à une augmentation de l'expression du récepteur TNFR1 dans les tanocytes (Nadeau et al., 1999). Il se pourrait ainsi que les tanocytes soient réceptifs aux signaux inflammatoires et qu'ils

puissent contribuer à relayer le message à d'autres régions hypothalamiques. De même, on ignore comment les tanocytes localisés dans l'éminence médiane régissent le passage des nutriments ou des signaux inflammatoires au cours de l'obésité. Toutefois, une récente étude a montré que la consommation d'un régime HFD de court terme provoque une perte rapide de l'organisation structurale des tanocytes nichés dans l'éminence médiane, cette altération s'associe à une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires au sein de l'éminence médiane (Ramalho et al., 2018).

### Conséquences fonctionnelles de l'inflammation hypothalamique associée au HFD

Les travaux montrent que l'activation de l'inflammation au niveau de l'hypothalamus médio-basal provoque divers effets néfastes au sein des tissus périphériques (**figure 16**). L'inflammation hypothalamique, de façon tout à fait indépendante du poids corporel, est associée à une altération de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatique mais également à une perte de sensibilité à l'insuline. Cette inflammation hypothalamique favoriserait également l'installation de l'hypertension (Kang et al., 2009, Calegari et al., 2011, Purkayastha et al., 2011). Par ailleurs, l'inflammation hypothalamique altérerait la régulation de la thermogénèse (Arruda et al., 2011 ; Arruda et al., 2010) (**figure 16**). En effet, on observe qu'une administration en ICV de TNF- $\alpha$  à faible dose est suffisante pour induire une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la thermogénèse comme l'UCP-1 (Uncoupling protein 1), alors que ces gènes sont surexprimés dans le tissu adipeux bruns dans des conditions de jeûne (Arruda et al., 2010). Ces résultats accentuent d'autant plus le rôle de chef d'orchestre que peut jouer l'inflammation hypothalamique précoce dans l'installation de l'obésité et des désordres métaboliques.

Ainsi, la neuro-inflammation hypothalamique en favorisant la résistance neuronale à la leptine et à l'insuline, altère le contrôle de la balance énergétique. Ces perturbations favorisent l'augmentation de la prise alimentaire et la diminution des dépenses énergétiques ce qui est propice à l'installation de l'obésité. Or, l'obésité est associée à une inflammation chronique qui, à son tour, tel un cercle vicieux, altère la signalisation de l'insuline et de la leptine ce qui exacerbe d'autant plus les désordres métaboliques et l'obésité. Dans ce contexte, déchiffrer les mécanismes et les médiateurs à l'origine de cette neuro-inflammation hypothalamique est primordial. En ce sens, de nombreux arguments suggèrent que la résistine pourrait représenter un sérieux candidat dans la médiation de l'inflammation associée à l'obésité. Ceux-ci sont exposés dans le chapitre IV,

dernier de cette introduction.

## IV. La résistine : un médiateur possible de l'inflammation hypothalamique ?

---

### Présence de la résistine dans le LCR

Nous avons précédemment décrit l'action pro-inflammatoire et insulino-résistante de la résistine au niveau périphérique. Or, de nombreux arguments émanant d'études menées durant les dernières années suggèrent un rôle de la résistine au niveau central, et plus particulièrement au niveau hypothalamique. En effet, une étude menée par Kos et ses collaborateurs a montré la présence de la résistine dans le liquide céphalo rachidien (LCR) chez l'homme (Kos et al., 2007). De plus, il a été montré que les niveaux circulants de résistine sont positivement corrélés aux niveaux de résistine dans le LCR, et que le diabète de type 2 est associée à une augmentation du niveau de résistine dans le LCR (Berghoff et al., 2016). Ces résultats suggèrent un passage de la résistine à travers la barrière hémato-encéphalique et, par conséquent, une action possible de cette hormone au niveau central, qui serait augmentée dans des conditions de diabète de type 2. Toutefois, aucune étude n'a déterminé par quel(s) mécanisme(s) ce passage est effectué ni s'il peut être régulé dans différentes conditions.

### Le cerveau exprime la résistine : zoom sur l'hypothalamus

La résistine est produite de novo par le cerveau de rat, suggérant un rôle spécifique de cette expression locale (Wilkinson et al., 2005). De même, il a été montré, chez la souris, que la résistine est exprimée par l'hypothalamus, le cortex et l'hippocampe (Morash et al., 2002 ; Wilkinson et al., 2007 ; Brown et al., 2008). Chez le rat, il a été montré qu'une lésion cérébrale traumatique provoque une augmentation de l'expression de l'ARNm de la résistine dans le cortex et l'hippocampe (Brown et al., 2008). Ces résultats suggèrent que la résistine pourrait participer à la réponse post-lésionnelle, probablement par des

mécanismes pro-inflammatoires.

De nombreuses études suggèrent que l'hypothalamus est un tissu cible de la résistine. Des travaux menés en 2005 ont montré pour la première fois que la résistine est exprimée par l'hypothalamus et plus spécifiquement par les noyaux arqué et paraventriculaire (Tovar et al., 2005; Wilkinson et al., 2005). En outre, ces travaux démontrent par immunohistochimie la présence de la résistine dans les neurones anorexigènes POMC. Dans ce contexte, une étude a démontré que la résistine peut, au même titre que la leptine, activer les neurones POMC hypothalamiques, prêtant ainsi à la résistine une action anorexigène (Tovar et al., 2005). Il semblerait que l'activation des neurones POMC par la résistine confère une action similaire à celle de la leptine puisqu'une étude a montré que l'administration de la résistine au niveau central chez le rat provoque une diminution de la prise alimentaire (Tovar et al., 2005). Par ailleurs, il a été montré qu'une perfusion centrale de résistine diminue le poids corporel et modifie l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique dans le foie. En effet, l'administration centrale de résistine a activé la lipogenèse au niveau hépatique mais également la synthèse hépatique de cytokines pro inflammatoires, suggérant que la résistine centrale peut contrôler le métabolisme lipidique périphérique et promouvoir l'inflammation dans le foie (Vazquez et al., 2008). De même, une étude a montré chez la souris que la résistine centrale favorise la résistance hépatique à l'insuline via l'activation des neurones orexigènes NPY, et ce *via* notamment l'induction de l'expression de SOCS-3, régulateur négatif de la voie de l'insuline, et également celles de cytokines pro-inflammatoires dans le foie (Singhal, 2007).

### Effets centraux de la voie résistine/TLR4

Plus récemment, notre équipe a montré qu'une perfusion de résistine au niveau du ventricule latéral pendant 14 jours chez le rat induit une résistance à l'insuline au niveau hypothalamique et périphérique (Benomar et al., 2013). Notre équipe a caractérisé le récepteur de la résistine ainsi que ses voies de signalisation au niveau hypothalamique (**figure 17**). Il a en effet été montré que la liaison de la résistine sur TLR4 provoque l'activation de ce dernier et initie la voie Myd88 dépendante. Les voies de signalisation de TLR4 sont ainsi activées (Akt, ERK1/2, JNK, P38) et aboutissent à la régulation positive de l'expression de la cytokine pro inflammatoire IL6, et de l'expression des régulateurs négatifs de la voie de l'insuline SOCS3 et PTP1B. Ainsi, l'activation de ces facteurs prédispose à l'installation de la résistance à l'insuline. (**Benomar et al. 2013**). Ces effets

contribuent clairement à la résistance à l'insuline induite par le traitement ICV de la résistine.

Au vue de ses effets centraux, la résistine pourrait représenter **un médiateur possible** de l'inflammation hypothalamique associée à l'obésité. Elle est en effet produite de façon proportionnelle à la masse adipeuse chez la souris et fortement stimulée dans des contextes pro inflammatoires chez l'homme. Sa présence dans le LCR laisse fortement penser que, dans des conditions d'obésité où la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique est altérée, elle pourrait exercer son action pro-inflammatoire et insulino-résistante au sein de l'hypothalamus (**figure 18**). Ce dernier, chef d'orchestre de la régulation de l'homéostasie énergétique, exprime également la résistine. On ignore toutefois si le régime HFD peut moduler positivement cette expression. L'hypothèse selon laquelle la résistine serait un médiateur de l'inflammation hypothalamique n'a jamais été investiguée dans la littérature et a fait l'objet de cette thèse.

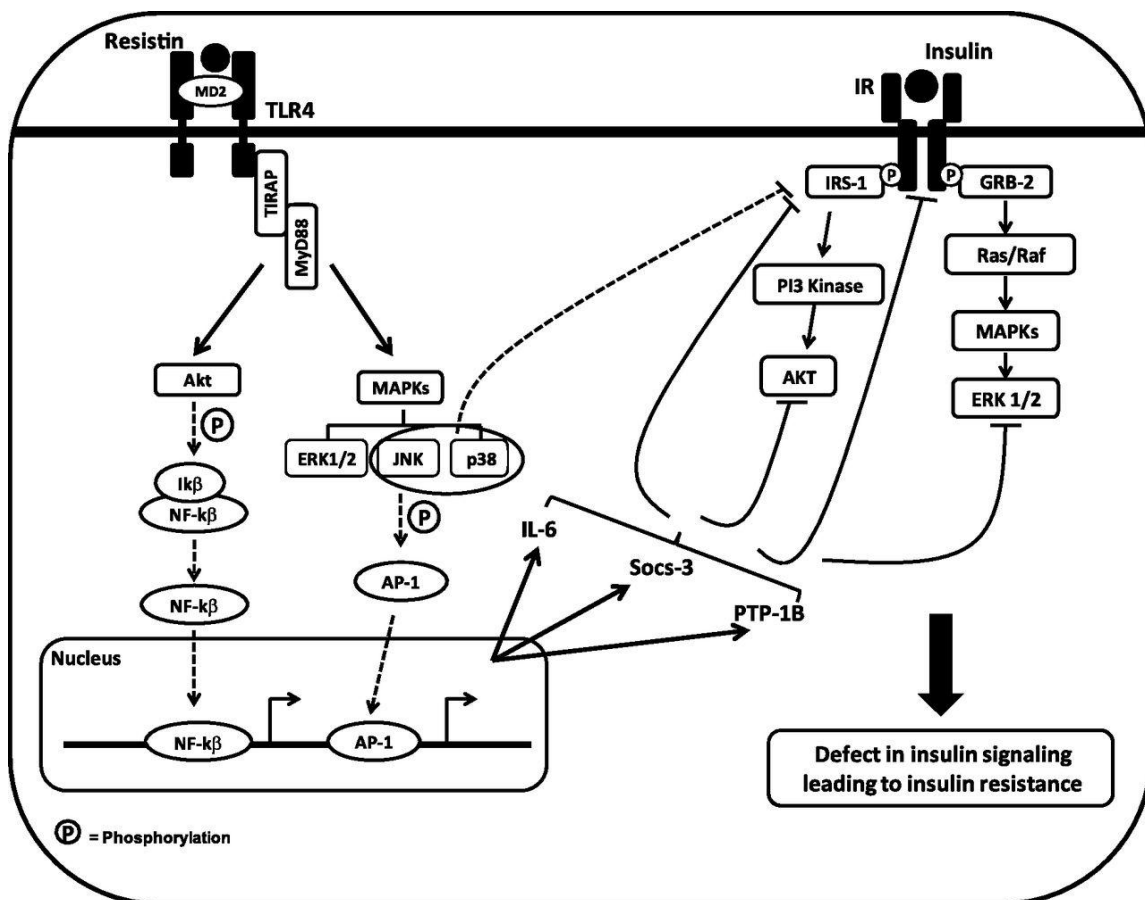
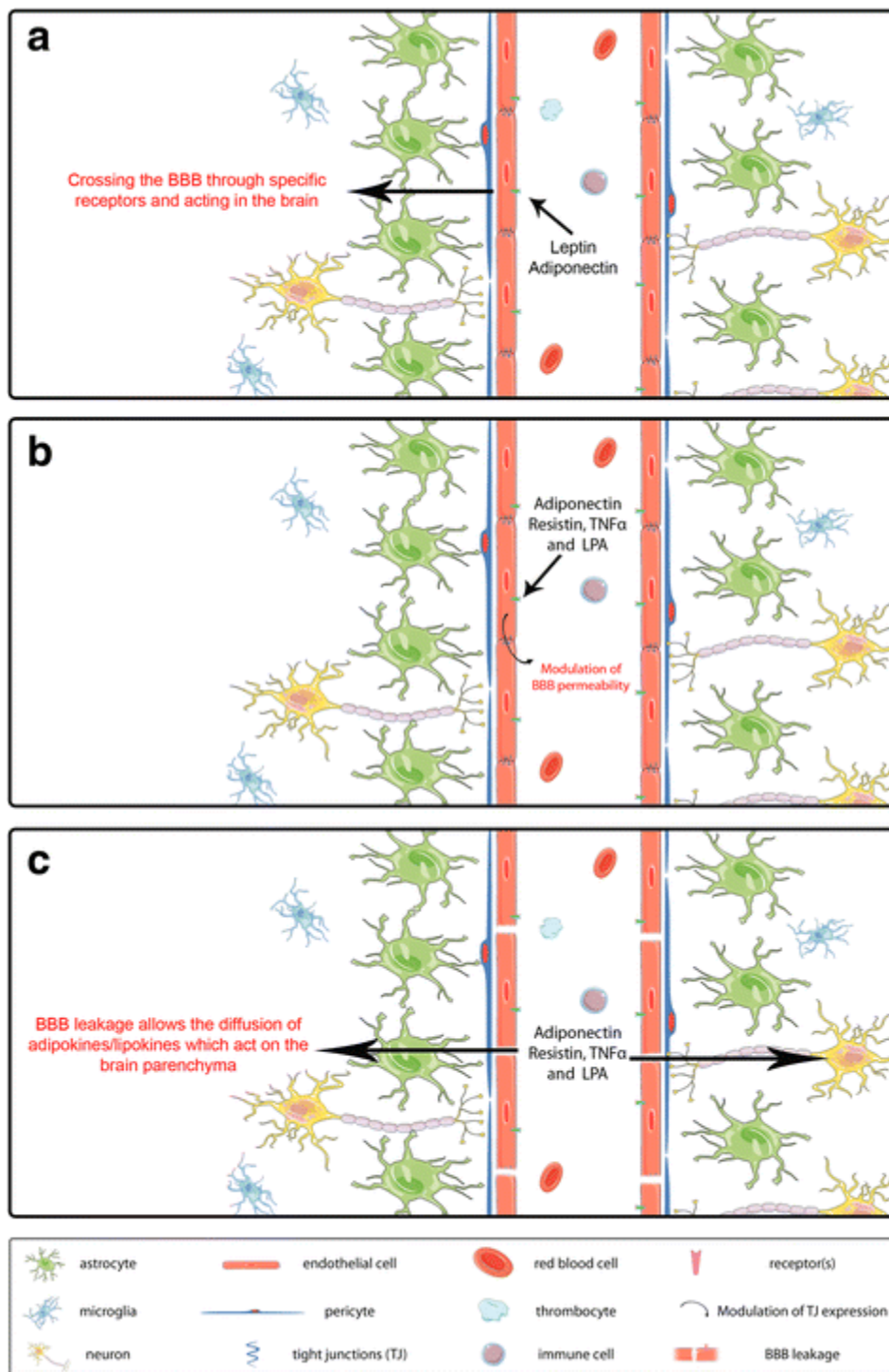


Figure 17 : La voie résistine/TLR4 favorise la résistance à l'insuline au niveau neuronal





**Figure 18 : Obésité et altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique : diffusion des adipokines.**

*Parimisetty et al., 2016*

---

# RESULTATS

---

# CONTEXTE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

La prévalence de l'obésité est en net progrès et constitue un problème majeur de santé publique. Cette pathologie est d'autant plus dangereuse qu'elle s'accompagne d'un *cluster* de désordres métaboliques dont l'inflammation chronique de bas grade et la résistance à l'insuline, principal facteur de risque du diabète de type 2. Les études, principalement menées chez les rongeurs, montrent que la consommation d'un régime hyper lipidique (HFD) représente la cause majeure qui expose à l'obésité et aux pathologies qui lui sont associées. L'obésité induite par un régime HFD s'associe en effet à une inflammation hypothalamique ainsi qu'une altération des circuits neuronaux régissant le contrôle de la balance énergétique, ces altérations sont propices à la prise de poids et au développement de l'obésité et du diabète de type 2. Plus récemment, de nombreuses études ont mis en évidence que la consommation précoce d'un régime HFD, s'accompagne d'une inflammation hypothalamique transitoire, antérieure à l'installation de l'obésité et à l'inflammation périphérique. Ces résultats suggèrent que cette inflammation hypothalamique précoce constitue une étape critique dans le développement de l'obésité et des dysfonctions métaboliques qui lui sont associées. Les médiateurs et les voies de signalisations impliqués dans l'installation de l'inflammation hypothalamique ne sont pas totalement élucidés. Chez les rongeurs, la résistine est associée à l'inflammation et l'insulino résistance en réponse au régime HFD. Les niveaux plasmatiques de cette adipokine sont significativement augmentés au cours de l'obésité et ses effets pro-inflammatoires et insulino résistants sont suggérés au niveau périphérique. Bien que majoritairement produite par le tissu adipeux, l'expression de la résistine a également été rapportée au niveau hypothalamique chez les rongeurs. Cependant, le rôle de la résistine hypothalamique et son mode d'action au niveau central ne sont pas totalement élucidés. Dans notre laboratoire, nous avons récemment démontré, chez le rat, que la perfusion chronique centrale de résistine altère fortement la sensibilité à l'insuline de l'hypothalamus et des principaux tissus périphériques via l'activation du récepteur TLR4 (Toll-like receptor 4) au niveau hypothalamique (Benomar et al., 2013). Nous avons également mis en évidence que la résistine centrale favoriserait le développement de l'insulino-résistance via l'altération de la signalisation de l'adiponectine et du FGF21, deux hormones connues pour leur propriétés insulino-sensibilisatrices et anti-diabétogènes ; apportant ainsi de nouveaux arguments en faveur du rôle causal de la résistine dans la physiopathologie de l'IR et du DT2 (Benomar et al., 2016).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier l'implication potentielle de la résistine hypothalamique dans la mise en place de l'inflammation de l'hypothalamus induite par le régime HFD et ses conséquences sur la sensibilité à l'insuline. Mon travail de thèse s'est articulé autour des questions suivantes :

**1/ Dans quelles populations cellulaires de l'hypothalamus médio-basal la résistine est-elle localisée ?**

**2/ Quel est l'impact du régime HFD à court et à long terme sur l'expression hypothalamique de la résistine et sur sa distribution cellulaire dans le MBH et ses conséquences sur l'inflammation hypothalamique et la sensibilité à l'insuline ?**

**2/ Quel est l'impact direct de la perfusion centrale de résistine sur le développement de l'inflammation et de la gliose réactionnelle du MBH.**

**3/ Quel est le rôle du récepteur TLR4 dans la médiation de l'inflammation du MBH induite par la perfusion centrale de résistine ?**

Pour atteindre nos objectifs, deux protocoles expérimentaux ont été utilisés. Dans une première étude, des souris C57Bl6/J ont été soumises à un régime contrôle ou HFD pendant 3 jours, 8 jours ou 8 semaines. Le but a été d'établir la cinétique de l'installation de l'inflammation et de l'insulino-résistance en relation avec l'évolution des niveaux d'expression de la résistine et de son récepteur TLR4 dans l'hypothalamus medio-basal. Pour chacun des groupes, un suivi du poids corporel et de la prise alimentaire a été effectué. Un test de tolérance au glucose et à l'insuline a été réalisé à la fin de la période de régime. L'inflammation des tissus périphériques a été évaluée par RT-Qpcr. L'inflammation et la gliose réactionnelle hypothalamique ont été évaluées par immunohistochimie et RT-Qpcr. L'expression endogène de la résistine dans l'hypothalamus et sa distribution cellulaire dans l'hypothalamus médiobasal ont été évaluées par une approche combinant des analyses par hybridation in situ et immunohistochimie. Dans une deuxième étude, des souris C57Bl6/J sauvages, et des souris invalidées pour le récepteur TLR4 (*TLR4<sup>-/-</sup>*) ont reçu une perfusion centrale de sérum physiologique ou de résistine pendant 3 jours. Le but de ce protocole a été d'évaluer l'implication potentielle de la résistine centrale dans le développement de l'inflammation hypothalamique. Cette étude a également permis d'explorer l'implication du récepteur

TLR4 dans la médiation des effets pro-inflammatoires de la résistine au niveau hypothalamique.

*Cette étude a fait l'objet d'une publication intitulée «**Short- and long- term-HFD consumption increases resistin mRNA in hypothalamic tanycytes and POMC neurons : New regulatory mechanism linking hypothalamic inflammation to insulin resistance.** » en cours de soumission pour publication.*

# Short- and long-term-HFD consumption increases resistin mRNA expression in hypothalamic tanycytes and POMC neurons: New regulatory mechanism linking hypothalamic inflammation to insulin resistance.

Sarah Al Rifai<sup>1</sup>, Monica Imbernon<sup>2</sup>, Coralie Alexandre<sup>1</sup>, Ghisaline Poizat<sup>1</sup>, Laure Riffault<sup>1</sup>, Vincent Prevot<sup>2</sup>, Mohammed Taouis<sup>1</sup>, Yacir Benomar<sup>1</sup>.

1. Paris-Saclay Institute of Neuroscience, NeuroPSI-UMR 9197, Molecular Neuroendocrinology of Food Intake, CNRS, University Paris-Sud, University Paris-Saclay, Orsay, France.
2. Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Jean-Pierre Aubert Research Center, Inserm U1172, University of Lille, Bâtiment Biserte, 1 place de Verdun, Lille, France.

---

## ABSTRACT

**Objectives:** Obesity induced by high-fat (HF) feeding is closely linked to hypothalamic inflammation and reactive gliosis which constitutes a principal risk factor for insulin resistance and type 2 diabetes. Nevertheless, the mediators and the underlying mechanisms remain poorly documented. In this context, the hormone resistin has been described as an important factor linking obesity-associated inflammation to insulin resistance. Besides its peripheral expression, it has also been reported that resistin is expressed in the hypothalamus. Here we aimed to investigate the regulation of hypothalamic resistin by HFD feeding and its implication in HFD-induced hypothalamic inflammation and gliosis.

**Methods:** C57BL6 mice were fed a HFD or a regular chow diet for 3, 8 days and 8 weeks. TLR4 knockout mice and their control littermates were intracerebroventricularly infused with resistin for 3 days. Metabolic phenotyping, *in situ* hybridization / immunohistochemical analyses, and biochemical analyses were performed to assess the impact of HFD and ICV resistin on the hypothalamic expression of resistin and the development of hypothalamic inflammation, reactive gliosis and insulin resistance. Tanycytes primary culture were also used to evaluate the direct impact of resistin and palmitate treatments on tanycytes inflammation and resistin expression respectively.

**Results:** We show that both Long- and short-term HFD increase hypothalamic endogenous expression of resistin specifically within tanycytes and POMC neurons of the MBH, which positively correlates with HFD-induced hypothalamic inflammation, reactive gliosis, glucose intolerance and insulin resistance. In contrast, there was no resistin expression neither in astrocytes nor in microglial cells even after HFD exposure. Interestingly, we found that central resistin infusion promotes reactive gliosis and both hypothalamic and peripheral inflammation. These effects were completely abolished in TLR4-KO mice. In tanycytes primary culture, prolonged treatment with palmitate increases resistin mRNA expression. Importantly, resistin overexposure increases tanycytes inflammation.

**Conclusion:** Our results suggest a potential role of hypothalamic resistin, especially tanycytes-derived resistin, in the establishment of hypothalamic inflammation and gliosis induced by both Long- and short-term HFD.

---

## INTRODUCTION

Obesity is closely linked to chronic low-grade inflammation and insulin resistance, which constitute principal risk factors for type 2 diabetes [T2D] [1-3]. Numerous studies have identified different underlying mechanisms connecting diet-induced obesity to inflammation and insulin resistance through the alteration of common signal pathways. In rodents, the consumption of high fat diet

[HFD] predisposes to insulin resistance and low-grade inflammation associated to the impairment of energy homeostasis control [4-6]. These disorders are concomitant with the alteration of hypothalamic insulin and leptin signaling, considered as the main anorexigenic hormones [7,8]. Additionally, HFD deregulates the hypothalamic neuronal circuitries implicated in the regulation of energy homeostasis leading to body weight gain, obesity and T2D [9-11]. More recent findings attributed to hypothalamic inflammation a critical role in the onset of obesity-induced insulin resistance and inflammation [1,4,12]. It has been also shown that unlike peripheral inflammation, which occurs as a consequence of obesity, hypothalamic inflammation selectively and rapidly develops in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) within the first days of HFD exposure. This hypothalamic inflammation is associated with insulin/leptin resistance and the upregulation of neuronal injury markers without significant changes of body weight gain [8,11,13]. These data suggest that hypothalamic inflammation precedes the HFD-induced insulin resistance and the deregulation of energy homeostasis control. However, the causal relationship linking hypothalamic inflammation to obesity and insulin resistance remains poorly documented. Recent investigations reported that hypothalamic inflammation and gliosis may be functionally linked to obesity and could contribute to obesity-related disorders, such as insulin resistance and T2D [1,12,13]. Indeed, growing evidences suggest a critical role of hypothalamic resident glial cells in the development and progression of metabolic disorders [interglial crosstalk]. These reports revealed that HFD-induced inflammation activates astrocytes and microglia leading to the augmentation of proinflammatory mediators (ie. Cytokines, chemokines, reactive oxygen species...) that promotes hypothalamic inflammation [13,14]. It is well known that HFD increases circulating levels of deleterious adipokines and proinflammatory cytokines originated from the adipose tissue that are largely implicated in peripheral and central inflammation [3,15]. Among these adipokines, resistin, a cysteine-rich polypeptide secreted by adipose tissue in rodents and by macrophages in humans [16,17], is described as an hormone linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes [18-22]. Indeed, several studies reported that plasma resistin levels are positively correlated to adipose tissue mass [23-26] and resistin treatments impair glucose homeostasis leading to insulin resistance [27-29]. Conversely, deletion of the resistin gene or infusion of resistin antibodies or antisense oligonucleotides improves insulin responsiveness [17,30-32]. Resistin also modulates the synthesis and secretion of key pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-12 by macrophages via nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) -dependent pathways contributing to alterations of peripheral insulin signaling pathways [17, 19, 33,34,36,37]. In humans, recent studies have also closely linked resistin to insulin resistance, atherosclerosis, and inflammation [38-40]. Beside to its peripheral actions, resistin impairs glucose and lipid metabolism as well as liver insulin responsiveness through a direct effect in the brain [41-44]. In this context, we have recently demonstrated that central resistin through the binding to hypothalamic TLR4 induces both hypothalamic and peripheral insulin signaling [45]. We have also characterized a novel mechanism of insulin resistance orchestrated by hypothalamic resistin/TLR4 pathway that impairs adiponectin signaling and promotes FGF21 resistance [46]. These findings strongly highlights the crucial role of hypothalamic resistin in the onset whole body insulin resistance. It is now clearly established that resistin is expressed in non-adipose tissue such as monocytes and macrophages [22] implying a role in inflammatory response. Resistin is also expressed in the hypothalamus [47]. However, the specific role of hypothalamic resistin remains unknown especially its implication in HFD-induced hypothalamic inflammation and its regulation by diet. Moreover, the cell types and hypothalamic nuclei expressing resistin as well as the impact of chronic or acute HFD exposure on hypothalamic resistin are unknown.

In the present study we report for the first time that HFD-induced hypothalamic inflammation is associated with a significant increase of resistin expression in tanycytes and neurons of medio-basal hypothalamus [MBH]. Additionally, we show that ICV resistin markedly increases inflammatory markers in the hypothalamic arcuate nucleus and adjacent median eminence in association with reactive gliosis involving recruitment of both microglia and astrocytes. We also report that the knockdown of TLR4 almost completely abolished resistin-dependent hypothalamic inflammation and reactive gliosis. Altogether, these data indicate that hypothalamic resistin/TLR4 pathway could play an important role in the molecular alterations underlying short-term HFD-induced

hypothalamic inflammation, and support the hypothesis that central resistin may constitute a key player in the interplay between hypothalamic inflammation, insulin resistance and related neuronal and metabolic dysfunctions.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Adult male C57BL/6J mice (Janvier Laboratories), and TLR4 knockout (TLR4<sup>-/-</sup>) mice (The Jackson Laboratory, ME, USA) with the same genetic background (TAAM-UPS44; CNRS, Orleans, France) were housed individually in a temperature-controlled environment with a 12-h light/12-h dark cycle and unrestricted access to water and standard diet (SAFE, Augy, France). All experimental procedures were performed according to the institutional guidelines of laboratory animal care and approved by the governmental commission of animal research.

### **Short and long term high-fat-diet feeding**

Adult male C57BL/6J mice were fed with chow (19,6% protein, 11,9% lipids, 68,5% carbohydrates) or High-fat-diet (HFD 235, 15,5% proteins 46% lipids 38,5% carbohydrates ; Safe) for 3 days, 8 days or 8 weeks. Body weight and food intake were measured daily. At the end of the experiment period, mice were subjected to glucose and/or insulin tolerance tests in order to assess whole body insulin sensitivity. Then, tissues were manually collected and immediately frozen into liquid nitrogen and conserved at -80°C. Brains were fixed overnight into 4% Paraformaldehyde/PBS solution and then placed into 20% sucrose/PBS solution for 48 hours. Brains were then frozen in -40°C cooled solution of isopentane and then conserved at -80°C.

### **Chronic Intracerebroventricular Infusion of Resistin**

Adult male C57BL/6J mice (27–32g) and TLR-4 knockout mice (Jackson Laboratories) were treated with resistin or vehicle via intracerebroventricular infusion during 3 days. Briefly, mini-osmotic pumps (model 2002; Alzet, Charles River, L'Arbresle, France) were implanted under ketamine (150mg/kg; Vibrac, Lyon, France) xylazine (5mg/kg; Rompun; Bayer) anesthesia. Brain infusion cannulas were stereotaxically placed into the lateral brain ventricle. The osmotic pumps were housed in a subcutaneous pocket on the dorsal surface of the animal. The mice were then infused with either vehicle or resistin (1.2µg/12µL/day; pumping rate 0.5µL/h) for 3 days. At the end of the experimental period, the hypothalami were manually dissected and immediately frozen into liquid nitrogen and conserved at -80°C.

### **Immunohistochemistry**

After fixation-perfusion with 4% paraformaldehyde/PBS, frozen sections in the coronal plane through the mouse hypothalamus were processed for Iba1, Gfap in order to assess reactive gliosis. Moreover, antibodies targeted against Resistin, Vimentin, Hsp72 and NeuN, were used using standard immunohistochemical procedures. Briefly, sections were first incubated with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl for 20 min and were blocked/permeabilized with a solution containing 0.1% Triton X-100, 0.2% Fish Gelatin, 2% normal donkey serum for 1 h at room temperature. Then, sections were incubated overnight at 4°C with either rabbit anti-iba1 (1:2000; Cell Signaling Technology), mouse anti-Gfap (1:500; Millipore), rat anti-cd68 (1:500, Biorad), rabbit anti-resistin (1:400, Abcam) chicken anti-vimentin (1:1000, Millipore), mouse anti-hsp72 (1:50 Enzo) or, mouse anti-TLR4 (1:400, Santa Cruz) mouse anti-NeuN (1:1000, millipore) antibodies. Immunofluorescence was performed with a combination of Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568, or Alexa Fluor 647 labeled anti-mouse, anti-rabbit or anti-chicken (1:400; Invitrogen) and DAPI (Sigma-Aldrich) in order to identify cell nuclei. Images were captured on a Zeiss LSM-700 confocal microscope. Quantification of staining intensity was performed in a blinded fashion using ImageJ. Both sides of bilateral structures of the ARC were quantified on 3 slides per animal, and replicate values from each animal were individually averaged. Microglia activation score was determined using qualitative analysis. A value between 0 and 5 based on the observed morphology of microglia was assigned in a blinded fashion. 0 was attributed to ARC with 100% of resting microglia. 1 was attributed to ARC with less than 50% of mildly activated microglia; mildly activated microglia is characterized by



increased thickness and decreased lengthening of processes. 2 was attributed to ARC with more than 50% of mildly activated microglia. 3 was attributed to ARC with less than 50% of bushy microglia. Bushy microglia are characterized by enlarged cell body and swollen and short processes. 4 was attributed to ARC with more than 50% of bushy microglia. 5 was attributed to ARC with the presence of amoeboid microglia. Amoeboid microglia are characterized by a typical shape: no more processes and a larger cell body.

### **Combined in-situ hybridization and Immunohistochemistry**

In situ hybridization of resistin mRNA was performed with fluorescent detection of either microglia, astrocytes, tanycytes or POMC neurons using respectively Iba1, Gfap, Vimentin or POMC antibodies following Manuel E. Lopez, 2014 protocol. Briefly, a total of 200 ng/mL of purified DIG-labeled resistin-RNA probe was hybridized to 20 µm thick vibratome tissue sections. Hybridization was performed at 60°C for 16 h in hybridization solution: 50% formamide, 5x SSC, 0.1% Tween-20, 500 µg/mL tRNA, 500µg/mL salmon sperm DNA, 50 µg/mL Heparin salt, and 0.5% SDS. Washes were done at 60°C for 15 min using hybridization buffer followed by 5x SCC and 0.2x SSC buffers with 0.1% Tween-20 (Sigma). Afterwards, brain sections were blocked/permeabilized with a solution containing 0.1% Triton X-100, 0.2% Fish Gelatin, 2% normal donkey serum for 1 h at room temperature. Anti-Digoxigenin-AP and primary antibodies was diluted in blocking/permeabilization solution and incubated overnight. The NBT/BCIP reaction was then performed as commercially directed (Roche) and stopped with stop buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA 0.01% Tween-20). Images were captured on a Zeiss LSM-700 confocal microscope. Quantification was performed in a blinded fashion on anatomically matched brain regions identified in ×20 images. Both sides of bilateral structures of the hypothalamic nuclei were counted on 3 slides per animal, and replicate values from each animal were individually averaged.

### **RNA extraction from mice tissues and quantitative real-time RT-PCR**

Frozen tissues samples were homogenized with Precellys 24/Cryolys apparatus, and total RNA was extracted using TRIzol LS reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. RNA concentration and purity were measured using a NanoDrop ND1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific) 1 µg of total RNA was subjected to reverse transcriptase and then to quantitative PCR analysis using specific primer pairs that target Bactin sense 5'TGAGAGGGAAATCGTGC GTGAC antisense 3'GCTCGTTGCCAATAGTGATGACC, Cd11b sense 5'GGTGCTCTTGGCTCTCATCA antisense 3'AGGTGGGGCGTCTTGG, CD68 sense 5'GGGGCTCTTGGGA ACTACA antisense 3' GAGAGAGACAGGTGGGGATG, EMR1 sense 5'ATACCCTCCAGCACATCCAG antisense 3' CCATCTCCCATCCTCCACAT, GFAP sense 5'AAGAGACAGAGGAGTGGTATCGG antisense 3' GCTTCGTGCTTGGCTTGGC , ICAM 1 sense 5' GACACCCCTGACCTCCTG antisense 3' CTGCTGGTTTGTGCTCTCCTG, IL1B sense 5' GCCTCGTGCTGTCGG antisense 3' TGTCGTTGCTTGGTTCTCCT, IL6 sense 5' GCCTTCTTGGGACTGATGCTGGT antisense 3' TCCTCTGTGAAGTCTCCTCTCCG, NFKB sense 5' ACAGATGGGCTACACAGAGG antisense 3' GTGGAGGAAGACGAGAGAGG, SOCS3 sense 5' CCAGCTCCAGCTTCTTTCAAGTG antisense 3' GAGAGTCCGCTTG TCAAAGGTATTG, PTP1B sense 5' CTCTTCTCCAGCCACCAGT antisense 3' CCACCATCCGTCTCCTAACT, TLR4 sense 5' CTGGGGAGGCACATCTTCTGG antisense 3' TGCCGTTTCTTGTCTTCTCCTCTGCT, IBA1 sense 5' GAAAGGGGAAGTGTGAG A antisense 3' TGGCTCATGGCTCCTCA G. The PCR is performed in the Step One apparatus (Applied Biosystems), using Fast SYBR Green Master Mix (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelinne, France). A ratio of specific mRNA/β-actin mRNA amplification was calculated to normalize the expression levels.

### **Primary culture of rats tanycytes stimulation**

Primary culture of rats tanycytes cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies) supplemented with 4,5g/L glucose, 10% SVF, 1% l-glutamine and 1% penicillin/streptomycin. Serum-starved cells were incubated in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium for 48h, and then incubated with or without resistin (300ng/mL) (Abcam, Paris, France) for 4h or 20min, or with or without Palmitate (0.5mM) for 16h. Cells were then washed twice with ice-cold PBS prior to protein or RNA extraction using adequate buffers and protocols as

previously described (Benomar *et al.*, 2013).

### **Gene silencing using Small Interfering RNA**

A day before the experiment, primary culture of rats tanycytes cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies) supplemented with 4,5g/L glucose, 10% SVF, 1% l-glutamine but without penicillin/streptomycin. A pool of specific small interfering RNA (siRNA) duplexes targeting TLR4 genes and control siRNA were purchased from ThermoFisher Scientific (Villebon-sur-Yvette, France). Transfection of siRNAs was performed using lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen).

### **RNA extraction from primary culture of rats tanycytes and quantitative real-time RT-PCR**

At the end of each treatment, cells were incubated with Trizol LS Reagent (Invitrogen) and RNA was extracted according to the manufacturer's recommendations. RNA concentration and purity were measured using a NanoDrop ND1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). Then, 1 µg of total RNA was subjected to reverse transcriptase and then to quantitative PCR analysis using specific primer pairs that target 18S sense 5'TCCCCGAGAAGTTTCAGCACATCC antisense 3'CTTCCCATCCTTCACGTCCTTCTG, IL-6 sense 5'GTTGCCTTCTTGGGACTGATGTTGT antisense 3'ACTGGTCTGTTGTGGGTGGTATCC, IL-1b sense 5'AAAATGCCTCGTGCTGTCT antisense 3'TCGTTGCTTGCTCTCCTTGT, TNF-alpha sense 5'CTCATTCCTGCTCGTGCCGG antisense 3'CCGCTTGGTGGTTTGCTACGA, NFkB sense 5'GCGACAGATGGGCTACACAGAGG antisense 3'TGGAGGAGGACGAGAGAGGCA, Resistin sense 5'CCCAGAAGGCACAACG antisense 3'TCAGGAACCAACCCGCAG.

### **Western blot analysis**

Protein lysates from rats primary culture of tanycytes cells were prepared and analyzed by Western blot. Total protein extracts were separated in SDS-PAGE, using 8% gels. Then, protein samples were transferred to PVDF membrane (Millipore). The membranes were blocked with 5% BSA in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween20 for 1h at room temperature and then incubated overnight with the primary antibodies at 4°C. Primary antibodies were used according to manufacturers' recommendations and all antibodies were from Cell Signaling Technology: phospho (p)-AKT (ser473), phospho-(p)-erk1/2. Blots were then incubated with secondary mouse or rabbit antibodies coupled to horseradish peroxidase for 1h at room temperature. Chemiluminescence signal was developed using a Western Bright ECL kit (Advansta Ins., CA, USA). The blots were finally scanned using the Carestream Molecular Imaging System 4000MM PRO (Carestream Health Inc., CT, USA). Semi-quantitative analysis of the relative density of the bands in Western blots was performed using Carestream software. The protein expression levels were normalized to β-actine expression.

### **Data analysis and statistics**

Statistical analysis was performed using ANOVA and Fisher post hoc test to detect significant intergroup differences. Data are presented as mean±SEM. *P* value <0,05 was considered statistically significant.

## **RESULTS**

### **Long-term HFD (LT-HFD) induces hypothalamic inflammation and gliosis, and impairs whole body insulin sensitivity.**

To determine whether long-term HFD affects hypothalamic inflammation and whole body insulin sensitivity, 8 week old male C57BL/6J mice were fed normal chow diet (NCD) or a HFD (LT-HFD) for 8 weeks. LT-HFD mice exhibited higher body weight gain, fat mass and energy intake as compared to NCD mice without significant change in energy intake (Fig 1 a-d). LT-HFD decreased plasma levels of adiponectin and increased those of leptin, resistin and insulin (Fig 1 e-h). Using glucose and insulin tolerance tests, we show that LT-HFD mice are intolerant to both glucose and insulin as compared to NCD mice (Fig 1i, 1j). To investigate the impact of HFD on insulin signaling, we have measured the expression of two well known negative regulators insulin signaling SOCS3 and PTP-1B in liver, muscle and the hypothalamus. We show that SOCS3 is up-regulated in liver (fig 1l), muscle (fig 1n) and the hypothalamus (fig 1p) of LT-HFD mice whereas PTP-1B

expression was not affected. We have also measured the mRNA expression levels of several proinflammatory markers. We show that LT-HFD increased the liver expression of IL6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  and TLR4 (fig 1k), and the muscle IL6, IL1 $\beta$  and TLR4 (fig 1m). In the hypothalamus, we found that LT-HFD increased the expression of IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , NF $\kappa$ b and TLR4 (Fig 1o). To determine whether the augmentation of neuroinflammation markers in the hypothalamus are associated with activation of both microglia cells astrocytes, we performed we used IHC approach using specific markers of microglia (iba1) and astrocytes (GFAP). IHC analyses revealed that LT-HFD increases the microglial cell activation as evidenced by shape change and microglia activation score (fig 2a, 2b, 2c and 2e) in the hypothalamic ARC, VMH and DMH nuclei. Similarly, GFAP staining was significantly increased in LT-HFD mice as compared to NCD mice (fig 2a, 2b, 2d). These data are confirmed by the significant increase at the mRNA levels of microglia-specific markers (CD68, Emr1 and Iba1) and astrocyte-specific (GFAP) in the hypothalamus of LT-HFD mice (fig 2f).

We have also studied the impact of LT-HFD on reactive gliosis known as brain response to neuronal injury, and in this purpose we measured the hypothalamic expression of Hsp72 known as marker of neuronal injury. We show that Hsp72 expression as evidenced by IHC is significantly increased in LT-HFD mice as compared to NCD mice (fig. 2g, 2h). In the hypothalamic arcuate nucleus Hsp72 is expressed in POMC neurons as evidenced by the col-localization of POMC and Hsp72 immunostainings (fig. 2g). Furthermore, both POMC and Hsp72 stainings are increased in LT-HFD mice (fig. 2h, 2i).

### **Chronic HFD increases the endogenous expression of resistin in the hypothalamus.**

To investigate whether LT-HFD modulates hypothalamic resistin expression, we measured resistin mRNA expression using ISH in hypothalamic ARC, DMH and VMH nuclei. We show that LT-HFD mice exhibit a significant augmentation of resistin expression in hypothalamic nuclei (fig. 2i and 2m). Furthermore, we focused on hypothalamic ARC nucleus, where we show a good correlation between resistin mRNA and protein expression with a significant increase in LT-HFD mice as compared to NCD mice (fig 2k, 2l). Indeed, the quantification of resistin mRNA and protein labeling show a 4-fold and 10-fold increase in LT-HFD, respectively (fig. 2m, 2n).

Next we examined the cellular localization of resistin mRNA (ISH) within the hypothalamus to identify the hypothalamic cell types expressing resistin. We have focused on the MBH, known to be crucial for the regulation of feeding behavior and energy metabolism. Dual staining using resistin-specific riboprobe and specific markers of tanycytes (anti-vimentin) and POMC neurons, revealed a marked resistin staining in tanycytes and arcuate POMC neurons (fig. 3a and 3b). Furthermore, the co-localization of resistin mRNA with both vimentin and POMC stainings is strongly increased in LT-HFD mice compared to NCD mice (fig 3a and 3b). In contrast, resistin mRNA was not detected, even in LT-HFD mice, neither in astrocytes nor in microglia cells as evidenced by GFAP and Iba1 immunostaining (fig 3c and 3d).

To investigate whether LT-HFD increased neuronal injury marker Hsp72 in POMC neurons expressing resistin, we co-localized Hsp72 and POMC immunostaining with resistin ISH staining. We show that LT-HFD significantly increased HSP2 staining and resistin expression in POMC neurons (fig. 3e-3h).

### **Resistin induces tanycytes inflammation through TLR4 receptor.**

Having previously established that resistin exerts its effects through TLR4 receptor, we therefore examined their potential co-localization in the MBH. Immunostaining of resistin and TLR4 revealed that cells within the MBH expressed both resistin and TLR4, with a specific staining of both markers in tanycytes (fig 4a). We have also showed that LT-HFD increased both TLR4 and resistin and their co-localization as compared to NCD mice (fig 4a, 4b).

As shown in figure 4, tanycytes express both resistin and its receptor TLR4, this expression

significantly increases in LT-HFD mice. Thus, to further investigate resistin/TLR4-signaling pathway in tanycytes we have used tanycyte primary culture prepared from rat hypothalamus. We show that resistin increases p-ERK1/2 phosphorylation (fig 4c). Resistin-induced p-ERK1/2 and Akt phosphorylation is completely abolished in tanycytes lacking TLR4 (siTLR4) (fig. 4d, 4e and 4f). Next, we examined the impact of resistin overexposure on the expression of inflammatory markers in tanycytes. Resistin significantly increases the expression of IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and Nf $\kappa$ B, whereas IL6 expression was not affected (fig 4 g). Having established that LT-HFD increased resistin expression in hypothalamic tanycytes (fig. 4a and 4b), we examined whether prolonged treatment with palmitate, a saturated fatty acid, affects resistin expression in cultured tanycytes. We show that palmitate overexposure (16 hours) significantly increases resistin mRNA expression (fig 4h).

### **Short-term HFD (ST-HFD) induces hypothalamic inflammation and gliosis and impairs whole body insulin sensitivity.**

To further explore whether ST-HFD affects hypothalamic inflammation and insulin sensitivity, 8-week old male C57BL/6J mice were fed normal chow diet (NCD) or a HFD for 3 (ST-HFD-3d) or 8 (ST-HFD-8d) days. We show that ST-HFD-8d mice exhibit lower energy intake as compared to NCD and ST-HFD-3d mice (fig. 5a). The body weight gain is not affected by ST-HFD (fig. 5b). Subcutaneous adipose tissue mass is significantly increased in ST-HFD mice as compared to NCD mice (fig. 5c), whereas visceral adipose tissue mass is not affected by ST-HFD (fig. 5d).

We next measured the impact of ST-HFD on glucose tolerance. The glucose tolerance test revealed that ST-HFD-3d and ST-HFD-8d are intolerant to glucose as compared to NCD mice (fig 5e). This is associated with increased plasma levels of both glucose (fig. 5f) and insulin (fig. 5g) indicating the onset of systemic insulin resistance. Further, we explored the impact of ST-HFD on both peripheral and hypothalamic inflammation. We show that TNF $\alpha$ , NF $\kappa$ B and IL1 $\beta$  expression were not affected by ST-HFD in liver (fig. 5i). In muscle, IL1 $\beta$  is significantly increased in ST-HFD-8d and the other investigated markers were not affected (fig. 5h).

In the hypothalamic arcuate nucleus, immunohistochemical analyses, using specific markers of microglia (Iba1) and astrocytes (GFAP), show a significant increase of both Iba1 and GFAP staining in the MBH of ST-HFD-3d and ST-HFD-8d mice as compared to NCD mice (Fig 5j). This increase was evidenced by the significant increase of microglia activation score (fig 5k) and GFAP staining intensity (fig 5l). To investigate whether the activation of microglia is associated to an augmentation of resistin mRNA expression, we performed ISH in ST-HFD-3d and ST-HFD-8d. We show a transient significant increase of resistin expression in ST-HFD-3d that decreases in ST-HFD-8d to be similar to that measured in NCD mice (fig. 5j and 5m). In contrast to resistin expression, we found that ST-HFD-8d but not ST-HFD-3d mice exhibit a higher expression of proinflammatory genes IL-6, TNF $\alpha$  and NF $\kappa$ B, associated with a significant upregulation of microglial markers Iba1, CD68, Cd11b, Icam-1 and the astrocyte gene marker GFAP, in addition to SOCS3 the negative regulator of insulin signaling (fig 5n).

### **ST-HFD-3d increases resistin expression in POMC neurons and tanycytes in arcuate nucleus of the hypothalamus.**

To identify the hypothalamic cell types expressing resistin mRNA, we colocalized resistin ISH staining and IHC staining for POMC neurons (POMC marker) and tanycytes (Vimentin marker). We show a strong increase of resistin expression in both tanycytes and POMC neurons within the arcuate nucleus of ST-HFD-3d mice (Fig 6a and 6b), this augmentation is quantified and expressed as the percent of POMC neurons or tanycytes expressing resistin (fig. 6e and 6f). We also studied the effect of ST-HFD on resistin expression in microglia cells and astrocytes. Similarly to LT-HFD mice, resistin expression does not co-localized with Iba1 (fig. 6c) or GFAP (fig. 6d) indicating that microglia cells and astrocytes do not express resistin.

### **Central resistin infusion promotes hypothalamic inflammation and reactive gliosis through TLR4 (Fig 9).**

To test whether direct injection of resistin in the brain is able to modulate hypothalamic inflammation and reactive gliosis, we infused recombinant human resistin in the lateral cerebral ventricle (intracerebroventricular resistin infusion, ICV-resistin) of C57BL6 mice for 3 days. Immunohistochemical analyses revealed a marked increase of both Iba1 and GFAP staining in the MBH of ICV resistin-treated mice (fig. 7a). This is mirrored by changes in microglia morphology indicative of microglial activation (Fig 7a, see insert). Paralelly, we show that resistin ICV infusion increases hypothalamic gene expression of key proinflammatory (*IL-6*, *TNF $\alpha$*  and *IL1- $\beta$* ) and gliosis(*Cd68*, *Emr1*, *Icam-1*, *Iba-1* and *GFAP*) markers (fig. 7b). We next assessed whether resistin effects on hypothalamic neuroinflammation and gliosis are mediated by TLR4. We show that resistin-induced inflammation and gliosis effects are completely abolished in the hypothalamus of TLR4<sup>-/-</sup> mice (fig 7c) as well as the changes in microglia cells' shape that mirror their activation (fig 7a). Furthermore, we investigated whether central resistin infusion could contribute to peripheral inflammation. We show that resistin ICV treatment upregulated IL6, TNF $\alpha$  and IL1 $\beta$  in the liver and muscle, and these effects are completely abolished in TLR4<sup>-/-</sup> mice (fig 7d, 7e, 7f, 7g). To determine whether these effects are strictly attributed to the resistin administered by ICV, we have measured resistin plasma levels. We show that resistin ICV did not affect resistin plasma levels (fig 7h).

## **DISCUSSION**

Despite the increasing number of reports concerning the causal relationship between HFD-induced metabolic disorders and hypothalamic inflammation, the underlying mechanisms as well as the implicated hypothalamic cell types remain poorly documented. Furthermore, the HFD consumption seems to induce different responses depending upon the time of exposure differentiating then acute from chronic HFD-induced disorders. Resistin is among the hormones that have been suggested to be implicated in HFD-induced hypothalamic inflammation and insulin resistance [42,45,46]. Besides its peripheral expression by adipose tissue and immune cells, resistin is also expressed in the hypothalamus of rodents [47]. Nevertheless, the precise role of hypothalamic resistin as well as its regulation by HFD feeding remain unknown. In the present study we show, for the first time, that both acute and chronic consumption of HFD markedly increased resistin mRNA expression in the hypothalamic tanycytes and POMC neurons concomitant to hypothalamic inflammation and neuronal injury. This is accompanied by peripheral inflammation and insulin resistance. Additionally, ICV resistin significantly increased inflammatory markers in the hypothalamic arcuate nucleus and adjacent median eminence in association with reactive gliosis involving recruitment of both microglia and astrocytes. We also report that the knockdown of TLR4 abolished resistin-induced hypothalamic inflammation and gliosis, insulin resistance and peripheral tissues' inflammation.

It is now recognized that HFD-induced obesity promotes several metabolic disorders including insulin resistance and T2D that are associated to the augmentation of systemic pro-inflammatory factors [10,48]. Indeed, many published data indicate that HFD-induced low-grade inflammation constitutes a key component of obesity-associated insulin resistance and metabolic dysfunctions [3-5]. In Agreement with these findings, our study demonstrates that long-term consumption of HFD increases body weight and fat mass. This is accompanied with a marked decrease of the circulating levels of the insulin-sensitizing hormone adiponectin and as expected significant augmentation of plasma levels of resistin, leptin and insulin evidencing an insulin resistant state also reflected by both glucose and insulin intolerance of LT-HFD mice. This is corroborated by the upregulation of the negative regulators of insulin signaling SOCS3 in liver, muscle and the hypothalamus. Additionally, we found that LT-HFD markedly increases gene expression of several

proinflammatory markers both in the liver and the muscle exacerbating insulin resistance in accordance with previously published data [49,50]. Besides the deleterious peripheral effects, HFD triggers inflammatory responses in the hypothalamus [1,12,13,51-53]. In agreement with these studies, we show that LT-HFD increased the hypothalamic expression of key proinflammatory markers including TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , NF $\kappa$ B, and TLR4. Hypothalamic glial cells, particularly astrocytes and microglia, have gained particular attention for their critical involvement in the development and the progression of metabolic disorders in the context of diet induced obesity. Indeed, HFD induces microglia and astrocytes activation leading to hypothalamic inflammation and subsequent neuronal dysfunctions contributing then to the onset metabolic disorders [14]. Here, we report that LT-HFD mice exhibit a marked augmentation of hypothalamic microglia and astrocyte specific markers revealing microgliosis and astrogliosis in MBH as also reported by Thaler et al. [1]. Interestingly, we found that both VMH and DMH, two hypothalamic nuclei critically involved in the regulation of energy balance, also exhibit reactive gliosis as evidenced by a significant increase in the area covered by GFAP-positive astrocytes and Iba1-positive microglia in association with microglia morphological changes. This is consistent with recent studies documenting that HFD-induced reactive gliosis may also occur outside the MBH notably in the PVN nucleus [54,55]. The effects of HFD consumption could be attributed, at least in part, to the augmentation of circulating levels of deleterious adipokines and proinflammatory cytokines originated from the adipose tissue[2-4]. Among these adipokines, resistin is considered as a potential link between obesity and insulin resistance/T2D [8,19,20]. This postulate is based on several data showing that plasma resistin levels are positively correlated to adipose tissue mass[23-26] and resistin treatment induced insulin resistance at the peripheral and hypothalamic levels [27-29,45,46]. So far resistin expression in the periphery has been extensively investigated whereas the brain resistin expression has attracted few attentions despite some studies reporting resistin expression in rodent hypothalamus [47]. Moreover, the role and the regulation of hypothalamic resistin expression are not documented, because the hypothalamic cell types expressing resistin are not yet characterized as well as their involvement in the hypothalamic inflammation. Here we show that LT-HFD consumption increases hypothalamic resistin mRNA expression especially within ARC, VMH and DMH hypothalamic nuclei. By focusing on MBH, we clearly show that resistin is strongly expressed in tanycytes and POMC neurons in response to LT-HFD, whereas astrocytes and microglia cells do not express resistin. Furthermore, the expression of resistin in the MBH is associated with neuronal injury as evidenced by the augmentation of Hsp72 immunostaining in cells expressing resistin in response to LT-HFD. These findings demonstrate that LT-HFD strongly increases hypothalamic inflammation associated to insulin resistance and increases resistin expression in tanycytes and POMC neurons that are respectively implicated in the transport [sensing] of metabolites and hormones from cerebrospinal fluid to the hypothalamus, and in the regulation of energy homeostasis [56,57]. Importantly, using primary culture of tanycytes we clearly show that resistin increases the expression of pro-inflammatory factors and this effect is TLR4-dependent. In addition, the overexposure of tanycytes to palmitate induces resistin expression. Thus, we demonstrate that resistin is able to directly increase tanycyte inflammation and that saturated fatty acids increase tanycyte resistin expression, this may alter tanycyte functions including their role in hormonal and energy uptake towards the hypothalamus as reported for leptin uptake [58]. This could also constitute an important mechanism underlying the HFD-induced impairment of the structural organization of  $\beta$ -tanycytes which are involved in maintaining the blood brain barrier integrity [59]. These changes have been found in response to LT-HFD, we also investigated the impact of ST-HFD on these events to see whether they develop early to initiate hypothalamic inflammation and subsequent metabolic disorders. Indeed, it has been reported that hypothalamic inflammation acutely develops within the first days of HFD contributing to insulin resistance and neuronal injuries [2,5,13]. These data highlight that hypothalamic inflammation may be a key component of the early onset of both neuronal and metabolic dysfunctions induced by HFD consumption [1,4,12], but nevertheless the implicated signaling pathways were not identified. As previously reported, we show that ST-HFD affects glucose and insulin tolerance associated with increased plasma levels of

insulin and glucose evidencing an insulin-resistant state. Importantly, ST-HFD-3d and ST-HFD-8d strongly increase gliosis evidenced by activated microglia cells and increased astrocyte immunostaining. These changes are accompanied by a transient increase of resistin mRNA in the MBH of ST-HFD-3d mice but not in ST-HFD-8d mice. The rapid upregulation of resistin gene expression in ST-HFD-3d mice suggests that resistin expression is rapidly induced to initiate MBH microglia activation that corresponds to the immune response to dietary excess, and then declines once this immunologic response initiated. However, when the mice were chronically fed with HFD, probably other mechanisms are implicated in the up-regulation of resistin in MBH notably sustained high levels of circulating saturate fatty acids as well as circulating proinflammatory cytokines originated from the periphery. It is also noteworthy, that the transient expression of resistin is located in tanycytes and POMC neurons as described in LT-HFD mice.

Consistent with our data demonstrating a positive correlation between hypothalamic resistin expression and inflammation in HFD mice, we investigated the direct effect of resistin in the hypothalamus through ICV injections. We show that ICV infusion of resistin for 3 days markedly increased hypothalamic gene expression of key proinflammatory markers (i.e., *IL-6*, *TNF $\alpha$*  and *IL1- $\beta$* ) in association with a significant upregulation of the hypothalamic levels of gliosis markers (i.e., *Cd68*, *Emr1*, *Icam-1*, *Iba-1* and *GFAP*). Accordingly, resistin-treated mice showed a marked increase of both Iba1 and GFAP staining in the MBH associated with significant changes in microglia morphology as a sign of MBH reactive gliosis. In peripheral tissues, ICV resistin treatment induces both liver and muscle inflammation as evidenced by the upregulation of key proinflammatory markers (i.e., *IL-6*, *TNF $\alpha$*  and *IL1- $\beta$* ). Interestingly we show that resistin ICV infusion did not affect the circulating levels of resistin suggesting an indirect action of resistin in peripheral tissues which is probably driven through vagal connections as previously suggested [42,45,46]. Furthermore, we demonstrate that resistin-dependent MBH gliosis and both hypothalamic and peripheral inflammation was completely abolished in TLR4-KO mice presenting further evidence for the critical role of TLR4 in mediating resistin actions.

In summary our findings demonstrate for the first time that both acute and chronic consumption of HFD increase hypothalamic endogenous expression of resistin especially within tanycytes and POMC neurons of the MBH, which positively correlates with HFD-induced hypothalamic inflammation. Interestingly, central resistin infusion promotes both hypothalamic inflammation and reactive gliosis through the activation of TLR4. These data suggest that, both tanycytes- and neurons-derived resistin may be a potential contributor of HFD-induced hypothalamic notably through their interaction with astrocytes and microglial cells. Therefore, further investigations are needed to establish the direct association between hypothalamic resistin levels, hypothalamic inflammation and related neuronal and metabolic dysfunctions in HFD fed mice.

## FIGURES LEGENDS

### **Figure 1 : Long-term HFD induces hypothalamic inflammation and gliosis and impairs whole body insulin sensitivity**

Male C57BL/6 mice were fed with chow diet or HFD for 8 weeks. Energy intake (a) and body weight gain (b) were measured daily. Visceral white adipose tissue mass was assessed at the end of the experimental period (c). Plasma levels of (d) adiponectin, (e) leptin, (f) insulin and (g) resistin were determined by ELISA. Mice were subjected to glucose (GTT) and insulin (ITT) tolerance test to evaluate insulin sensitivity (respectively h and i). Effect of 8 weeks of HFD feeding (red bars) on proinflammatory gene expression in mice (j) liver, (l) muscle and (n) hypothalamus compared with that in chow-fed controls (white bars). Effect of 8 weeks-HFD feeding on the expression of negative regulators of insulin signaling (Socs-3 and Ptp1b) in (k) liver, (m) muscle, (o) hypothalamus compared with that in chow-fed controls. Data are means±SEM (n = 3–6/group). Significant difference at \*P<0.05 \*\*P<0,01 and \*\*\* P<0,001 versus chow-fed controls.

### **Figure 2: HFD-induced hypothalamic inflammation and gliosis is associated with an increase of the endogenous expression of resistin in the hypothalamus.**

(a) Immunohistochemical detections of Iba1 (a microglial marker) and Gfap (astrocytes marker) proteins, from mice fed with chow diet or HFD for 8 weeks, throughout the MBH. Dashed areas separate the ARC, VMH and DMH nuclei. (b) Immunohistochemical detections of Iba1 and Gfap in the ARC of mice fed with chow or HFD for 8 weeks. The rectangles integrated to Iba1 staining images represent higher magnification views of microglia under chow (left) or HFD (right) conditions in order to show microglia's shape. (c) quantification of Iba1 mean intensity throughout the MBH of mice fed with chow or HFD for 8 weeks. (d) quantification of Gfap mean intensity throughout the MBH of mice fed with chow or HFD for 8 weeks. (e) quantification of microglia activation score in the ARC of mice fed with chow or HFD for 8 weeks. (f) Effect of 8 weeks-HFD feeding on astrocytes and microglial markers gene expression compared with that in chow-fed controls. (g) Immunohistochemical detection of Hsp72 and POMC in the ARC of mice fed with chow or HFD for 8 weeks. Arrows point both Hsp72 and POMC positive cells. (h) quantification of Hsp72 mean intensity in the ARC of mice fed with chow or HFD for 8-weeks (i) percentage of mice positive for both Hsp72 and POMC staining. (j) In-situ hybridization (ISH) detection of resistin gene expression (*Retn*) throughout the MBH of mice fed with chow or HFD for 8 weeks, dashed areas separate the ARC, VMH and DMH nuclei. (k) ISH detection of resistin expression in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 8 weeks. (l) Immunohistochemical detection of resistin in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 8 weeks. (m) Quantification of resistin pixel density (data in (j)) in the ARC, DMH and VMH of mice fed with chow or HFD for 8 weeks. (n) Quantification of resistin mean intensity (data in (l)) in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 8 weeks. (ARC : arcuate nucleus, VMH : ventro median hypothalamus, DMH : dorso median hypothalamus; 3V : third ventricle). Scale bar = 50µm. Data are means±SEM (n = 3–6/group). Significant difference at \*P<0.05 \*\*P<0,01 and \*\*\* P<0,001 versus chow-fed controls.

### **Figure 3 : Tanycytes and POMC neurons are resistin-expressing cells but not microglia and astrocytes. HFD increased resistin expression in tanycytes and POMC neurons.**

Detection of vimentin protein (a) (tanycytes marker) and POMC protein (b) with resistin gene expression (*Retn*) in the ARC of mice fed with chow diet or HFD diet for 8 weeks using combined



ISH/ICH (in situ hybridization and immunohistochemistry), dashed box represent higher magnification views (original magnification x20) of merged images. Arrows point tanycytes expressing resistin (a) and POMC neurons expressing resistin (b). Scale bar : 50µm. (c, d) Detection of Iba1 protein (c) and Gfap protein (d) with resistin gene expression (*Retn*) in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 8 weeks using combined ISH/ICH, images are shown in a higher magnification view (original magnification x20), scale bar : 25µm. Arrows show that there are no resistin gene expression in both microglia and astrocytes. (e) Detection of Hsp72 protein and resistin gene expression (*Retn*) in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 8 weeks using combined ISH/IHC scale bare : 50µm. Dashed box show a higher magnification view of merged image showed just right in (f) (original x20), arrows point POMC cells expressing resistin and positive for Hsp72 immunodetection. Scale bar 25µm. (g) Quantification of cells expressing both Hsp72 protein and resistin gene in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 8 weeks (data showed in percentage). (h) Quantification of cells expressing POMC protein and resistin gene in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 8 weeks (data showed in percentage). Data are means±SEM (n = 3–6/group). Significant difference at \*\*P<0,01 and \*\*\* P<0,001 versus chow-fed controls.

#### **Figure 4 : Resistin induces tanycytes inflammation through TLR4 receptor**

(a) Immunodetection of Vimentin (tanycytes marker) and resistin (left panel) and vimentin and TLR4 (right panel) in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 8 weeks. Dashed box show a higher magnification (original magnification x20) of merged image. (b) Quantification of TLR4 and Resistin mean intensity in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 8 weeks. (c) Serum deprived primary culture of rats tanycytes were incubated for 20 min with resistin (300ng/ml). Protein lysates from cells were subjected to western blot analysis. Membrane were probed sequentially with anti-p-ERK1/2 followed by anti b-actin. (d) Serum deprived primary culture of rats tanycytes subjected or not to si-TLR4 were treated for 20min with resistin (300ng/ml). Protein lysates from cells were subjected to western blot analysis Membrane were probed sequentially with anti-p-AKT and anti-p-ERK1/2 followed by anti b-actin. The proteins on the blots were revealed by ECL and bands quantified by densitometry. (e) and (f) Quantifications of blots shown in (c) and (d) respectively. (g) Effect of 4 hours resistin treatment on proinflammatory gene expression in primary culture of rats tanycytes. (h) Effect of 16 hours palmitate treatment on resistin expression in primary culture of rats tanycytes. Results are expressed as means±SEM (n=3-6/groups). Significant difference at \*P<0.05 \*\*P<0,01 and \*\*\* P<0,001 versus control.

#### **Figure 5 : Short-term HFD induces hypothalamic inflammation and gliosis and impairs whole body insulin sensitivity**

Male C57BL/6 mice were fed with chow diet or HFD for 3 and 8 days. Energy intake (a) and body weight gain (b) were daily measured. Subcutaneous fat mass (c) and visceral fat mass (d) were assessed at the end of the experimental period. (e) Mice were subjected to glucose tolerance test (GTT) to evaluate insulin sensitivity. Plasma levels of glucose (f) and insulin (g) were measured by ELISA in each groups. Effect of 3 and 8 days of HFD feeding on proinflammatory gene expression in mice muscle (h) and liver (i) compared with that in chow-fed controls. (j) Immunohistochemical detections of Iba1 and Gfap in the ARC of mice fed with chow or HFD for 3 and 8 days. The rectangles integrated to Iba1 staining images represent higher magnification views of microglia under chow and HFD conditions in order to show its shape. The third and last series of images represent detection of resistin expression using in situ hybridization in the ARC of mice fed with chow or HFD for 3 and 8 days. (N=5/groups) (k) Quantification of microglia activation score of mice fed with chow or HFD for 3 or 8 days. (l) quantification of gfap mean intensity in the ARC of mice fed with chow or HFD for 3 or 8 days. (m) Quantification of resistin gene expression in the ARC of mice fed with chow or HFD for 3 or 8 days. (n) Effect of 3 and 8 days of HFD feeding on proinflammatory gene expression in mice hypothalamus compared with that in chow-fed controls.

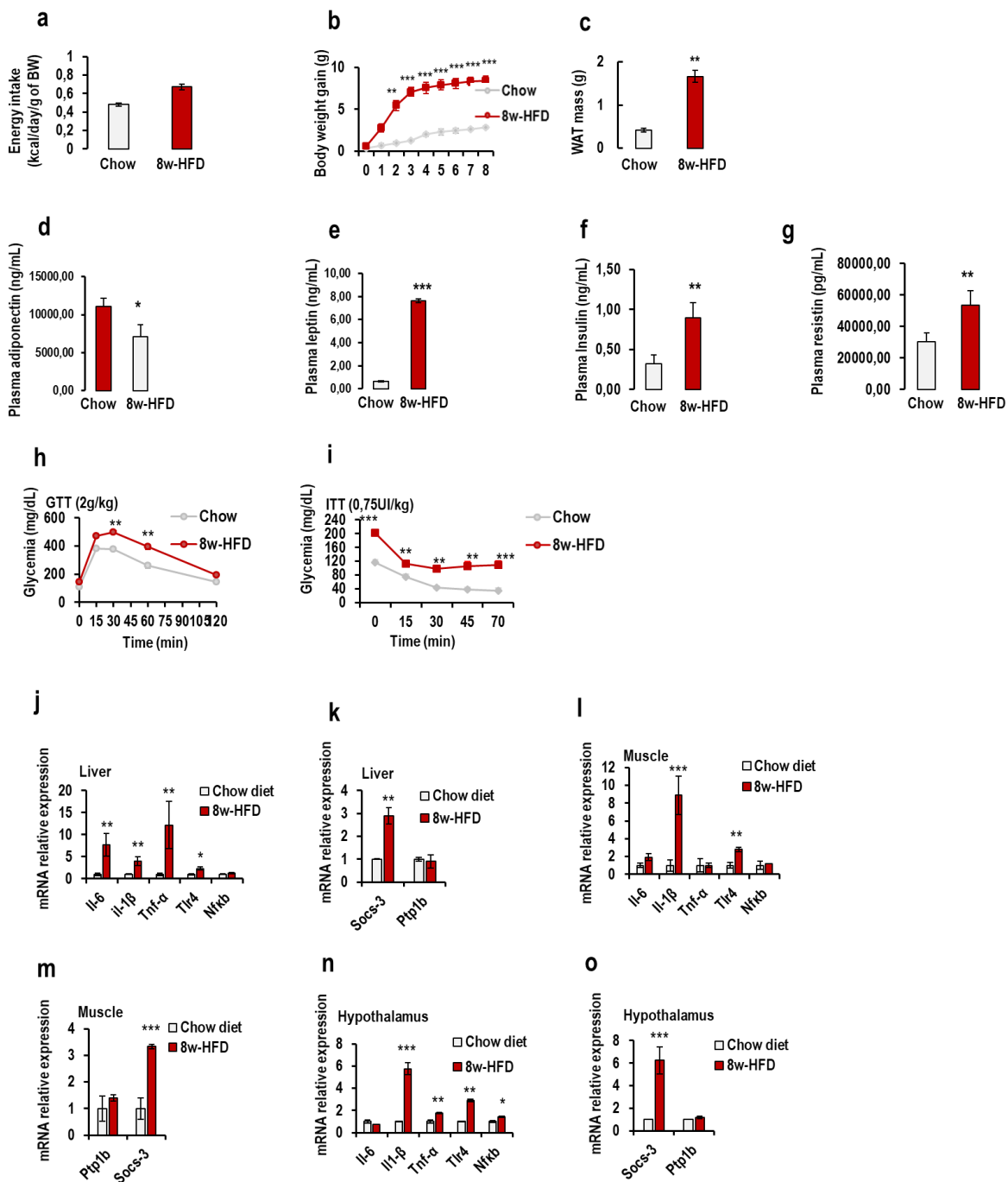
Data are means±SEM (n = 5/group). Significant difference at \*P<0.05 \*\*P<0,01 and \*\*\* P<0,001 versus chow-fed controls.

**Figure 6: Short-term HFD increases endogenous expression of resistin in hypothalamic tanycytes and POMC neurons**

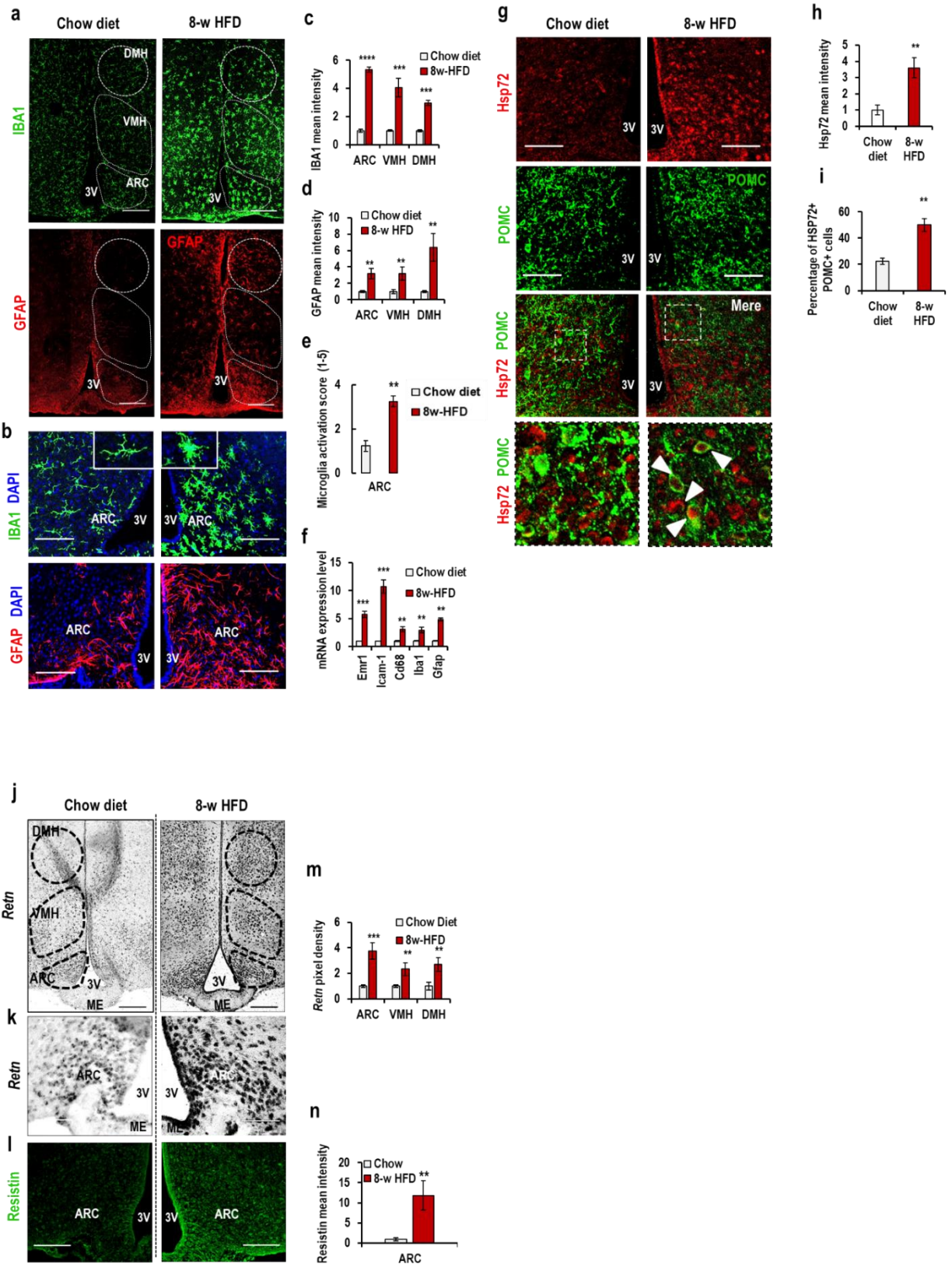
Detection of vimentin protein (a) (tanycytes marker) and POMC protein (b) with resistin gene expression in the ARC of mice fed with chow diet or HFD diet for 3 and 8 days using combined ISH/IHC (in situ hybridization and immunohistochemistry). In merge images, arrows point tanycytes (a) and POMC neurons (b) expressing resistin. Scale bar : 50µm. (c, d) Detection of Iba1 protein (c) and Gfap protein (d) with resistin gene expression in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 8 and 3 days using combined ISH/ICH, images are shown in a higher magnification view (original magnification x20), scale bar : 25µm. Arrows show that there are no resistin expression in both microglia and astrocytes. (e) Quantification of cells expressing POMC protein and resistin gene expression (*Retn*) in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 3 and 8 days (data showed in percentage). (f) Quantification of cells expressing vimentin protein and resistin gene expression (*Retn*) in the ARC of mice fed with chow diet or HFD for 3 and 8 days (data showed in percentage). Data are means±SEM (n = 3–6/group). Significant difference at \*\*P<0,01 and \*\*\* P<0,001 versus chow-fed controls.

**Figure 7: Central resistin infusion promotes hypothalamic inflammation and reactive gliosis through TLR4**

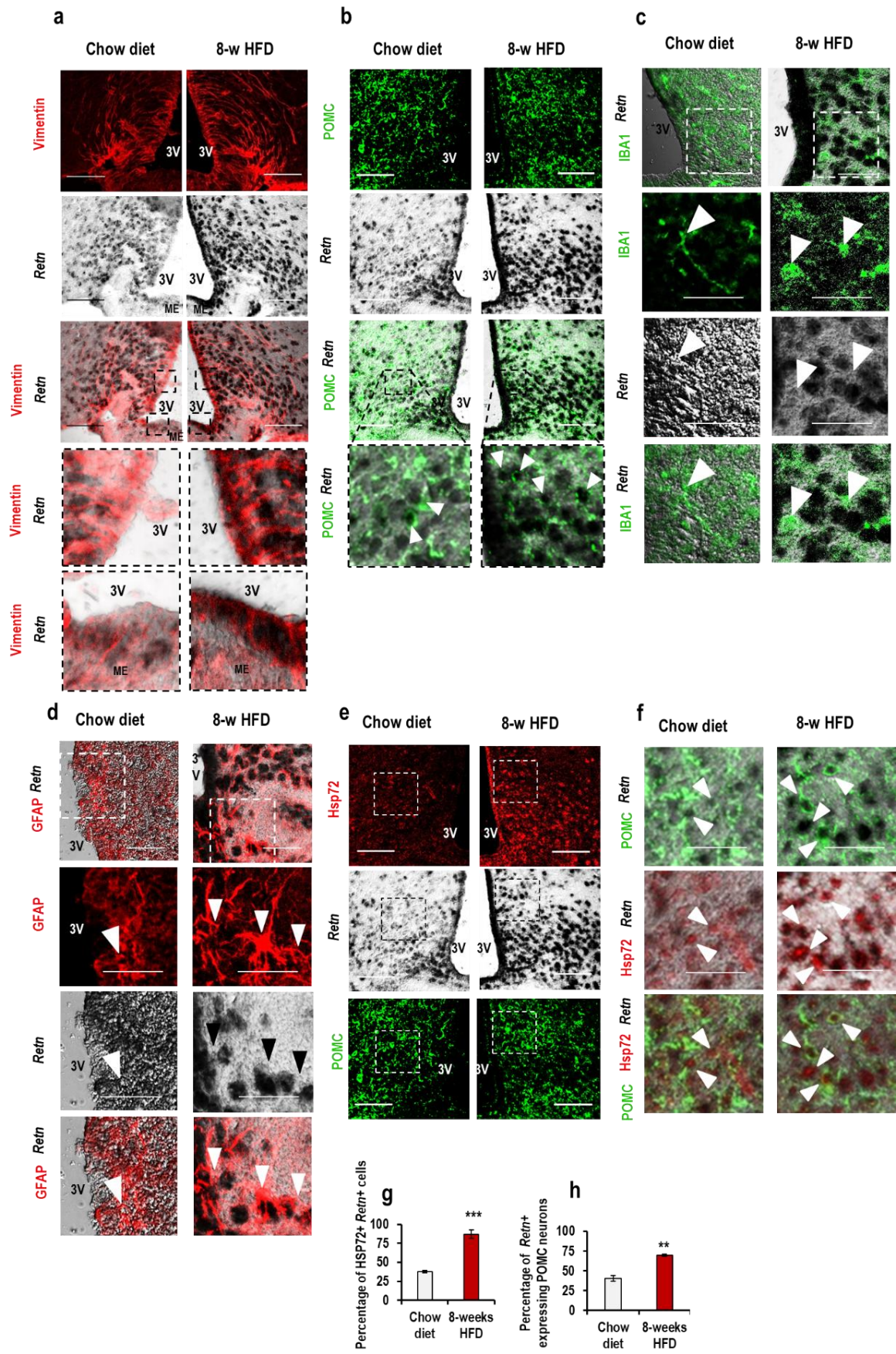
Wild type male C57BL/6J mice and TLR4<sup>-/-</sup> mice received or not an infusion of recombinant human resistin in the lateral cerebral ventricle for 3 days.(a) Immunohistochemical detections of Iba1 and Gfap in the ARC of wild type and TLR4<sup>-/-</sup> mice that received or not 3-days ICV of resistin. The rectangles integrated to Iba1 staining images from ARC of wild type mice represent higher magnification views of microglia in order to determine the effect of ICV resistin on microglia shape. Effect of 3 daysICV resistin treatment on proinflammatory and gliosis markers gene expression in wild-type (b) and TLR4<sup>-/-</sup> mice (c) hypothalamus compared with that in vehicle treated control. Effect of 3 daysICV resistin treatment on proinflammatory gene expression in wild-type (d) and TLR4<sup>-/-</sup>(f) mice liver. Effect of 3 daysICV resistin treatment on proinflammatory gene expression in wild-type (e) and TLR4<sup>-/-</sup>(g) mice muscle compared with that in vehicle treated control. (h) Serum level of resistin in wild type mice that received ICV resistin for 3-days (in ng/dl). Data are means±SEM (n = 3/group). Significant difference at \*P<0.05 \*\*P<0,01 and \*\*\* P<0,001 versus chow-fed controls.



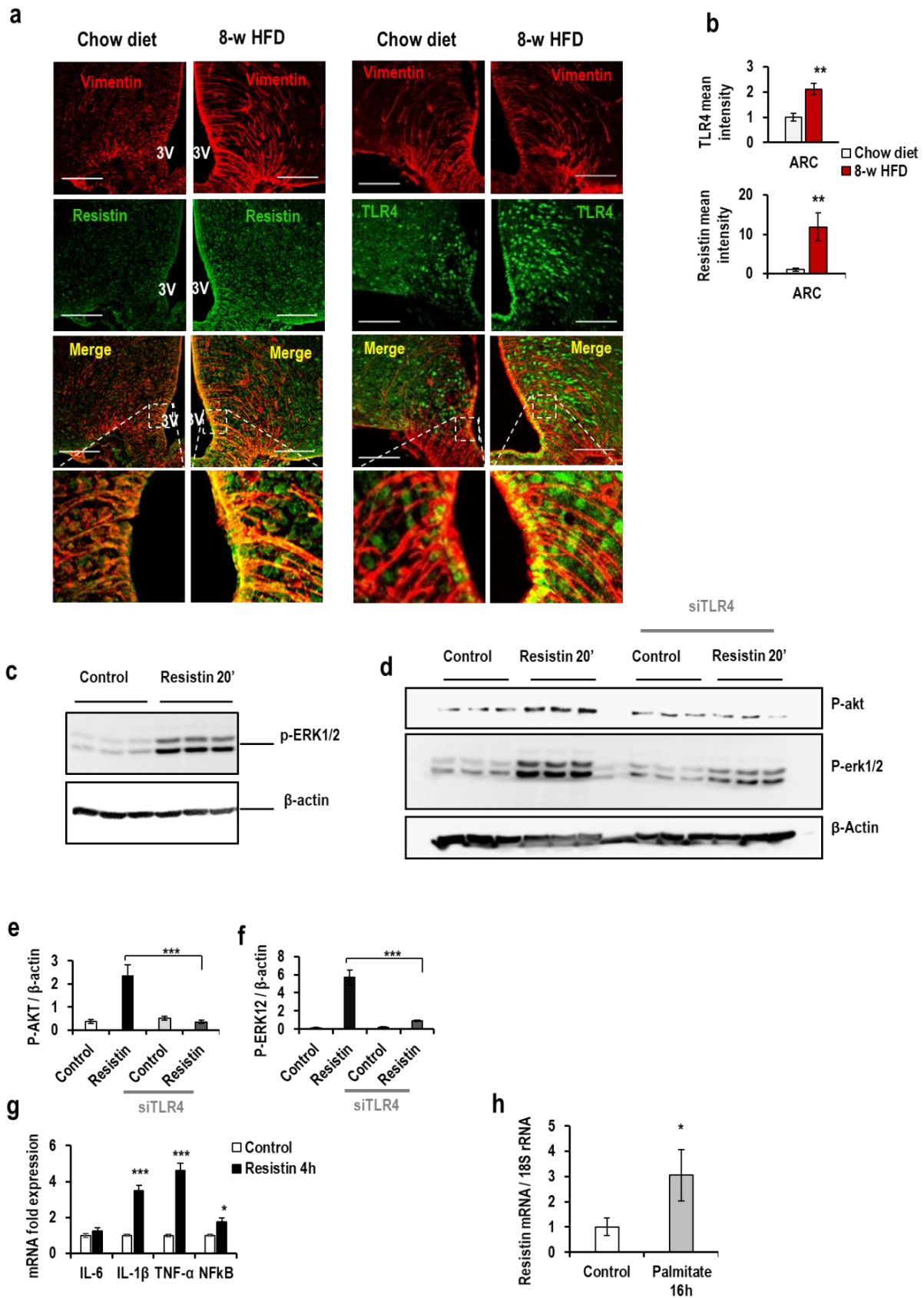
**Fig.1**



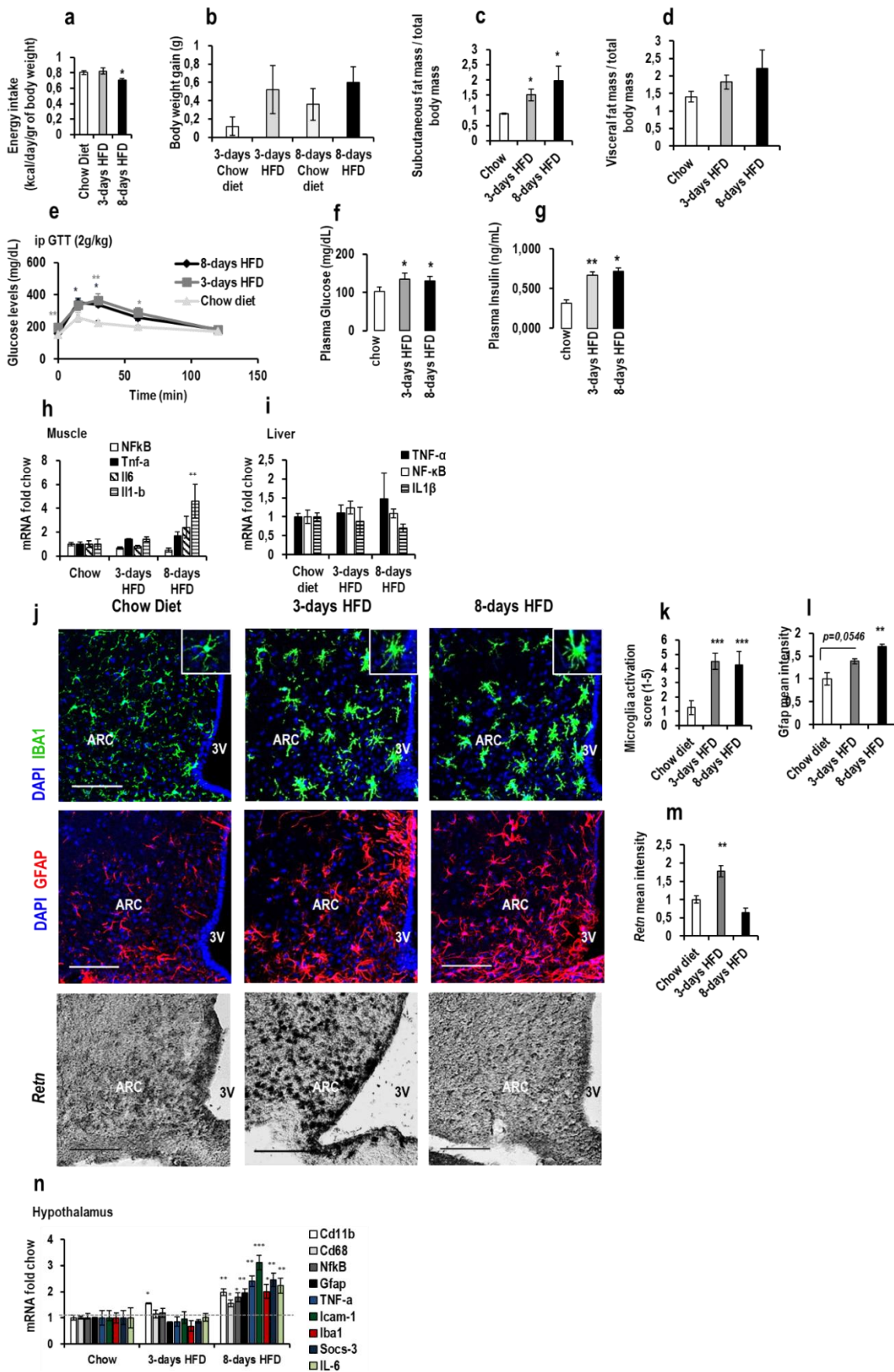
**Fig.2**



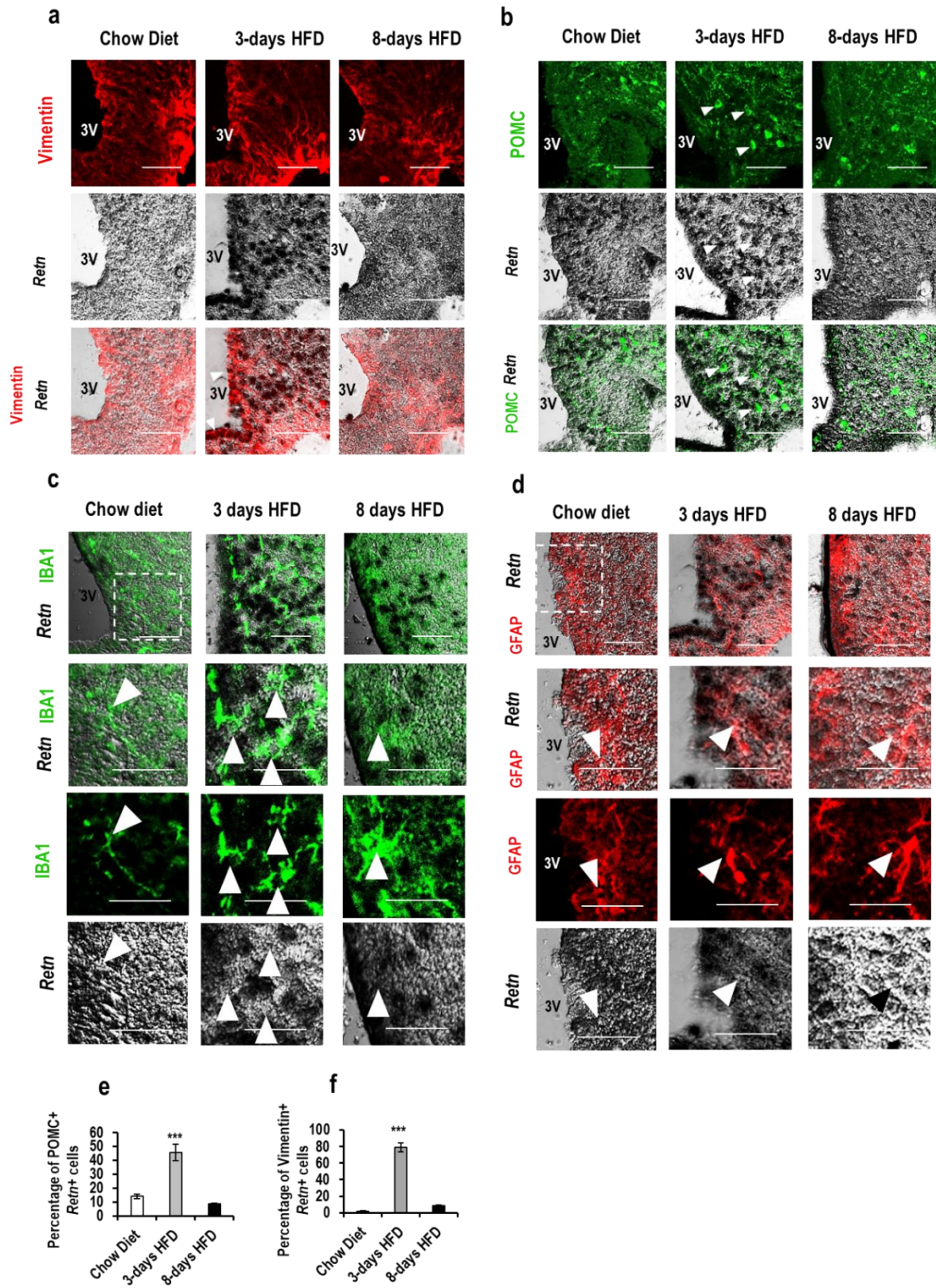
**Fig.3**



**Fig.4**

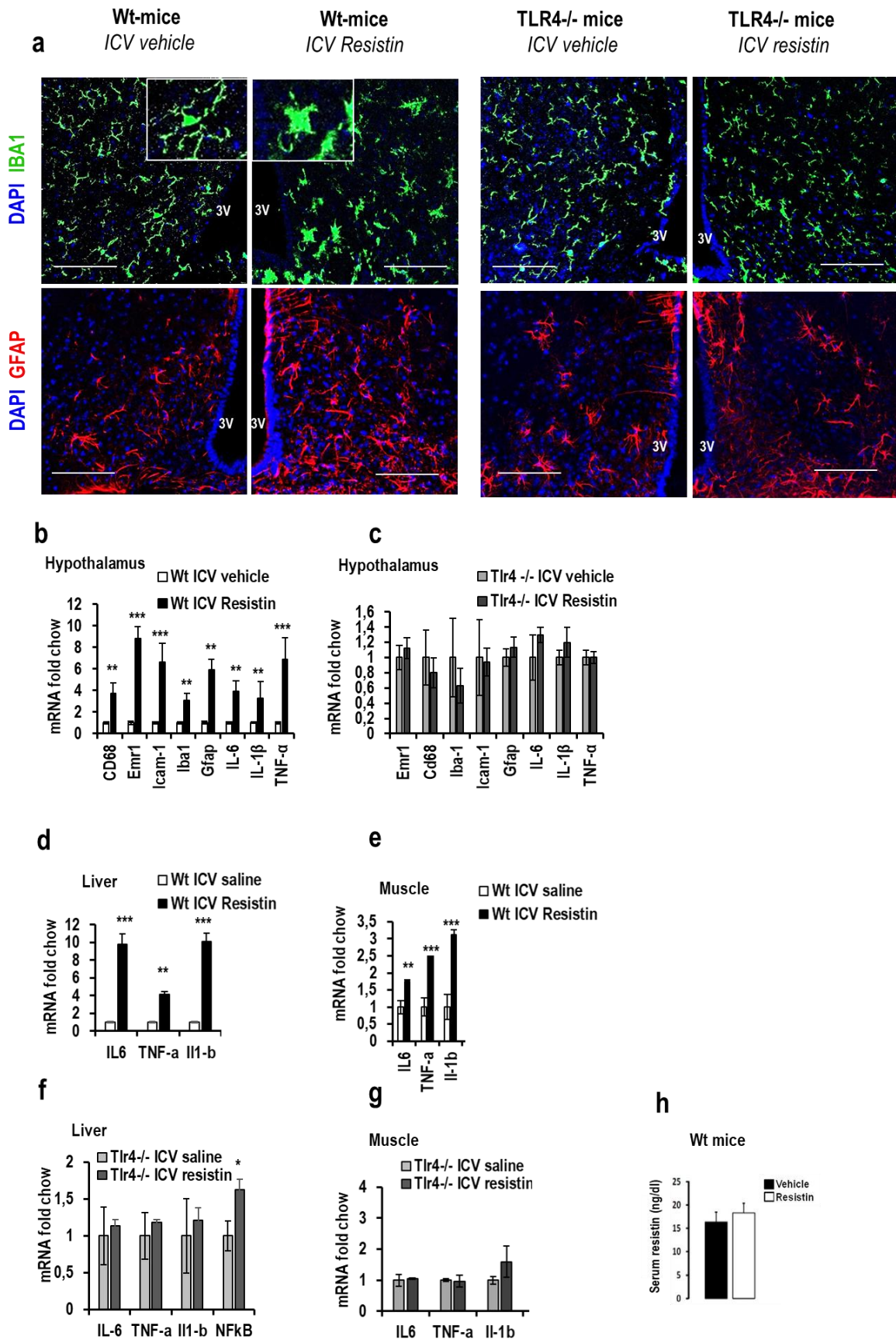


**Fig.5**



**Fig.6**





**Fig.7**

## References.

- [1] Thaler JP, Schwartz MW. Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology*. (2010) 151:4109–15. doi: 10.1210/en.2010-0336.
- [2] Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. (2000) 106:473–81. doi: 10.1172/JCI10842.
- [3] Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. (2003) 112:1785–8. doi: 10.1172/JCI20514.
- [4] Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. (2011) 29:415–45. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322.
- [5] De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. (2005) 146:4192–9. doi: 10.1210/en.2004-1520
- [6] Irani BG, Dunn-Meynell AA, Levin BE. Altered hypothalamic leptin, insulin, and melanocortin binding associated with moderate-fat diet and predisposition to obesity. *Endocrinology*. (2007) 148:310–6. doi: 10.1210/en.2006-1126
- [7] Könner AC, Klöckener T, Brüning JC. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiol Behav*. (2009) 97:632–8. doi: 10.1016/j.physbeh.2009.03.027
- [8] Belgardt BF, Brüning JC. CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Ann N Y Acad Sci*. (2010) 1212:97–113. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05799.x
- [9] Horvath TL, Bruning JC. Developmental programming of the hypothalamus: a matter of fat. *Nat Med*. (2006) 12:52–3. doi: 10.1038/nm0106-52
- [10] Vogt MC, Paeger L, Hess S, Steculorum SM, Awazawa M, Hampel B, et al. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell*. (2014) 156:495–509. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.008
- [11] Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, Poston L, et al. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS ONE*. (2009) 4:e5870. doi: 10.1371/journal.pone.0005870
- [12] Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*. (2009) 29:359–70. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2760-08.2009
- [13] Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. (2012) 122:153–62. doi: 10.1172/JCI59660
- [14] Rahman MH, Kim MS, Lee IK, Yu R, Suk K. Interglial Crosstalk in Obesity-Induced Hypothalamic Inflammation. *Front Neurosci*. 2018 Dec 13;12:939. doi: 10.3389/fnins.2018.00939.
- [15] Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*. [2010] 72:219–46. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135846
- [16] Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, et al. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-g action in humans. *Diabetes*. (2001) 50:2199–202. doi: 10.2337/diabetes.50.10.2199
- [17] Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun*. (2003) 300:472–6. doi: 10.1016/S0006-291X[02]02841-3.

- [18] Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. (2001) 409:307–12. doi: 10.1038/35053000.
- [19] Codoñer-Franch P, Alonso-Iglesias E. Resistin: insulin resistance to malignancy. *Clin Chim Acta*. (2015) 438:46–54. doi: 10.1016/j.cca.2014.07.043.
- [20] Pine GM, Batugedara HM, Nair MG. Here, there and everywhere: resistin-like molecules in infection, inflammation, and metabolic disorders. *Cytokine*. (2018) 110:442–51. doi: 10.1016/j.cyto.2018.05.014.
- [21] Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, et al. Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-g action in humans. *Diabetes*. (2001) 50:2199–202. doi: 10.2337/diabetes.50.10.2199
- [22] Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun*. (2003) 300:472–6. doi: 10.1016/S0006-291X(02)02841-3
- [23] McTernan PG, Kusminski CM, Kumar S. Resistin. *Curr Opin Lipidol*. (2006) 17:170–5. doi: 10.1097/01.mol.0000217899.59820.9a
- [24] Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J*. (2000) 19:4046–55. doi: 10.1093/emboj/19.15.4046
- [25] Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA, Rader DJ. Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation*. (2005) 111:932–9. doi: 10.1161/01.CIR.0000155620.10387.43
- [26] Nogueiras R, Gualillo O, Caminos JE, Casanueva FF, Diéguez C. Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res*. (2003) 11:408–14. doi: 10.1038/oby.2003.55
- [27] Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. *J Clin Invest*. (2003) 111:225–30. doi: 10.1172/JCI16521
- [28] Pravenec M, Kazdova L, Landa V, Zidek V, Mlejnek P, Jansa P, et al. Transgenic and recombinant resistin impair skeletal muscle glucose metabolism in the spontaneously hypertensive rat. *J Biol Chem*. (2003) 278:45209–15. doi: 10.1074/jbc.M304869200
- [29] Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM. Adenovirus-mediated chronic “hyper-resistinemia” leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest*. (2004) 114:224–31. doi: 10.1172/JCI200420785
- [30] Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, et al. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. (2004) 114:232–9. doi: 10.1172/JCI200421270
- [31] Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, et al. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science*. (2004) 303:1195–8. doi: 10.1126/science.1092341
- [32] Qi Y, Nie Z, Lee Y-S, Singhal NS, Scherer PE, Lazar MA, et al. Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes*. (2006) 55:3083–90. doi: 10.2337/db05-0615
- [33] Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol*. (2005) 174:5789–95. doi: 10.4049/jimmunol.174.9.5789
- [34] Johnson AM, Olefsky JM. The origins and drivers of insulin resistance. *Cell*. (2013) 152:673–84. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.041
- [35] Schwartz DR, Lazar MA. Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends Endocrinol Metab*. (2011) 22:259–65. doi: 10.1016/j.tem.2011.03.005

- [36] Silswal N, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ghosh S, Ehtesham NZ. Human resistin stimulates the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NFkappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* (2005) 334:1092–101. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.202.
- [37] Al Hannan F, Culligan KG. Human resistin and the RELM of Inflammation in diabetes. *Diabetol Metab Syndr.* (2015) 7:54. doi: 10.1186/s13098-015-0050-3
- [38] Nogueiras R, Gualillo O, Caminos JE, Casanueva FF, Dié'guez C. Regulation of resistin by gonadal, thyroid hormone, and nutritional status. *Obes Res.* 2003; 11:408–414.
- [39] Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur. J. Endocrinol.* 2003; 149:331–335.
- [40] Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gómez JM, Gutiérrez C, Simón I, Soler J, Richart C. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes. Res.* 2004; 12:962–971.
- [41] Tovar S, Nogueiras R, Tung LY, Castaneda TR, Vázquez MJ, Morris A, et al. Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur J Endocrinol.* [2005) 153:R1–5. doi: 10.1530/eje.1.01999
- [42] Muse ED, Lam TK, Scherer PE, Rossetti L. Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance. *J Clin Invest.* (2007) 117:1670–8. doi: 10.1172/JCI30440
- [43] Vázquez MJ, González CR, Varela L, Lage R, Tovar S, Sangiao-Alvarellos S, et al. Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology.* (2008) 149:4534–43. doi: 10.1210/en.2007-1708
- [44] Singhal NS, Lazar MA, Ahima RS. Central resistin induces hepatic insulin resistance via neuropeptide Y. *J Neurosci.* (2007) 27:12924–32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2443-07.2007
- [45] Benomar Y, Gertler A, De Lacy P, Crépin D, Hamouda HO, Riffault L, et al. Central resistin overexposure induces insulin resistance through toll-like receptor 4. *Diabetes.* (2013) 62:102–14. doi: 10.2337/db12-0237
- [46] Benomar Y, Amine H, Crépin D, Al Rifai S, Riffault L, Gertler A, et al. Central resistin/TLR4 impairs adiponectin signaling contributing to insulin and FGF21 resistance. *Diabetes.* (2016) 65:913–26. doi: 10.2337/db15-1029
- [47] Wilkinson M, Wilkinson D, Wiesner G, Morash B, Ur, E. Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone. *Neuroendocrinology.* 2005; 81:19–30.
- [48] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* (2006) 444:860–7. doi: 10.1038/nature05485
- [49] de Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett.* (2008) 582:97–105. doi: 10.1016/j.febslet.2007.11.057
- [50] Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* (2011) 121:2111–7. doi: 10.1172/JCI57132
- [51] Jais A, Brüning JC. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J Clin Invest.* (2017) 127:24–32. doi: 10.1172/JCI88878
- [52] Valdearcos M, Xu AW, Koliwad SK. Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function. *Annu Rev Physiol.* (2015) 77:131–60. doi: 10.1146/annurev-physiol-021014-071656
- [53] Kálin S, Heppner FL, Bechmann I, Prinz M, Tschöp MH, Yi CX. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. *Nat Rev Endocrinol.* (2015) 11:339–51. doi: 10.1038/nrendo.2015.48
- [54] de Kloet AD, Pioquinto DJ, Nguyen D, Wang L, Smith JA, Hiller H, Sumners C. Obesity

- induces neuroinflammation mediated by altered expression of the renin-angiotensin system in mouse forebrain nuclei. *Physiol Behav.* 2014 Sep;136:31-8. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.01.016.
- [55] Buckman LB, Thompson MM, Moreno HN, Ellacott KL. Regional astrogliosis in the mouse hypothalamus in response to obesity. *J Comp Neurol.* 2013 Apr 15;521(6):1322-33. doi: 10.1002/cne.23233.
- [56] Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V., and Dehouck, B. (2010). Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 518, 943–962. doi: 10.1002/cne.22273
- [57] Rahman, M. H., Bhusal, A., Lee, W. H., Lee, I. K., and Suk, K. (2018). Hypothalamic inflammation and malfunctioning glia in the pathophysiology of obesity and diabetes: translational significance. *Biochem. Pharmacol.* 153, 123–133. doi: 10.1016/j.bcp.2018.01.024
- [58] Balland E, Dam J, Langlet F, Caron E, Steculorum S, Messina A, et al. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab.* 2014 Feb 4;19(2):293-301. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.015.
- [59] Ramalho, A. F., Bombassaro, B., Dragano, N. R., Solon, C., Morari, J., Fioravante, M., et al. (2018). Dietary fats promote functional and structural changes in the median eminence blood/spinal fluid interface-the protective role for BDNF. *J. Neuroinflammation* 15:10. doi: 10.1186/s12974-017-1046-8 (9)

# RESULTATS EXPERIMENTAUX

**Le régime HFD de long terme provoque, comme attendu, une inflammation hypothalamique, une gliose réactionnelle et une altération de la sensibilité générale à l'insuline :**

Dans un premier temps, nous observons comme attendu, que la consommation d'un régime HFD pendant 8 semaines provoque une augmentation significative du poids corporel, de la prise alimentaire et de la masse grasse des souris. De même, les souris soumises au régime HFD présente une intolérance au glucose et une insulino-résistance, contrairement au souris ayant consommé un régime standard. Par ailleurs, nous avons évalué l'expression génique des marqueurs de l'inflammation dans les principaux tissus insulino-sensibles et nous montrons que le régime HFD de long terme provoque une augmentation de l'expression hépatique des cytokines pro inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) ainsi que du récepteur de l'immunité innée TLR4. Dans le muscle, nous observons une augmentation de l'expression génique de l'IL-1 $\beta$  ainsi que du récepteur TLR4. Au sein de ces deux tissus, on note une augmentation de l'expression de Socs-3, connu pour réguler négativement la voie de l'insuline. En parallèle des modifications observées en périphérie, nous montrons comme attendu que la consommation du régime HFD pendant 8 semaines provoque une importante réponse inflammatoire au niveau hypothalamique. En effet, nos résultats montrent une augmentation de l'expression génique des principaux marqueurs de l'inflammation (TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ , NF $\kappa$ B, TLR4) ainsi que des marqueurs microgliaux (CD68, Emr1, Iba1) et du marqueur astrocytaire GFAP. En outre, les analyses par immunohistochimie montrent que les souris soumises au régime HFD présentent une gliose réactionnelle évidente qui se caractérise par un recrutement accru de microglie et d'astrocytes au sein des noyaux ARC, VMH et DMH. Par ailleurs, nous montrons qu'en réponse au régime HFD, les cellules microgliales de l'ARC présentent une forme activée, amiboïde, témoignant d'une importante activité inflammatoire et phagocytaire.

**Le régime HFD de long terme induit une augmentation de l'expression endogène de la résistine dans l'hypothalamus :**

Les médiateurs et les voies de signalisations impliqués dans l'installation de l'inflammation hypothalamique ne sont pas totalement élucidées. Chez les rongeurs, de nombreux travaux ont mis en évidence un rôle causal de la résistine dans l'établissement

de l'inflammation et de l'insulino-résistance induites par le régime HFD. Bien que majoritairement produite par le tissu adipeux, des études montrent que la résistine est également exprimée dans l'hypothalamus. Toutefois, la distribution cellulaire de la résistine hypothalamique et la régulation de son expression hypothalamique par le régime HFD demeurent encore inconnues à ce jour. Au cours de nos investigations, nous nous sommes focalisés sur l'hypothalamus médio-basal (MBH), une région clé de l'hypothalamus impliquée de façon majeure dans la régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique. De façon intéressante, nos résultats montrent pour la première fois, que le régime HFD de 8 semaines provoque une augmentation significative de l'expression de la résistine dans les noyaux hypothalamiques ARC, VMH et DMH. Nous montrons que cette augmentation a principalement lieu au sein des tanocytes et des neurones POMC. En revanche, aucune expression de la résistine n'a été détectée dans les cellules microgliales ni dans les astrocytes de l'hypothalamus médiobasal. Par ailleurs, il a précédemment été montré que le régime HFD provoque d'importantes lésions neuronales, en particulier au sein des neurones anorexigènes POMC. En accord avec ces résultats, nous montrons que l'augmentation de l'expression de la résistine dans les neurones POMC en réponse au régime HFD s'accompagne d'une forte expression de la protéine Hsp72, témoignant de lésions neuronales possibles. Récemment, nous avons mis en évidence que la résistine exerce son action pro inflammatoire au niveau central via le récepteur TLR4. Par ailleurs, les résultats des analyses immunohistochimiques montrent que la résistine et son récepteur TLR4 sont exprimés dans le noyau arqué (ARC) de l'hypothalamus en particulier dans les tanocytes bordant le troisième ventricule. L'expression de ces deux protéines est fortement augmentée en réponse au régime HFD à la fois dans l'ARC et les tanocytes. Les tanocytes représente une population cellulaire dont l'intégrité est cruciale pour le maintien de l'homéostasie énergétique. Ces observations suggèrent que la résistine peut potentiellement exercer son action au sein des tanocytes et qu'elle pourrait être potentialisée au cours de l'obésité.

#### **La résistine induit l'inflammation dans les tanocytes via son récepteur TLR4 :**

Nos résultats obtenus sur les cultures primaires de tanocytes montrent que le traitement par la résistine provoque une augmentation de la phosphorylation de Akt et de ERK1/2 et aboutit à l'augmentation de l'expression du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et des principales cytokines pro inflammatoires. Le traitement par la résistine n'a aucun effet

sur les tanycytes ayant reçu le si-TLR4, suggérant que la résistine agit via le récepteur TLR4 afin de promouvoir son action pro inflammatoire dans les tanycytes. De même, le traitement des tanycytes par le palmitate, un acide gras saturé qui mime le régime HFD, provoque une augmentation de l'expression de la résistine par les tanycytes ; ces résultats viennent confirmer ceux obtenus *in vivo*, chez la souris.

**Le régime HFD de court terme induit une inflammation hypothalamique, une altération de la sensibilité à l'insuline et est associé à une augmentation de l'expression génique de la résistine dans les tanycytes et les neurones POMC de l'ARC :**

Afin de déterminer si la résistine est impliquée dans l'inflammation hypothalamique associée à la consommation d'un régime hyper lipidique de court terme, des souris C57Bl6/J âgées de 8 semaines ont été divisées en trois groupes et soumises soit à un régime standard soit à un régime HFD de 3 jours ou 8 jours. Nous montrons que dès 3 jours de régime HFD, les souris présentent une intolérance au glucose qui est maintenue au bout de 8 jours, et qui s'accompagne d'une augmentation des niveaux plasmatiques d'insuline suggérant l'installation d'une résistance systémique à l'insuline. De même, nos résultats montrent comme attendu, que 3 jours de régime HFD sont suffisants pour induire une gliose réactionnelle du noyau arqué qui est toujours maintenue après 8 jours de régime HFD. On observe également au bout de 8 jours de régime HFD, une importante augmentation de l'expression génique des principaux marqueurs de l'inflammation ainsi que du marqueur astrocytaire GFAP et des marqueurs microgliaux (IBA1, Emr1, CD68, CD11b) au niveau hypothalamique. De façon très intéressante, nous montrons par hybridation *in situ* que l'expression génique de la résistine est rapidement augmentée en réponse au régime HFD de 3 jours. En effet, la quantification révèle une augmentation d'un facteur proche de 2 dans l'ARC au bout de 3 jours de HFD alors qu'elle est atténuée au niveau basal après 8 jours de régime HFD. Nos résultats d'hybridation *in situ* combinée à l'immunohistochimie (ISH/IHC) montrent que, comme pour le régime HFD de 8 semaines, l'augmentation de l'expression de la résistine a lieu spécifiquement dans des tanycytes et des neurones POMC de l'hypothalamus médiobasal. Aucune expression n'a été détectée dans les astrocytes et la microglie. Ces résultats montrent ainsi que l'expression de la résistine hypothalamique est augmentée de façon très précoce en réponse au régime HFD et suggèrent sa potentielle implication dans la mise en place l'inflammation hypothalamique induite par le régime HFD et des conséquences



métaboliques qui lui sont associées.

### **L'infusion centrale de résistine induit, via TLR4, une inflammation hypothalamique associée à une gliose réactionnelle de l'ARC :**

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons analysé l'impact d'une perfusion centrale de résistine sur le développement de l'inflammation hypothalamique. Des souris CR7BL6/J sauvages (wt) ou invalidées pour le récepteur TLR4 (TLR4<sup>-/-</sup>) ont été soumises à une infusion intracérébroventriculaire (ICV) de résistine humaine recombinante ou de sérum physiologique pendant 3 jours. De façon très intéressante, nous montrons que l'ICV de résistine provoque chez les souris sauvages une importante réponse inflammatoire au niveau hypothalamique qui s'associe à une gliose réactionnelle évidente au sein du noyau arqué. En effet, la perfusion centrale de résistine provoque, au niveau hypothalamique, une augmentation de l'expression génique des marqueurs pro inflammatoires (IL6, TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , NFkB) ainsi que des marqueurs microgliaux (Cd11b, Cd68, Emr1, Icam1, Iba1) et astrocytaires (Gfap). Nos résultats d'immunohistochimie montrent une mobilisation astrocytaire et un recrutement microglial associés à une activation morphologique de la microglie, rappelant fortement la gliose réactionnelle associée au régime HFD. D'autre part, l'administration centrale de la résistine induit, chez les souris contrôles, une importante augmentation de l'expression génique des cytokines proinflammatoires et du facteur de transcription NFkB dans le muscle et le foie. De façon intéressante, l'ICV résistine n'affecte pas les niveaux plasmatiques de la résistine, ceci suggère une action indirecte de la résistine au niveau des tissus périphériques via une communication vagale. Pour vérifier l'implication du récepteur TLR4 dans la médiation des effets centraux de la résistine, nous avons étudié l'impact de la perfusion ICV de résistine sur des souris invalidées pour le récepteur TLR4. De façon intéressante, nos résultats montrent que l'inactivation de l'expression de TLR4 abolit totalement l'effet de la résistine sur l'inflammation hypothalamique et la gliose réactionnelle du noyau arqué ainsi que sur l'inflammation périphérique observée dans le foie et les muscles. Ces résultats apportent de nouveaux arguments en faveur du rôle crucial de TLR4 dans la médiation des effets de la résistine au niveau hypothalamique.

---

# DISCUSSION

---

L'inflammation hypothalamique associée au régime hyper lipidique et à l'obésité est au cœur d'intenses recherches et a été largement décrite dans des modèles rongeurs d'obésité (De Souza et al., 2005 ; Thaler et al., 2010 ; Kleinridders et al., 2009 ; Milanski et al., 2009 ; Zhang et al., 2008 ; Thaler et al., 2012 ; Posey et al., 2009). Toutefois, les mécanismes qui sous-tendent l'installation de cette inflammation et les médiateurs impliqués restent à élucider. Au cours de ce travail, nous avons étudié le rôle potentiel de la voie résistine/TLR4 dans l'installation de l'inflammation hypothalamique associée à la consommation d'un régime hyper lipidique. L'hypothèse selon laquelle la résistine serait un médiateur de l'inflammation hypothalamique n'a jamais été investiguée dans la littérature et a fait l'objet de cette thèse. Les résultats que nous avons obtenus constituent de solides arguments en faveur d'un rôle causal de la résistine dans l'installation de cette inflammation.

Tout d'abord, nous montrons, comme attendu, que la consommation d'un régime hyper lipidique (HFD) pendant 8 semaines déclenche une inflammation hypothalamique qui s'accompagne d'une importante réponse gliale à travers l'hypothalamus médio basal. Ces résultats sont en accord avec la littérature (De Souza et al., 2005 ; Milanski et al. 2009 ; Thaler et al., 2012 ; Kloet et al., 2014). Les médiateurs et les voies de signalisations impliqués dans l'installation de cette neuro inflammation hypothalamique ne sont pas totalement élucidés. Chez les rongeurs, la résistine est associée à l'inflammation et à l'insulino-résistance en réponse à l'obésité et au régime HFD (Savage et al., 2001 ; Patel et al., 2003 ; Stepan et al., 2001 ; Silha et al., 2003 ; Vendrell et al., 2004). Bien que majoritairement produite par le tissu adipeux (Stepan et al., 2001), il a été montré que la résistine est également exprimée par l'hypothalamus (Wilkinson et al., 2005). Toutefois, la distribution cellulaire de la résistine dans l'hypothalamus et la régulation de son expression par le régime HFD demeurent inconnues à ce jour. Au cours de nos investigations, nous nous sommes focalisés sur l'hypothalamus médio-basal, une région clé de l'hypothalamus impliquée de façon majeure dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique ainsi que dans l'inflammation hypothalamique induite par le régime HFD (De Souza et al., 2005 ; Milanski et al. 2009 ; Thaler et al., 2012 ; Kloet et al., 2014). De façon très intéressante, nous montrons pour la première fois, que la consommation du régime HFD pendant 8 semaines provoque une augmentation de l'expression génique de la résistine au sein des noyaux ARC, VMH et DMH qui sont le siège d'une réponse gliale importante ; suggérant un rôle possible de la résistine dans l'induction de cette inflammation. En effet, il est clairement démontré chez les rongeurs et chez l'homme que la résistine présente une

action pro inflammatoire (Silha et al., 2003, Patel et al., 2003). Notre équipe a de même démontré que la résistine agit, via TLR4, les voies de l'inflammation au niveau central (Benomar et al., 2013).

Les neurones de l'ARC sont qualifiés de neurones de premier ordre et sont primordiaux dans la régulation de l'homéostasie énergétique, il est bien connu qu'ils sont négativement affectés en réponse à la consommation d'un régime hyper lipidique (Moraes et al., 2009 ; Thaler et al., 2012). En particulier, il a été montré que les neurones POMC subissent, en réponse à un régime HFD de long terme, diverses lésions qui conduisent à une baisse de leur nombre, ce qui favorise l'apparition de résistances centrales à la leptine et à l'insuline (Thaler et al., 2012). Par ailleurs, Wilkinson et ses collaborateurs ont précédemment démontré par immunohistochimie la co-localisation de la résistine avec l'alpha-MSH (un marqueur des neurones POMC) mais n'ont jamais investigué si cette co-localisation était due à une expression de résistine propre aux neurones POMC, ou à une simple accumulation de la résistine périphérique au sein de ces neurones (Wilkinson et al., 2005). Dans cette étude, nous montrons pour la première fois que les neurones POMC du noyau arqué expriment la résistine. De façon intéressante, cette expression est positivement régulée par le régime hyper lipidique de long terme et s'associe à l'expression de la protéine Hsp72 témoignant de lésions neuronales. Nos résultats suggèrent l'implication potentielle de la résistine hypothalamique dans les lésions des neurones POMC observées en réponse au régime HFD (Thaler et al., 2012).

Les tanocytes sont des cellules gliales spécialisées bordant le troisième ventricule dans l'hypothalamus tubéral, ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions dont l'équilibre de la balance énergétique (Balland et al., 2014 ; Lee et al., 2012), et assurent la fonction de barrière hémato-encéphalique au niveau des organes circumventriculaires (OCV) dont fait partie l'éminence médiane. De façon très intéressante, nous montrons pour la première fois que les tanocytes expriment la résistine et que le régime HFD de long terme provoque une augmentation de cette expression génique. De même, nos résultats d'immunohistochimie montrent que la consommation d'un régime HFD de 8 semaines provoque une augmentation de l'expression protéique de la résistine et de son récepteur TLR4 dans les tanocytes. Il semblerait ainsi qu'au cours de l'obésité, la voie résistine/TLR4 y soit potentialisée. En accord avec ces résultats, nous montrons, sur des cultures primaires de tanocytes de rats, que la résistine, via l'activation de son récepteur TLR4, induit une inflammation importante dans des cultures primaires de tanocytes issus

de rats. Ces résultats suggèrent que la résistine pourrait promouvoir l'inflammation dans les tanocytes au cours de l'obésité. De même, nous montrons sur ces tanocytes en culture qu'un traitement par le palmitate provoque une augmentation de l'expression de la résistine, confirmant ainsi nos résultats obtenus *in vivo*. Récemment, les travaux de l'équipe du Pr Vincent Prévot, ont montré que les tanocytes représentent le support cellulaire du transport de la leptine du sang vers l'hypothalamus (Balland et al., 2014). Ainsi, l'augmentation de l'expression de la résistine dans les tanocytes et l'action pro inflammatoire qu'elle y exerce pourrait altérer la fonction de transport des tanocytes et constituer un mécanisme possible de résistance centrale à la leptine qu'on observe au cours de l'obésité induite par le régime HFD (Cai et Liu, 2011).

Les études émergentes font la distinction entre l'excès nutritif et l'obésité (Thaler et al., 2012 ; Valdearcos et al., 2015 ; Thaler et al., 2013 ; Valdearcos et al., 2014 ; Waise et al., 2015). En effet, il est clairement admis qu'un régime HFD de court terme peut rapidement affecter la sensibilité centrale à l'insuline et à la leptine bien avant l'installation de l'obésité (Wang et al., 2011 ; Woods et al., 2004). Il est actuellement admis que l'inflammation précoce de l'hypothalamus est impliquée de façon importante dans l'altération de l'homéostasie énergétique et dans la pathophysiologie de l'obésité. Afin de déterminer si la résistine hypothalamique est impliquée dans l'installation de l'inflammation précoce de l'hypothalamus, nous avons évalué son expression chez des souris soumises à un régime HFD pendant 3 ou 8 jours. De façon très intéressante, nous montrons que l'expression génique de la résistine est augmentée dans le noyau arqué et ce, dès les 3 premiers jours de régime HFD. L'augmentation rapide de l'expression de la résistine dans l'ARC apparaît de façon concomitante avec la gliose réactionnelle, suggérant un rôle possible de la résistine dans l'initiation de cette inflammation précoce. Nous montrons que cette augmentation est transitoire puisqu'elle diminue jusqu'à un niveau basal après 8 jours de régime HFD. La cinétique d'expression de la résistine rappelle en effet celle de l'inflammation associée au régime HFD et met en évidence le rôle possible du pic précoce d'expression hypothalamique de la résistine dans l'initiation de l'inflammation du MBH en réponse à l'environnement hyper lipidique (Thaler et al., 2012). De façon similaire au régime HFD de long terme, nous montrons que l'expression génique de la résistine est augmentée spécifiquement dans les tanocytes et les neurones POMC de l'hypothalamus médiobasal, en réponse au régime HFD de court terme.

Le fait que les tanocytes expriment la résistine en réponse à un régime HFD de

quelques jours seulement semble tout à fait intéressant. En effet, les tanycytes ont la particularité d'être à la fois au contact du liquide céphalo rachidien et des capillaires fenêtrés du sang porte hypothalamo-hypophysaire (Balland et al., 2014). Ils sont au cœur des échanges d'informations entre le cerveau et la périphérie (Langlet, 2014). Il semble ainsi possible qu'au cours du régime HFD, les tanycytes soient les premiers senseurs du changement de l'état nutritionnel au niveau central ; ce qui provoquerait alors une augmentation du niveau d'expression de la résistine dans ces cellules. Or, nous avons montré que la résistine active l'inflammation dans les tanycytes. Dans ce contexte, la résistine pourrait précocement promouvoir l'inflammation dans les tanycytes et en altérer l'organisation, ce qui pourrait fortement compromettre le transport de la leptine. Il a en effet été montré que la consommation d'un régime HFD de court terme provoque une résistance centrale à la leptine (Wang et al., 2011 ; Woods et al., 2004). En accord avec cette hypothèse, une étude récente montre que la consommation d'un régime HFD de court terme provoque une perte rapide de l'organisation structurale des tanycytes nichés dans l'éminence médiane (Ramalho et al., 2018). De même, les tanycytes sont dotés de projections qui se connectent vers les différents noyaux de l'hypothalamus, l'initiation de l'inflammation résistine-dépendante au sein de ces cellules pourrait alors promouvoir l'inflammation à travers le MBH.

Afin de déterminer les conséquences de la régulation positive de la résistine en réponse au régime HFD de court terme dans l'hypothalamus, des souris *wt* ou invalidées pour le récepteur TLR4 ont été soumises à une infusion de résistine par ICV pendant 3 jours. Nous démontrons clairement que l'administration de résistine par ICV est suffisante pour provoquer, via son récepteur TLR4, une importante inflammation hypothalamique associée à une forte réponse gliale caractérisée par une activation de la microglie et une mobilisation astrocytaire, qui rappelle fortement à la réponse gliale provoquée par le régime HFD (Thaler et al., 2012 ; Waise et al., 2015). De façon intéressante, nous montrons que cette infusion centrale de résistine provoque une réponse inflammatoire périphérique sans modification du niveau plasmatique de résistine. Il semble ainsi possible que la résistine centrale exerce son action pro inflammatoire en périphérie par communication vagale.

En résumé, les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que la voie résistine/TLR4 pourrait constituer un médiateur clé de l'inflammation hypothalamique aiguë et chronique induite au cours de l'obésité et des perturbations métaboliques qui lui

sont associées en particulier l'insulino resistance et le diabète de type 2.

---

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES

---



Du fait de sa précocité, l'implication causale de l'inflammation hypothalamique dans les désordres métaboliques menant à l'obésité et au syndrome métabolique est très fortement suggérée dans la littérature. Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'implication de la voie résistine/TLR4 dans l'installation de cette neuro inflammation hypothalamique associée au régime HFD. Les résultats obtenus au cours de cette thèse montrent, pour la première fois, que la consommation d'un régime HFD provoque une augmentation de l'expression de la résistine dans l'hypothalamus et ce, dès les trois premiers jours de régime HFD, suggérant l'implication de la résistine dans l'inflammation hypothalamique précoce associée à la consommation d'un régime HFD. Nous avons caractérisé les cellules concernées par l'expression génique de la résistine et nous montrons pour la première fois, que les neurones anorexigènes POMC ainsi que les tanocytes expriment la résistine et que le régime HFD augmente cette expression à court et à long terme. En revanche aucune expression n'a été détectée ni dans les astrocytes ni dans les cellules microgliales. Outre la régulation précoce de l'expression de la résistine hypothalamique dans les tanocytes en réponse au régime HFD, nos résultats mettent en évidence que la résistine, via l'activation de son récepteur TLR4, agit directement sur ces cellules, probablement par une action autocrine, pour promouvoir l'inflammation tanocytaire. Cette inflammation pourrait conduire à une altération précoce de la fonction des tanocytes favorisant l'altération du contrôle hypothalamique de la balance énergétique et le développement de l'obésité et des désordres métaboliques qui lui sont associée. Par ailleurs, nous montrons que la perfusion centrale de résistine pendant trois jours provoque, via l'activation du récepteur TLR4, une inflammation hypothalamique, une gliose réactionnelle dans l'hypothalamus medio basal associée à une inflammation des principaux tissus insulino-sensibles (foie, muscle).

Ce travail de thèse ouvre vers de nombreuses perspectives. Dans un premier temps, il semble intéressant de déterminer si l'augmentation de l'expression hypothalamique de la résistine en réponse au régime HFD constitue une étape critique dans l'installation de l'inflammation hypothalamique et des altérations métaboliques qui lui sont associées. En ce sens, notre équipe a pour objectif d'étudier les effets de l'inactivation de la résistine hypothalamique par une approche d'interférence ARN (AAV-ShRNA-Resistin) sur : l'inflammation hypothalamique, la gliose réactionnelle induite par le régime HFD, ainsi que sur la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose. Cela sera réalisé en injectant des particules virales adéno-associées (AAV-ShRNA-Resistin) de manière stéréotaxique dans l'hypothalamus médio-basal de souris C57BL6/J. Ces souris

seront par la suite soumises à un régime contrôle ou HFD pendant 3 ou 8 jours.

Il est bien connu qu'un régime HFD de court terme peut rapidement affecter la sensibilité centrale à l'insuline et à la leptine bien avant l'installation de l'obésité. Dans notre étude, nous montrons que l'expression génique de la résistine augmente rapidement au sein des tanocytes en réponse à un régime HFD de court terme. De même, nous montrons que la résistine induit l'inflammation dans les tanocytes en activant les voies P-ERK1/2 et P-Akt. Or, l'équipe du Pr Vincent Prévot a montré que le passage de la leptine vers le SNC se fait à travers les tanocytes, par une voie P-ERK dépendante. Dans ce contexte, il semble judicieux de déterminer si la résistine peut, au cours du régime HFD, altérer le passage de la leptine à travers les tanocytes. Pour se faire, des tanocytes en culture primaire seront prétraités par la résistine, puis stimulés par la leptine, le niveau de phosphorylation de la protéine ERK1/2 sera évalué par western blot.

Les tanocytes sont au cœur des échanges d'informations entre le cerveau et la périphérie (Langlet, 2014). Ils régissent le passage de la leptine, hormone anorexigène dont l'action est cruciale pour l'équilibre de la balance énergétique (Balland et al., 2014). D'autre part, il a été montré que la résistine est détectée dans le LCR, suggérant un passage de cette hormone à travers la BHE (Kos et al., 2007). Au cours de cette thèse, nous avons montré que la résistine active son récepteur TLR4 dans les tanocytes en activant la voie P-ERK. Dans ce contexte, il semblerait intéressant de déterminer si, au même titre que la leptine, les tanocytes pourraient constituer une porte d'entrée de la résistine vers le SNC. De façon similaire aux travaux réalisés par l'équipe du Pr Vincent Prévot, il serait intéressant d'utiliser une résistine fluorescente et ainsi déterminer si la résistine peut transiter dans les tanocytes au sein de l'éminence médiane. Ce travail permettra de mettre en évidence, pour la première fois, le passage de la résistine depuis la périphérie vers le SNC.

Par ailleurs, ce travail de thèse ouvre également la voie vers des perspectives à plus long terme. Il semble en effet intéressant de mettre en évidence le rôle du récepteur TLR4 des tanocytes dans l'inflammation hypothalamique associée au régime HFD de court et long terme. Cela sera réalisé en invalidant le récepteur TLR4 de façon spécifique au sein des tanocytes, chez des souris C57BL6/J. Ces souris seront par la suite soumises à un régime HFD de court et long terme ou à des injections de résistine. Notre équipe a pour objectif, en collaboration avec l'équipe du Pr Vincent Prévot à Lille, d'étudier l'effet de l'invalidation de TLR4 dans les tanocytes sur : l'inflammation hypothalamique et la gliose réactionnelle ; l'expression hypothalamique de la résistine ainsi que le passage de la résistine

périphérique vers le SNC.

Enfin, à long terme, il serait intéressant de déterminer si le ciblage de la voie résistine/TLR4 pourrait constituer une piste thérapeutique dans le cadre de l'obésité et du diabète de type 2.

# ANNEXES

Yacir Benomar,<sup>1,2</sup> Hamza Amine,<sup>1,2</sup> Délphine Crépin,<sup>1,2</sup> Sarah Al Rifai,<sup>1,2</sup>  
Laure Riffault,<sup>1,2</sup> Arieh Gertler,<sup>3</sup> and Mohammed Taouis<sup>1,2</sup>



## Central Resistin/TLR4 Impairs Adiponectin Signaling, Contributing to Insulin and FGF21 Resistance

Diabetes 2016;65:913–926 | DOI: 10.2337/db15-1029

**Adiponectin, an insulin-sensitizing hormone, and resistin, known to promote insulin resistance, constitute a potential link between obesity and type 2 diabetes. In addition, fibroblast growth factor (FGF)21 has effects similar to those of adiponectin in regulating glucose and lipid metabolism and insulin sensitivity. However, the interplay between adiponectin, FGF21, and resistin signaling pathways during the onset of insulin resistance is unknown. Here, we investigated whether central resistin promotes insulin resistance through the impairment of adiponectin and FGF21 signaling. We show that chronic intracerebroventricular resistin infusion downregulated both hypothalamic and hepatic APPL1, a key protein in adiponectin signaling, associated with decreased Akt-APPL1 interaction and an increased Akt association with its endogenous inhibitor tribbles homolog 3. Resistin treatment also decreased plasma adiponectin levels and reduced both hypothalamic and peripheral expression of adiponectin receptors. Additionally, we report that intracerebroventricular resistin increased plasma FGF21 levels and downregulated its receptor components in the hypothalamus and peripheral tissues, promoting FGF21 resistance. Interestingly, we also show that resistin effects were abolished in TLR4 knockout mice and in neuronal cells expressing TLR4 siRNAs. Our study reveals a novel mechanism of insulin resistance onset orchestrated by a central resistin-TLR4 pathway that impairs adiponectin signaling and promotes FGF21 resistance.**

Obesity is closely linked to several metabolic disorders including insulin resistance and type 2 diabetes (T2D) (1–6). However, the mechanisms underlying obesity-associated insulin resistance are not fully understood. Recently, an

emerging hypothesis suggests that the alteration of whole-body insulin sensitivity could have a starting point in the brain and precisely in the hypothalamus (7). Indeed, chronic high-fat feeding promotes hypothalamic resistance to leptin and insulin through an inflammatory-dependent mechanism leading to impaired energy homeostasis, obesity, and insulin resistance (4,7). Furthermore, compelling evidence indicates that changes in adipocyte-derived factors in obesity dramatically affect insulin sensitivity (4–6). Among these adipokines, resistin is described as a causal factor for obesity-induced insulin resistance and T2D. Indeed, the circulating levels of resistin are increased in obesity, promoting both inflammation and insulin resistance (8–12). In addition, serum resistin has been positively correlated with resistin cerebrospinal fluid levels, and increased cerebrospinal fluid resistin concentrations have been associated with T2D (13). Resistin is also expressed in the hypothalamus (14), and central resistin modulates food intake and glucose and lipid metabolism (15–19). Interestingly, we recently reported that central resistin, via hypothalamic Toll-like receptor (TLR)4, induces overall inflammation and impairment of insulin responsiveness in rat, presenting the first evidence for the crucial role of a hypothalamic resistin-TLR4 pathway in the onset of whole-body insulin resistance and inflammation (20).

Besides resistin, adiponectin has received a special focus because of its insulin-sensitizing and anti-inflammatory properties (21–24). In obesity, a decrease in plasma adiponectin is considered an important risk factor for insulin resistance (24). Conversely, exogenous adiponectin alleviates chronic inflammation, glucose intolerance, and insulin resistance in obese and diabetic rodents (24–26). Adiponectin exerts its effects through two adiponectin receptors,

<sup>1</sup>UMR 9197, Molecular Neuroendocrinology of Food Intake, University Paris-Sud, Orsay, France

<sup>2</sup>Department of Molecules and Circuits, CNRS UMR 9197, Molecular Neuroendocrinology of Food Intake, Paris-Saclay Institute of Neuroscience, Orsay, France

<sup>3</sup>Institute of Biochemistry, Food Science and Nutrition, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot, Israel

Corresponding author: Mohammed Taouis, mohammed.taouis@u-psud.fr.

Received 24 July 2015 and accepted 20 December 2015.

© 2016 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered.

AdipoR1 and AdipoR2 (24,27). Adiponectin also activates liver kinase B1-AMPK signaling pathways, promoting insulin sensitivity (23,27). Furthermore, the adaptor protein containing pleckstrin homology domain and leucine zipper motif 1 (APPL1) has been implicated in the insulin-sensitizing effect of adiponectin (27,28). APPL1 is also involved in the insulin-mediated Akt signaling, suggesting a cross talk between adiponectin and insulin signaling at the level of the Akt pathway (27). Recent studies have reported that adiponectin is crucially involved in hypothalamic control of energy homeostasis (29,30). Additionally, central adiponectin improves glucose tolerance and reverses hypothalamic inflammation and insulin resistance in obese mice (31,32). These data demonstrate that the insulin-sensitizing properties of adiponectin are at least partially related to a neuroendocrine mechanism that involves central action of adiponectin.

Fibroblast growth factor (FGF)21, a metabolic hormone predominantly produced by liver, has many functional similarities to adiponectin in regulating glucose and lipid metabolism and insulin sensitivity (33–37). FGF21 acts through a cell-surface receptor composed of a canonical FGF receptor (FGFR) associated with a coreceptor,  $\beta$ -Klotho (KLB) (36–38). Pharmacologic FGF21 treatment counteracts obesity and its related metabolic disorders including dyslipidemia, glucose intolerance, and insulin resistance (39). In white adipose tissue (WAT), a main target of FGF21 actions, FGF21 stimulates glucose uptake, modulates lipolysis, and enhances adiponectin expression and secretion (34–37,39,40). FGF21 also acts directly in the hypothalamus to modulate energy balance and insulin sensitivity (41,42). Recent studies have reported that serum FGF21 levels are elevated in obese rodents and humans (43–45). In obese mice, the expression levels of FGFRs were also markedly downregulated. This blunts the metabolic effects of FGF21, promoting an obesity-associated FGF21 resistance state (43,44).

Thus, obesity is associated with adiponectin and FGF21 resistances, leading to the impairment of insulin sensitivity. However, the mechanisms linking obesity to adiponectin/FGF21 signaling impairment are not yet elucidated. On the basis of our previous work demonstrating that central resistin overexposure induces striking alterations of whole-body insulin sensitivity, we hypothesized that resistin could be the missing link. Therefore, we investigated whether central resistin promotes insulin resistance through the impairment of adiponectin and FGF21 signaling. We show that chronic intracerebroventricular resistin infusion downregulated both hypothalamic and hepatic APPL1 expression associated with decreased Akt-APPL1 interaction and an increased Akt association with its inhibitor, tribbles homolog 3 (TRB3). Resistin treatment also reduced AdipoR1/2 expression in the hypothalamus and peripheral tissues. Interestingly, we report that central resistin, via TLR4, impairs FGF21 signaling through the downregulation of hypothalamic expression FGF21 and both hypothalamic and peripheral expression of its receptors, promoting FGF21 resistance.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

### Animals

Adult male Wistar rats, C57BL/6J mice (Janvier Laboratories), and TLR4 knockout (TLR4-KO) mice with the same genetic background (TAAM-UPS44; CNRS, Orleans, France) were housed individually in a temperature-controlled environment with a 12-h light/12-h dark cycle and unrestricted access to water and standard diet (SAFE, Augy, France). All experimental procedures were performed according to the institutional guidelines of laboratory animal care and approved by the governmental commission of animal research.

### Chronic Intracerebroventricular Infusion of Resistin

Osmotic mini-pumps (models 2002 for rats and 1003D for mice; Alzet) were implanted under ketamine (150 mg/kg)/xylazine (5 mg/kg) anesthesia. Brain infusion cannulas were stereotaxically placed into the right lateral brain ventricle using the following coordinates: 0.8 mm anterior to bregma, 1.5 mm lateral to the midline, and 3.5 mm dorso-ventral for rats and 0.58 mm anterior to bregma, 1 mm lateral, and 2 mm dorso-ventral for mice. The rats were then infused with either vehicle or resistin (2 or 12  $\mu$ L/day, respectively; pumping rate 0.5  $\mu$ L/h) for 14 days. C57BL/6J and TLR4-KO mice were infused for 3 days with either vehicle or resistin (2 or 6  $\mu$ L/day; pumping rate 0.2  $\mu$ L/h).

### Measurement of Blood Glucose and Plasma Hormone Levels

Blood glucose levels were measured immediately with a blood monitoring system (Accu-Chek, Roche). Plasma levels of resistin, insulin, leptin, adiponectin, and FGF21 were quantified with ELISA immunoassays according to the manufacturer's instructions (Millipore).

### Hormones and Chemicals

Human resistin was a generous gift of Protein Laboratories Rehovot Ltd. (Rehovot, Israel). Cell culture reagents were from Invitrogen. Insulin and chemicals were from Sigma-Aldrich. Immunobilon-FL transfer membranes were from Millipore. Fluorescent secondary antibodies were from Life Technologies.

### Cell Culture and Stimulation

SH-SY5Y human neuroblastoma cells and adult mouse hypothalamic (mHypo) cells were grown in DMEM and RPMI supplemented with 10% FCS, 2 mmol/L L-glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100  $\mu$ g/mL streptomycin in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. Serum-starved cells were incubated for 16 h in serum-free DMEM in the presence or absence of resistin (200 ng/mL), insulin (100 nmol/L), and insulin (100 nmol/L) + adiponectin (250 ng/mL). Cells were then stimulated with insulin (100 nmol/L), adiponectin (250 ng/mL), or FGF21 (100 nmol/L) for 10 min to evaluate the impact of chronic treatments on SH-SY5Y cell sensitivity of both insulin and adiponectin.

### Western Blot Analysis

Protein lysates from mice and rats tissues and SH-SY5Y cells were analyzed by Western blot as previously described

(20). Immunoblots were incubated overnight at 4°C with primary antibodies directed toward the following: (phospho-Ser<sup>473</sup>)-Akt, Akt, phospho-ERK1/2 (extracellular signal-related kinase 1/2), Erk1/2, (phospho-Ser<sup>307</sup>)-IRS-1 (insulin receptor substrate 1), IRS-1, phospho-JNK (c-Jun N-terminal kinase), JNK, APPL1, TRB3,  $\beta$ -tubulin (these antibodies are from Cell Signaling Technology), insulin receptor (IR), AdipoR1/2, APPL2, TLR4, or PTP1B (these antibodies are from Santa Cruz Biotechnology).

#### Immunoprecipitation

Protein lysates of rat tissues were incubated with antibodies against Akt overnight at 4°C. The immune complexes were precipitated with protein A and protein G coupled to sepharose after 2-h incubation at 4°C and subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-APPL1, anti-TRB3, and anti-Akt antibodies.

#### In Vitro FGFR21 Stimulation on Liver Membranes

The in vitro phosphorylation of FGFR1 receptor was performed as previously described (25).

#### In Vitro Adiponectin Stimulation on Liver Membranes

In vitro adiponectin-dependent activation of liver AdipoR2 was evaluated by analyzing the AdipoR2-APPL1 coimmunoprecipitation using crude liver membranes after adiponectin stimulation.

#### RNA Extraction and Quantitative RT-PCR

Total RNA from mice and rats tissues and SH-SY5Y cells was isolated using TRIzol reagent. RNA (1  $\mu$ g) was reverse transcribed, and the cDNAs were submitted to quantitative real-time PCR analysis using a SYBR Green QPCR system (Applied Biosystems) with specific primers (Supplementary Table 1). A ratio of target mRNA-to-18S amplification was calculated.

#### Small Interfering RNA Silencing

A pool of specific small interfering RNA (siRNA) duplexes targeting human TLR4 and APPL1 genes and control siRNA were purchased from Ambion. Transfection of siRNAs was performed using lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen). Downregulation of APPL1 and TLR4 protein synthesis was monitored by Western blot.

#### Data Analysis and Statistics

Data are shown as means  $\pm$  SEM. Student *t* test was applied for comparisons between two groups, whereas the ANOVA test was used to compare three or more sets of data, followed by Fisher post hoc test (Statview Software program).  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Adiponectin Improves Insulin Signaling in Human Neuronal SH-SY5Y Cells and mHypo Cells

We examined the impact of adiponectin on the insulin-dependent phosphorylation of Akt and ERK1/2. We showed that acute incubation with insulin or adiponectin significantly increased both Akt and ERK1/2 phosphorylation in SH-SY5Y and mHypo cells (Fig. 1A and D). A

notable synergistic effect of insulin and adiponectin was observed on Akt phosphorylation but not ERK1/2 phosphorylation (Fig. 1A and D). Cell overexposure to insulin reduced acute insulin-dependent Akt and ERK1/2 phosphorylation, though the latter was affected to a lesser degree (Fig. 1B and D). When cells were overexposed to both insulin and adiponectin, the insulin-dependent Akt and ERK1/2 phosphorylation was completely restored (Fig. 1C and D). Next, we investigated the mechanisms underlying an adiponectin-protective effect against insulin resistance. We showed that adiponectin significantly attenuated the insulin-dependent downregulation of IR at both mRNA and protein levels (Fig. 2A). Additionally, chronic exposure of SH-SY5Y cells to insulin significantly increased the Ser<sup>307</sup> phosphorylation of IRS-1 (Fig. 2B), JNK phosphorylation (Fig. 2C), and PTP1B expression (Fig. 2D), whereas the concomitant overexposure of cells to insulin and adiponectin markedly reduced JNK and IRS-1<sup>Ser307</sup> phosphorylation and reduced PTP1B expression to levels comparable with those of control cells (Fig. 2B–D).

### APPL1 Mediates the Insulin-Sensitizing Effect of Adiponectin in SH-SY5Y Cells

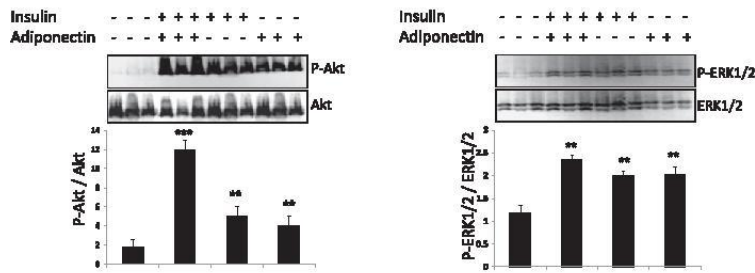
To assess the potential role of APPL1 in the insulin-sensitizing effect of adiponectin, we generated APPL1-depleted SH-SY5Y cells by siRNA-mediated knockdown (Fig. 3A). Cells were pretreated with insulin or insulin + adiponectin prior to insulin or adiponectin stimulation in the absence or presence of APPL1 siRNA (Fig. 3B). In control cells, both insulin and adiponectin induced Akt phosphorylation (Fig. 3B). Insulin pretreatment reduced Akt phosphorylation in response to insulin and adiponectin. However, the insulin- and adiponectin-dependent phosphorylation of Akt was almost completely restored when cells were pretreated with both hormones, an effect that was completely abolished in APPL1-suppressed cells (Fig. 3B).

To further evaluate the role of APPL1, we investigated its impact on IR expression and JNK and IRS-1<sup>Ser307</sup> phosphorylation. We showed that APPL1 siRNA did not affect IRS-1<sup>Ser307</sup> or JNK phosphorylation or IR expression (Fig. 3C). Insulin overexposure reduced IR expression and increased the phosphorylation of JNK and IRS-1<sup>Ser307</sup> (Fig. 3C). Insulin pretreatment effects were significantly reduced by simultaneous adiponectin pretreatment or in cells expressing APPL1 siRNA (Fig. 3C).

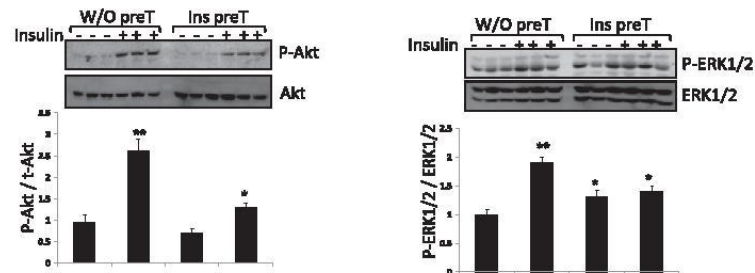
### Resistin Negatively Regulates Adiponectin Signaling Through the Downregulation of APPL1 and AdipoR1 in SH-SH5Y and mHypo Cells

To test the hypothesis of whether the promoting effects of resistin on insulin resistance are mediated by the alteration of adiponectin action, we investigated the cross talk between resistin and adiponectin signaling. For this purpose, the effect of chronic exposure to resistin on adiponectin signaling was studied in SH-SY5Y and mHypo cells. In nonpretreated cells, adiponectin increased Akt and ERK1/2 phosphorylations (Fig. 4A and B). Pretreatment with

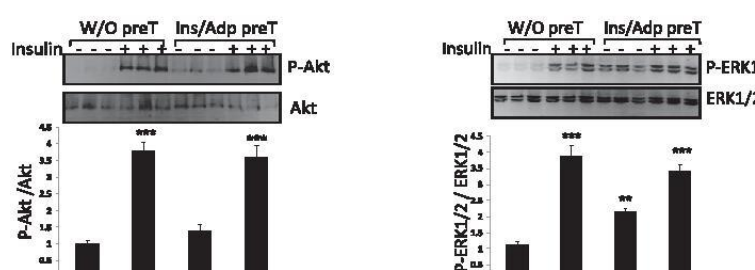
**A SH-SY5Y cells**



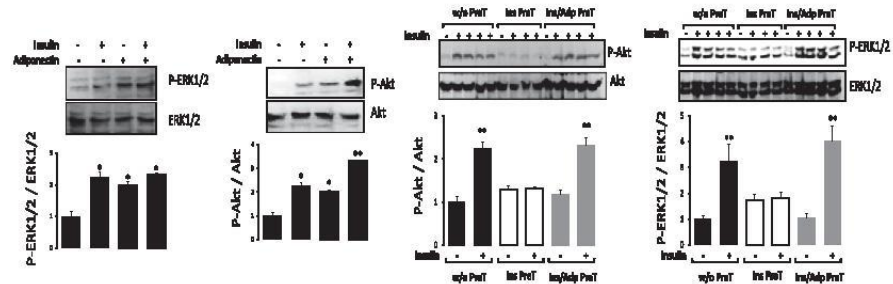
**B SH-SY5Y cells**



**C SH-SY5Y cells**

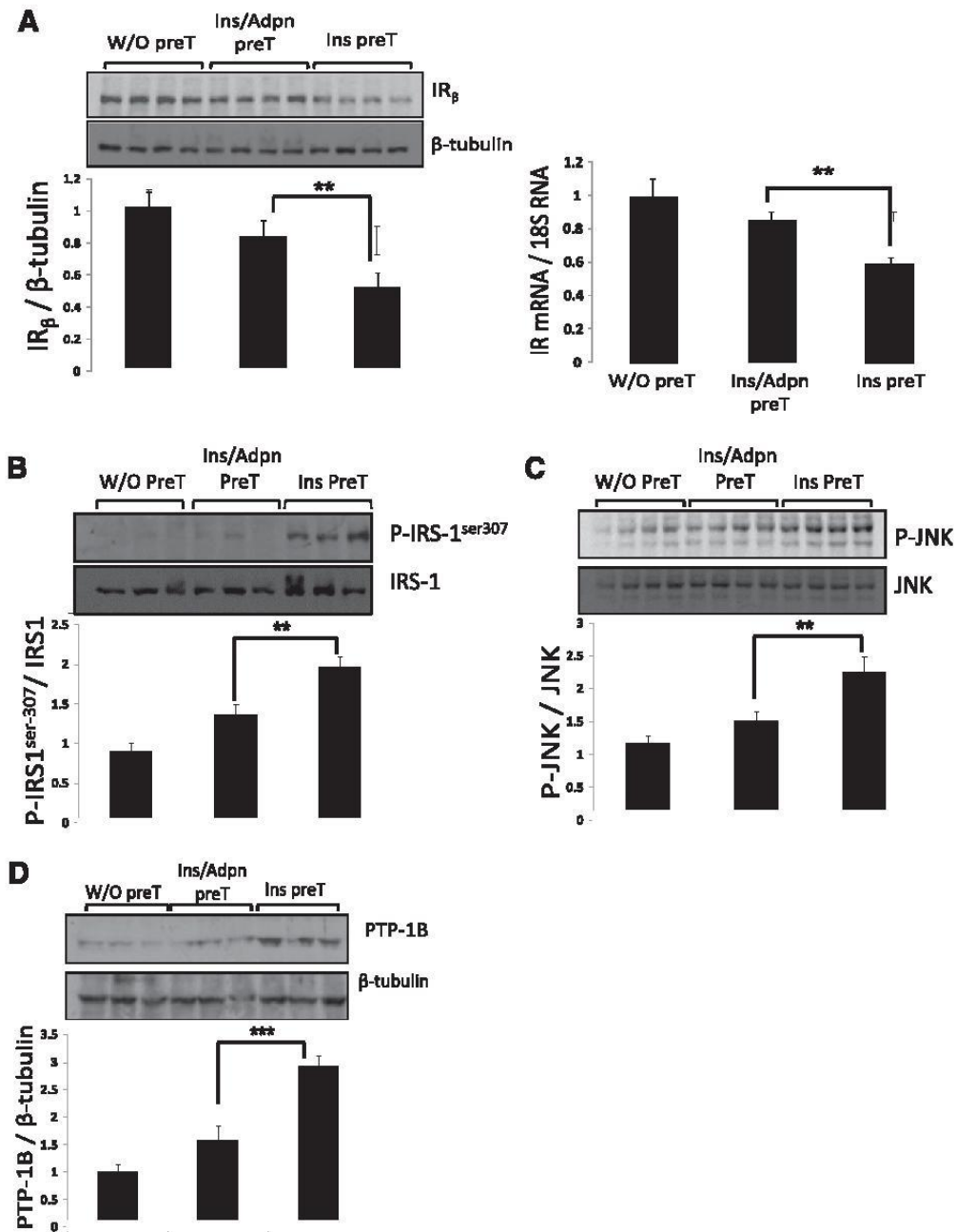


**D Mouse hypothalamic cells**

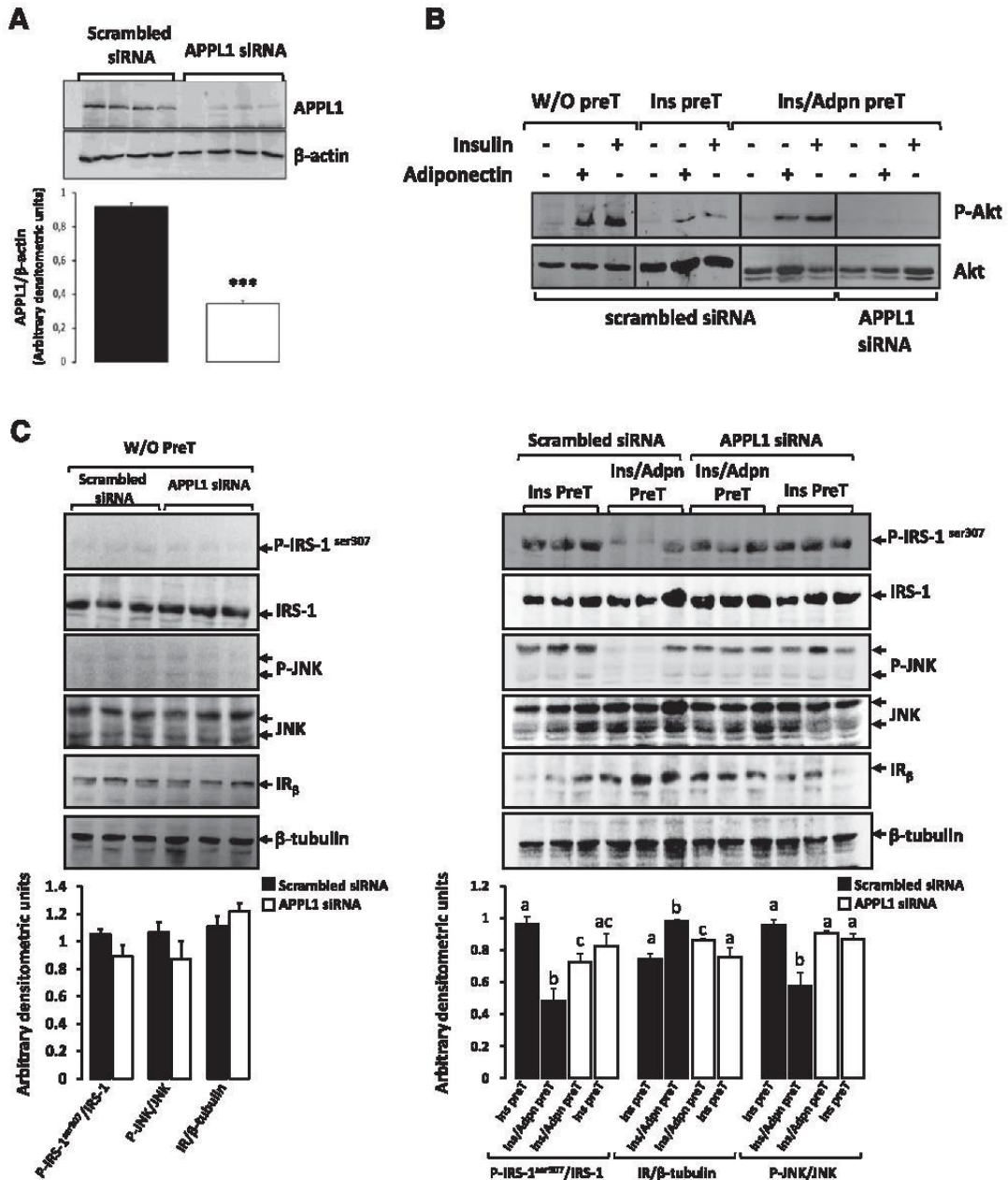


**Figure 1**—Adiponectin improves insulin-dependent phosphorylation of Akt and ERK1/2 in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *A* and *D*: SH-SY5Y and mHypo cells were serum starved overnight and treated for 10 min with or without insulin (100 nmol/L), adiponectin (250 ng/mL), and insulin + adiponectin. Phosphorylation of Akt and ERK1/2 was detected by Western blot analysis with the specific antibodies indicated. Proteins on the blots were quantified by densitometry. Bar graphs represent the ratios of p-Akt to Akt or p-ERK1/2 to ERK1/2. Serum-starved SH-SY5Y and mHypo cells were pretreated for 16 h without (W/O preT) or with (Ins preT) (100 nmol/L) insulin (*B* and *D*) or insulin (100 nmol/L) + adiponectin (250 ng/mL) (Ins/Adp preT) (*C* and *D*) and then stimulated with insulin (100 nmol/L) for 10 min. p-Akt and p-ERK1/2 and their protein levels in cell lysates were detected by Western blot analysis with specific antibodies as indicated. Proteins on the blots were quantified by densitometry. Bar graphs represent the ratios of p-Akt to Akt or p-ERK1/2 to ERK1/2. All data are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 3-6$  /group). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control.

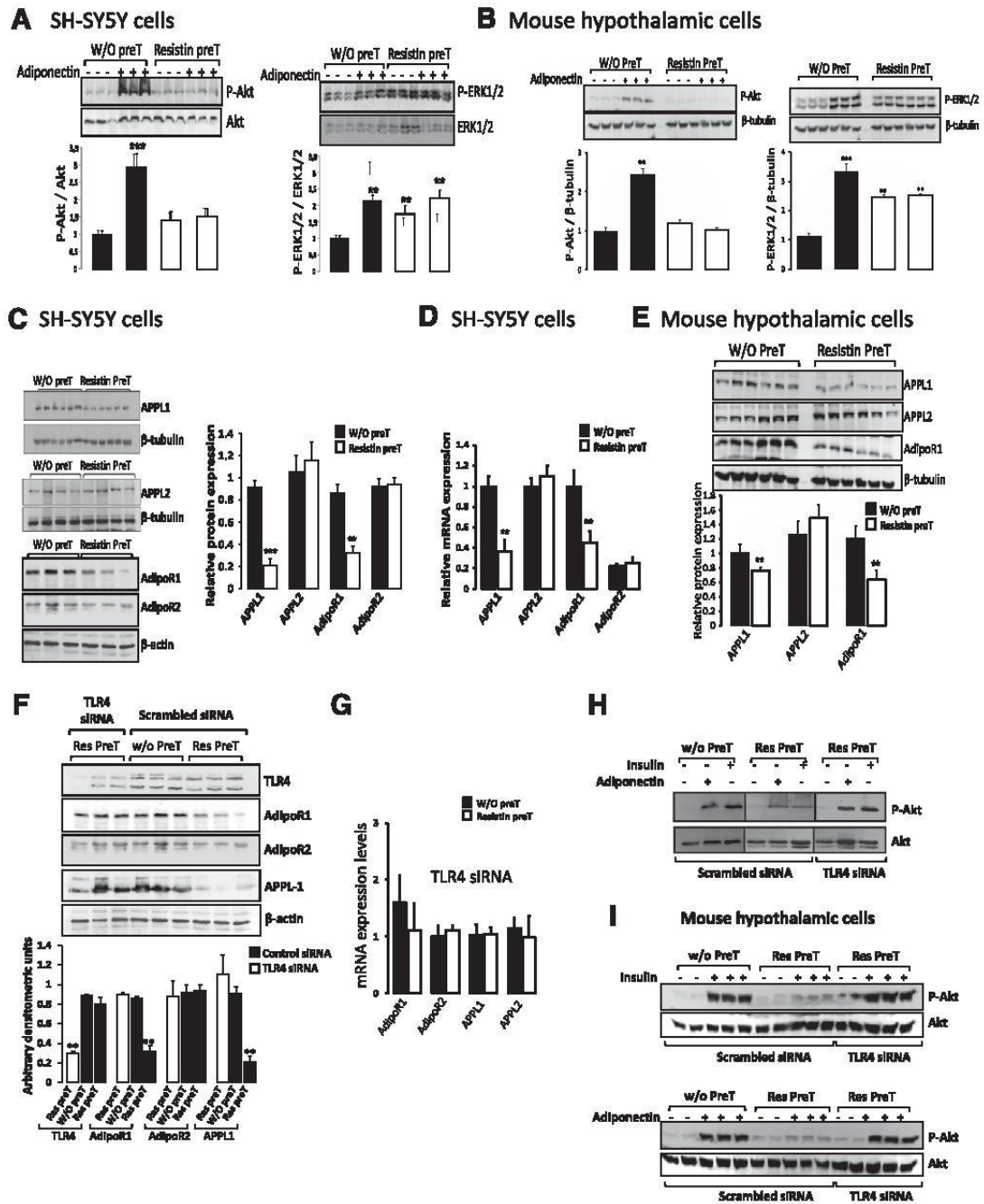




**Figure 2**—Adiponectin improves insulin signaling in SH-SY5Y cells through the upregulation of IR, downregulation of PTP1B, and inhibition of JNK activation and IRS-1<sup>ser307</sup> phosphorylation. SH-SY5Y cells were serum starved overnight and treated for 16 h without (W/O preT) or with (Ins preT) (100 nmol/L) insulin or insulin (100 nmol/L) + adiponectin (250 ng/mL) (Ins/Adpn preT). Expression levels of IR were evaluated by Western blot (A) and SYBR Green Real-Time RT-PCR (B). The phosphorylation of IRS-1<sup>ser307</sup> (C) and JNK (D) and the protein expression of PTP1B (E) were detected by Western blot analysis using specific antibodies as indicated. Proteins on the blots were quantified by densitometry. All data are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 3-6$ /group).  $P$  values were calculated using the Student  $t$  test (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ).



**Figure 3**—APPL1 mediates the insulin-sensitizing effect of adiponectin in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. SH-SY5Y cells were treated with control siRNA or specific siRNA duplexes targeting APPL1. The protein lysates were then subjected to Western blot analysis. **A:** Immunoblot analysis of APPL1 content in control and small interfering APPL1-treated cells. The results are expressed as the ratio of APPL1 to  $\beta$ -tubulin. **B:** Immunoblot analysis of the phosphorylation of AKT by insulin (100 nmol/L for 10 min) and adiponectin (250 ng/mL for 10 min) in control and APPL1-suppressed SH-SY5Y, treated for 16 h without (W/O preT) or with insulin (Ins preT) (100 nmol/L) or insulin (100 nmol/L) + adiponectin (250 ng/mL) (Ins/Adpn preT). **C:** Immunoblot analysis of the protein expression of IR and the phosphorylation of JNK and IRS-1<sup>Ser307</sup> in control and APPL1-suppressed SH-SY5Y cells treated for 16 h without or with (100 nmol/L) insulin or insulin (100 nmol/L) + adiponectin (250 ng/mL). Bar graphs represent the ratios of IR to  $\beta$ -tubulin, p-JNK (p-JNK54/46) to total JNK, and p-IRS-1<sup>Ser307</sup> to total IRS-1. All results are means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ –6/group). \*\*\* $P < 0.001$  compared with control cells. <sup>a,b,c</sup>Significant differences by ANOVA and Fisher post hoc test at  $P < 0.05$ .



**Figure 4**—Resistin negatively regulates adiponectin signaling through the downregulation of both APPL1 and AdipoR1 in SH-SY5Y and mHypo cells. SH-SY5Y and mHypo cells were serum starved overnight and treated for 16 h with (Resistin preT) or without (W/O preT) resistin (200 ng/mL). **A** and **B**: Control and resistin-treated cells were stimulated for 10 min with or without adiponectin (250 ng/mL). Phosphorylation of Akt and ERK1/2 was detected by Western blot analysis with the specific antibodies indicated. Proteins on the blots were quantified by densitometry. Bar graphs represent the ratios of p-Akt to Akt or p-ERK1/2 to ERK1/2. **C** and **E**: Immunoblot analysis of the protein expression of APPL1, APPL2, AdipoR1, and AdipoR2 in control and resistin-treated cells. Results are expressed as ratio of APPL1 to  $\beta$ -tubulin, APPL2 to  $\beta$ -tubulin, AdipoR1 to  $\beta$ -actin, and AdipoR2 to  $\beta$ -actin. **D**: mRNA levels of APPL1, APPL2, AdipoR1, and AdipoR2 in control and resistin-treated SH-SY5Y (200 ng/mL for 16 h). Results were normalized to 18S RNA. **F–G**: SH-SY5Y cells were treated with control siRNA or specific

resistin abolished adiponectin-dependent phosphorylation of Akt and increased the basal phosphorylation of ERK1/2. Resistin treatment also downregulated APPL1 and AdipoR1 expression, whereas APPL2 and AdipoR2 expression was not affected (Fig. 4C and D). Furthermore, we showed that TLR4 knockdown (Fig. 4D) abrogated the resistin-dependent downregulation of AdipoR1 and APPL1 (Fig. 4E and F) and restored both insulin- and adiponectin-dependent Akt phosphorylation (Fig. 4G and H).

#### Central Resistin Infusion Promotes the Downregulation of APPL1 and AdipoR1/2 in Rats and Mice

Next, we examined whether resistin could affect APPL1, AdipoR1, and AdipoR2 expression. We showed that Wistar rats chronically (14 days) infused by intracerebroventricular resistin exhibited lower hypothalamic expression of APPL1, AdipoR1, and AdipoR2, whereas APPL2 levels remained unchanged (Fig. 5A). The protein levels of APPL1 were also reduced in the liver but not in the muscle or WAT of resistin-treated rats (Fig. 5B). Resistin treatment also reduced AdipoR1/2 expression in liver, muscle, and WAT (Fig. 5B).

The effect of intracerebroventricular resistin infusion for 3 days was also tested in wild-type and TLR4-KO mice. Intracerebroventricular resistin reduced hypothalamic expression of APPL1 and AdipoR1/2 in wild-type but not in TLR4-KO mice (Fig. 5C and E). In both strains, APPL2 remained unchanged. In peripheral tissues, APPL1/2 and AdipoR1/2 remained unchanged in resistin-treated mice (Fig. 5D).

#### Central Resistin Infusion Impairs the Interaction Between Akt and Its Binding Partners, APPL1 and TRB3, Altering the AdipoR2/APPL1 Signaling

We investigated whether intracerebroventricular resistin infusion affected Akt, APPL1, and TRB3 interplay in the hypothalamus and liver of rats. In the hypothalamus, we revealed the association of Akt with both APPL1 and TRB3 under the basal condition (Fig. 6A). In resistin-treated rats, Akt-APPL1 association was reduced, while Akt-TRB3 interaction was enhanced (Fig. 6A). Furthermore, in control rats, insulin treatment increased Akt-APPL1 coimmunoprecipitation and reduced Akt-TRB3 interaction (Fig. 6A). Conversely, in resistin-treated rats, the effect of insulin was abolished (Fig. 6A). In the liver, intracerebroventricular resistin abolished the insulin-dependent association of Akt with APPL1 and increased Akt-TRB3 coimmunoprecipitation (Fig. 6B). Next, we investigated the impact of intracerebroventricular resistin infusion on adiponectin-dependent association of AdipoR2 with APPL1 in rat liver membranes. We showed that resistin treatment reduced

the coimmunoprecipitation of AdipoR2 and APPL1 in response to adiponectin stimulation (Fig. 6C).

#### Central Resistin Infusion Alters FGF21, FGFR, and KLB Expressions in the Hypothalamus and Peripheral Tissues

Next, we investigated whether central resistin-TLR4 pathways could contribute to FGF21 resistance. Thus, we assessed in mice and rats the impact of intracerebroventricular resistin infusion on FGF21, FGFR, and KLB expression in the hypothalamus and peripheral tissues. We showed that resistin decreased hypothalamic FGF21 expression in rats and mice. Hypothalamic expression of FGFR1/KLB was also significantly reduced by resistin treatment (Fig. 7A and B). In mice, intracerebroventricular resistin also decreased hypothalamic expression of FGFR2 and FGFR3 (Fig. 7B). Similarly, in SH-SY5Y cells, resistin overexposure reduced the expression levels of FGFR1, FGFR2, and KLB (Fig. 7K).

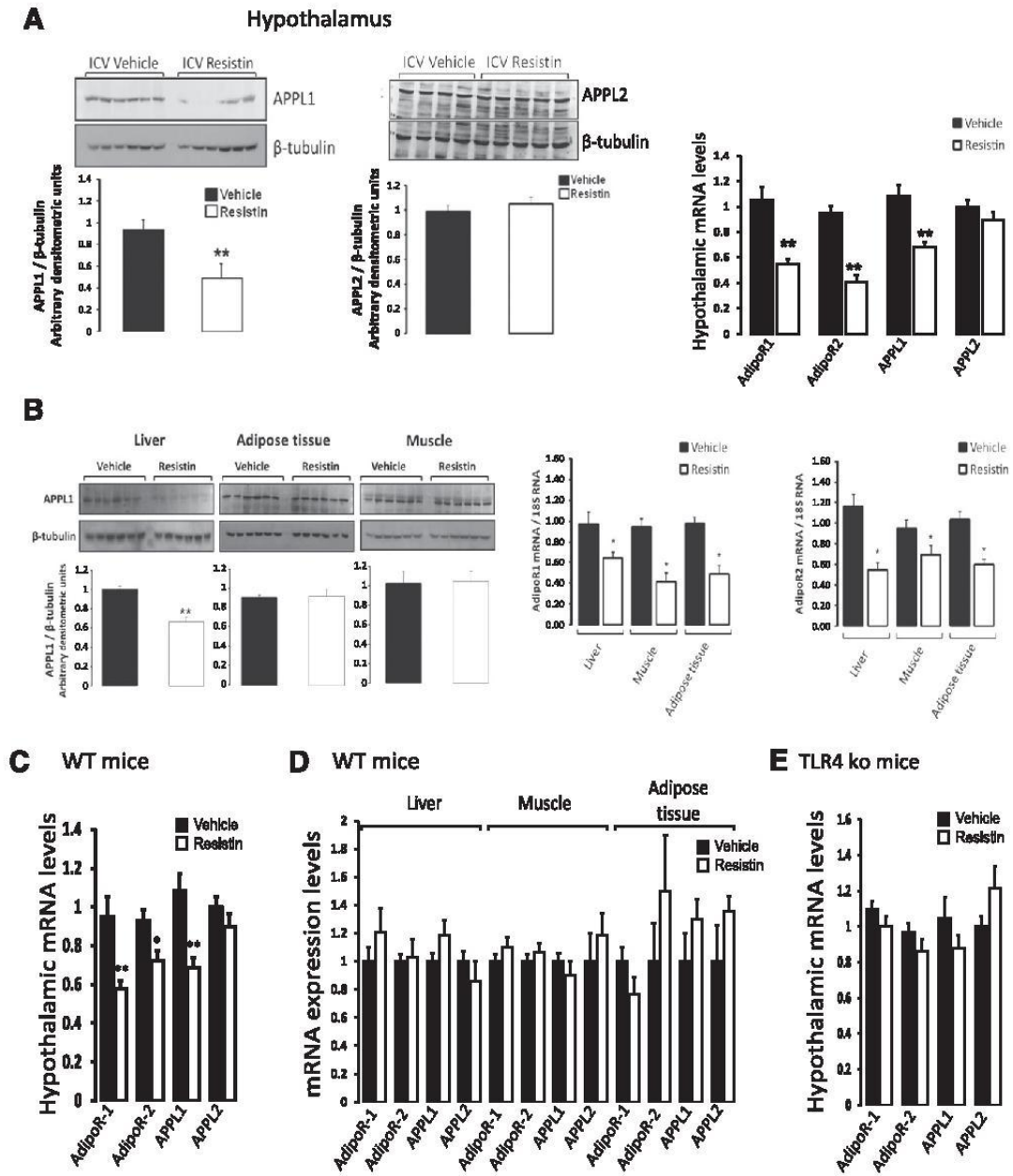
In peripheral tissues, intracerebroventricular resistin infusion increased the expression levels of FGF21 in rat liver and WAT but not in muscle (Fig. 7D). In addition, FGFR1 was downregulated in both WAT and muscle but not in liver (Fig. 7D). The expression levels of KLB and FGFR4 were attenuated in the WAT of resistin-treated rats but not in muscle and liver (Fig. 7D). Interestingly, intracerebroventricular resistin reduced WAT adiponectin expression (Fig. 7E) and plasma adiponectin levels (Fig. 7F). In contrast, the circulating levels of FGF21 and glucose were increased in resistin-treated rats (Fig. 7G and J), whereas plasma insulin and resistin levels were not affected (Fig. 7H and I). In mice, intracerebroventricular resistin infusion increased plasma levels of FGF21 but not those of insulin or resistin and also did not affect FGFRs or KLB expression at the peripheral level (Supplementary Fig. 1).

Next, we examined the role of TLR4 in resistin-dependent regulation of FGF21, FGFR, and KLB gene expressions. TLR4 repression in SH-SY5Y cells abrogated the effect of resistin on FGFR2 and KLB expression (Fig. 7K). In addition, the resistin effect on FGFR1 expression was attenuated in TLR4-suppressed cells (Fig. 7K). The resistin-dependent downregulation of FGF21, FGFR1, and KLB was abolished in the hypothalamus of TLR4-KO mice (Fig. 7C). We also showed that resistin overexposure reduced FGF21-dependent phosphorylation of FGFR1 and ERK1/2 in SH-SY5Y (Fig. 7L) and mHypo (Fig. 7M) cells. This was associated with a significant decrease of protein expression of FGFR1 (Fig. 7L and M). Additionally, rat chronic intracerebroventricular resistin infusion significantly reduced

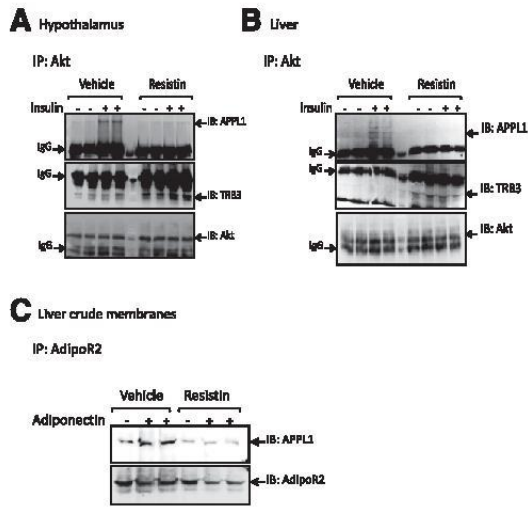
---

siRNA duplexes targeting TLR4 and then stimulated for 16 h with or without resistin (Res) (200 ng/mL). Expression levels of AdipoR1, AdipoR2, APPL1, and TLR4 were evaluated by Western blot (F) and SYBR Green real-time RT-PCR (G) in control and TLR4-suppressed SH-SY5Y cells. Phosphorylation of Akt and ERK1/2 in response to acute (10 min) stimulation with insulin or adiponectin was detected by Western blot analysis in control and resistin-treated SH-SY5Y (H) and mHypo (I) cells using specific antibodies as indicated. All results are means  $\pm$  SEM ( $n = 3-6$ /group). \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with control cells without any pretreatment.

---



**Figure 5**—Central resistin infusion promotes the downregulation of APPL1 and AdipoR1/2 in rats and mice. Male Wistar rats intracerebroventricularly (ICV) received vehicle or resistin (2  $\mu$ g/12  $\mu$ L/day; pumping rate 0.5  $\mu$ L/h) during a period of 2 weeks. At the end of the infusion period, the expression levels of APPL1, APPL2, AdipoR1, and AdipoR2 were evaluated by Western blot and SYBR Green Real-Time RT-PCR in the hypothalamus (A) and peripheral insulin-sensitive tissues (B). C–E: Male wild-type (WT) C57BL/6J mice or TLR4-KO mice with the same genetic background were intracerebroventricularly injected with vehicle or resistin (2  $\mu$ g/6  $\mu$ L/day; pumping rate 0.25  $\mu$ L/h) during a period of 3 days. At the end of the infusion period, mRNA expression of APPL1, APPL2, AdipoR1, and AdipoR2 was evaluated by SYBR Green Real-Time RT-PCR in the hypothalamus (C) and peripheral insulin-sensitive tissues (D) of WT mice and in the hypothalamus of TLR-KO mice (E). All data are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 3$ –6 /group).  $P$  values were calculated using the Student  $t$  test. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with vehicle.



**Figure 6**—Central resistin infusion impairs the interaction between Akt and its binding partners, APPL1 and TRB3, as well as AdipoR2/APPL1 association. Male Wistar rats were treated with or without resistin (2  $\mu$ g/12  $\mu$ L/day i.c.v.; pumping rate 0.5  $\mu$ L/h) for 14 days. At the end of the infusion period, vehicle and resistin-treated rats received human insulin (1 units/kg body wt i.p.) or saline bolus 30 min before euthanasia. Protein lysates from hypothalamus and liver were subjected to immunoprecipitation (IP)/immunoblot (IB) analysis to detect the interaction between Akt, APPL1, and TRB3 in the hypothalamus (A) and liver (B) using specific antibodies as indicated. C: Representative immunoblot of APPL1 and AdipoR2 coimmunoprecipitation in rat liver crude membranes.

FGF21-dependent phosphorylation of FGFR1 in vitro in liver crude membranes (Fig. 7N).

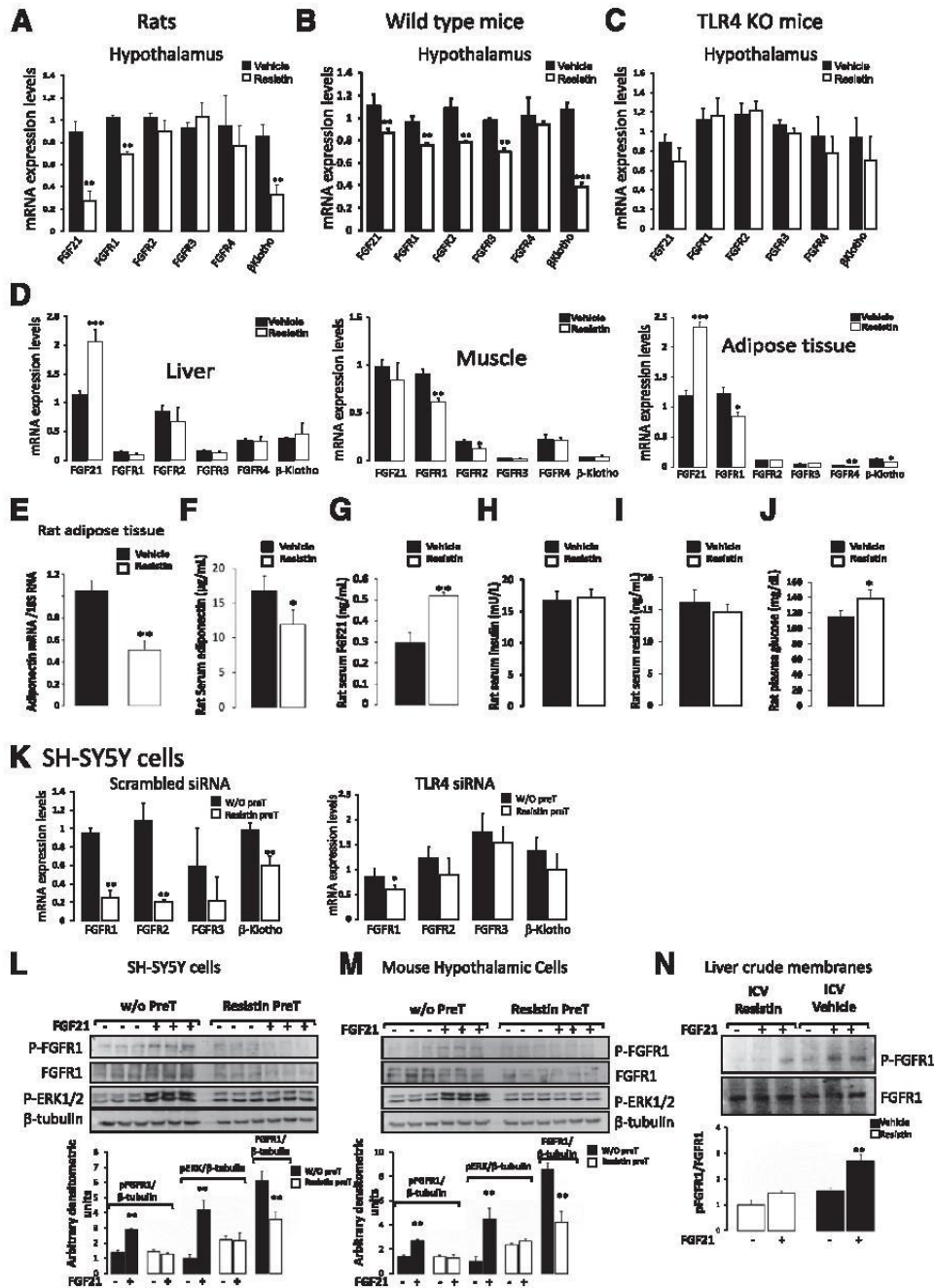
## DISCUSSION

Resistin is a critical factor in obesity-mediated insulin resistance. The molecular mechanisms mediating its effects are not fully characterized, particularly at the neuronal level. This study reveals novel mechanisms by which central resistin induces whole-body insulin resistance through the impairment of adiponectin signaling and by promoting FGF21 resistance. We show that chronic intracerebroventricular resistin infusion downregulated hypothalamic and hepatic APPL1 expression, reducing Akt-APPL1 interaction and favoring Akt association with its inhibitor, TRB3. Resistin treatment also reduced hypothalamic and peripheral expression of AdipoR1/2. Importantly, we report that central resistin, via TLR4, promoted FGF21 resistance through the downregulation of FGF21 hypothalamic expression and both hypothalamic and peripheral expression of its receptor components.

Adiponectin increased insulin sensitivity in peripheral tissues (21,22,24). At the central level, the insulin-sensitizing effect of adiponectin remains poorly documented. To investigate whether adiponectin regulates neuronal insulin signaling, we examined, in SH-SY5Y and mHypo cells, the

impact of adiponectin on Akt and ERK1/2. First, we showed that adiponectin significantly increased Akt and ERK1/2 phosphorylation. We reported a synergistic effect of adiponectin and insulin regarding Akt phosphorylation suggesting a cross talk between these two hormones. This is in good agreement with recent studies showing that adiponectin and insulin signaling cascades converge on Akt through the adapter protein APPL1, known to regulate both insulin- and adiponectin-dependent Akt activation (27). Furthermore, we showed that the overexposure of cells to insulin impaired Akt and ERK1/2 phosphorylation in response to insulin. Interestingly, when cells were overexposed to insulin and adiponectin, the insulin-dependent Akt and ERK1/2 phosphorylations were totally restored. This agreed with previous studies demonstrating an adiponectin-dependent improvement of both hypothalamic and peripheral insulin sensitivity (27,31). Importantly, the insulin-sensitizing effects of adiponectin were abolished in APPL1-suppressed SH-SY5Y cells, presenting the first evidence for the critical role of APPL1 in neuronal adiponectin/insulin cross talk and in mediating the insulin-sensitizing effect of adiponectin. We investigated the mechanisms underlying an adiponectin effect on insulin signaling. Previous studies have reported that hyperinsulinemia-induced downregulation of IR is considered an important mechanism promoting insulin resistance (46,47). Consistent with these studies, we show that insulin overexposure markedly reduces IR expression in SH-SY5Y cells. When cells were overexposed to both insulin and adiponectin, the insulin-dependent downregulation of IR was fully reversed. Adiponectin pretreatment also abolished the insulin-dependent upregulation of PTP1B, known as a promoter of insulin resistance (48). Interestingly, adiponectin treatment decreased insulin-dependent phosphorylation of JNK and IRS-1<sup>Ser307</sup> phosphorylation known to impair insulin signaling (49,50). Our findings demonstrate that in the insulin resistance state, adiponectin improves neuronal insulin responsiveness by restoring insulin receptor expression, suppressing PTP1B expression, and inhibiting both JNK and IRS-1<sup>Ser307</sup> phosphorylations.

Obesity is associated with hypo adiponectinemia, considered an important risk factor for insulin resistance (24). In contrast, plasma levels of resistin are increased in obese insulin resistant rodents and humans (8,10,11). Unequivocally, much evidence causally links resistin to insulin resistance (8,10,11,19,20). The underlying mechanisms remain poorly characterized, particularly at the neuronal level. Therefore, we assessed whether resistin could indirectly promote insulin resistance through the impairment of neuronal adiponectin signaling. We show that resistin overexposure dramatically reduced the adiponectin-dependent phosphorylation of Akt and ERK1/2 in SH-SY5Y and mHypo cells. This could be attributed to the resistin-dependent downregulation of AdipoR1. We provide the first evidence for a resistin-dependent downregulation of APPL1. To assess whether resistin



**Figure 7**—Effect of chronic resistin treatment on FGF21, FGFRs, KLB, and adiponectin expressions. Male Wistar rats received vehicle or resistin (2  $\mu$ g/12  $\mu$ L/day i.c.v.; pumping rate 0.5  $\mu$ L/h) during a period of 2 weeks. Male wild-type (WT) C57BL/6J mice or TLR4-KO mice with the same genetic background were injected intracerebroventricularly with vehicle or resistin (2  $\mu$ g/6  $\mu$ L/day; pumping rate 0.25  $\mu$ L/h) during a period of 3 days. Serum-deprived SH-SY5Y and mHypo cells were treated for 16 h with or without resistin (200 ng/mL). At the end of the treatment period, relative mRNA expression levels of FGF21, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, and KLB were evaluated by SYBR Green Real-Time RT-PCR in the hypothalamus of rats (A), wild-type mice (B), and TLR4-KO mice (C) and in peripheral insulin-sensitive tissues of rats (D). mRNA levels of adiponectin in WAT (E) and plasma levels of adiponectin (F), FGF21 (G), insulin (H), resistin (I), and glucose (J) in vehicle- and resistin-treated rats. mRNA expression of FGF21, FGFRs, and KLB in control and TLR4-suppressed SH-SY5Y

action on adiponectin signaling is mediated by TLR4, we investigated the impact of resistin overexposure on adiponectin signaling in TLR4-depleted SH-SY5Y and mHypo cells. Consistent with our recent report demonstrating that resistin, through hypothalamic TLR4, impaired hypothalamic insulin signaling (20), we showed that silencing TLR4 abrogated the resistin-dependent downregulation of AdipoR1 and APPL1 and restored insulin- and adiponectin-dependent Akt phosphorylation. This reveals a new signaling pathway through which resistin promotes insulin resistance by inducing a TLR4-dependent impairment of adiponectin signaling in neurons.

We next validated resistin/adiponectin cross talk *in vivo* by evaluating the impact of intracerebroventricular resistin infusion on the hypothalamic and peripheral expression of APPL1 and adiponectin receptors. We showed that chronic intracerebroventricular resistin infusion reduced the expression levels of AdipoR1/2 in the hypothalamus, liver, muscle, and WAT of rats. Importantly, resistin treatment induced a marked downregulation of APPL1 in the hypothalamus and liver. We also showed that intracerebroventricular resistin reduced liver adiponectin responsiveness of rats as evidenced by the impairment of AdipoR1-APPL1 interaction. Similarly, we reported in mice that intracerebroventricular resistin infusion for 3 days reduced the expression levels of AdipoR1/2 and APPL1 in the hypothalamus but not in peripheral tissues. The apparent discrepancy of results between mice and rats may be explained by genotype disparities as well as by the differences in the duration of resistin treatment. Furthermore, we demonstrated in TLR4-KO mice that intracerebroventricular resistin infusion did not impair APPL1 or AdipoR1/2 hypothalamic expression, suggesting a critical role of TLR4 in mediating resistin effects on adiponectin signaling *in vivo*. These results suggest that central resistin/TLR4 could promote adiponectin resistance through the downregulation of AdipoR1/2 and APPL1 at both hypothalamic and peripheral levels, leading to the impairment of adiponectin signaling and the abrogation of the insulin-sensitizing effects of adiponectin, at least in the liver. Our results present a new mechanistic explanation of previous findings highlighting that altered expression of APPL1 and adiponectin receptors in obesity reduces adiponectin sensitivity, leading to insulin resistance and T2D (23,24,27).

APPL1 is an important player in the insulin-mediated Akt signaling. APPL1 interacts with Akt and blocks Akt association with its inhibitor TRB3, promoting Akt activation (27). On the basis of these observations, we investigated whether intracerebroventricular resistin

infusion could impair AKT, APPL1, and TRB3 interplay. Interestingly, coimmunoprecipitation analysis showed that under basal conditions, intracerebroventricular resistin reduced APPL1-Akt interaction and enhanced Akt-TRB3 association. Importantly, the insulin-dependent association of APPL1 with Akt was abolished, whereas the AKT-TRB3 interaction was enhanced in resistin-treated animals. These findings highlight a novel mechanism of central resistin action toward insulin-dependent Akt phosphorylation through the blockade of Akt-APPL1 interaction and the promotion of Akt-TRB3 association.

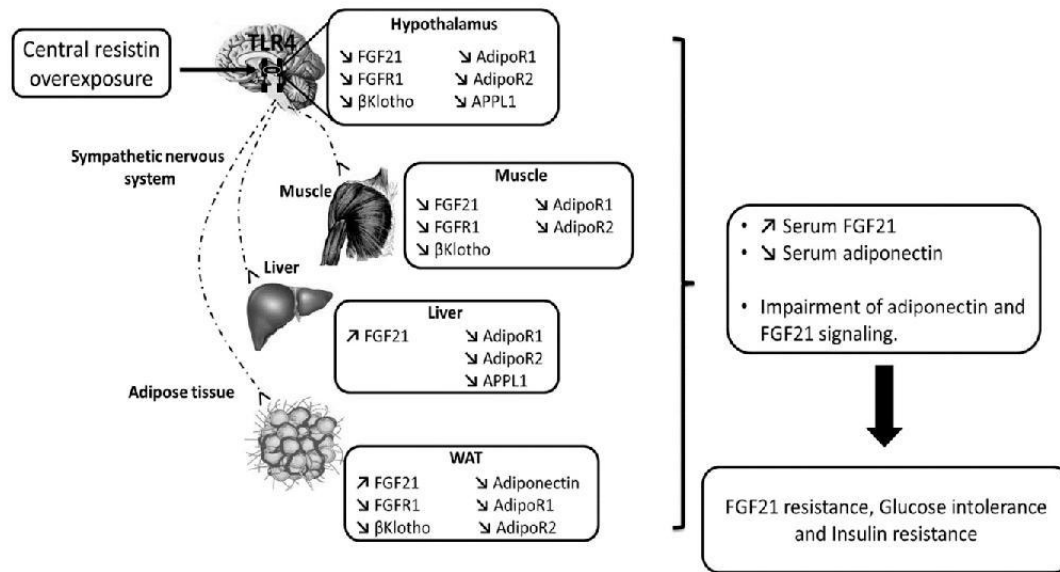
Another major finding of the current study is the characterization of the underlying mechanisms, that resistin most likely induced insulin resistance through the induction of FGF21 resistance in the hypothalamus and peripheral tissues. Indeed, FGF21 has several beneficial effects on insulin sensitivity and glucose and lipid metabolism (33–37). Subsequent studies reported that serum FGF21 levels are elevated in obese rodents and humans (43–45). Additionally, the expression levels of FGF21 receptors were downregulated in the liver and WAT of obese mice, leading to metabolic defects of FGF21, suggesting an obesity-associated FGF21 resistance (43,44). However, the mechanisms whereby obesity induces FGF21 resistance remained unknown. Consistent with these observations, we investigated the impact of chronic intracerebroventricular resistin on the expression levels of FGF21 and its receptor components in the hypothalamus and peripheral tissues. Importantly, we found that intracerebroventricular resistin infusion significantly decreased the expression levels of FGF21, FGFR1, and KLB in the hypothalamus of mice and rats. Similarly, resistin-treated SH-SY5Y and mHypo cells showed a marked diminution of FGFR1 and KLB expressions associated with a significant inhibition of FGFR1 phosphorylation, suggesting a direct effect of resistin on the modulation of FGFR expression and activity at the neuronal level. Recently, it has been shown that FGF21 acts directly in the hypothalamus to modulate energy balance and insulin sensitivity (41,42). Additionally, mice lacking the KLB gene are refractory to the insulin-sensitizing effects of FGF21 (42). In line with these reports, we showed that intracerebroventricular resistin infusion reduced the expression of FGF21 and its receptor components FGFR1 and KLB in the hypothalamus of rats and mice that could contribute to the defect of hypothalamic FGF21 signaling. In peripheral tissues, intracerebroventricular resistin increases FGF21 expression in the liver and WAT of rats, accompanied by increased circulating levels of FGF21. This was associated with a marked

---

cells (K). Representative immunoblot analysis of FGF21-dependent phosphorylation of FGFR1 and ERK1/2 in SH-SY5Y (L) and mHypo (M) cells treated with or without resistin for 16 h. N: FGFR1 phosphorylation on liver crude membranes from vehicle- and resistin-treated rats. All data are expressed as means  $\pm$  SEM ( $n = 3-6$  /group). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$  compared with vehicle-treated animals or control SH-SY5Y cells. Resistin preT, with resistin treatment; W/O preT, without resistin treatment.

---





**Figure 8**—Schematic illustration of resistin/TLR4-dependent impairment of adiponectin and FGF21 signaling in the hypothalamus and peripheral insulin-sensitive tissues.

downregulation of FGFR1 expression in both muscle and WAT and decreased KLB expression in WAT.

Next, we examined the role of TLR4 in resistin-dependent regulation of FGF21 and FGFRs gene expressions. Interestingly, we found that the repression of TLR4 in SH-SY5Y cells almost completely abrogates resistin effects. Importantly, the resistin-dependent downregulation of FGF21, FGFR1, and KLB in the hypothalamus was abolished in TLR4-KO mice, suggesting a critical role of TLR4 in mediating resistin effects on FGF21 signaling cascade in vivo. Recently, it has been reported that FGF21 upregulates WAT adiponectin expression and secretion and that FGF21 critically depends on adiponectin to exert its insulin-sensitizing effect (40). Here, we showed that central resistin markedly decreased WAT adiponectin expression, thereby reducing serum adiponectin levels. This could contribute to the impairment of the insulin-sensitizing effects of adiponectin in resistin-treated rats.

Thus, we have demonstrated that chronic intracerebroventricular resistin treatment increased blood glucose and FGF21 levels and decreased those of adiponectin. Insulin and resistin plasma levels remained unchanged. Furthermore, intracerebroventricular resistin treatment impaired adiponectin action and increased FGF21 plasma levels, thus promoting hyperglycemia.

In summary, our study brings new insights concerning the mechanisms involved in resistin-dependent insulin resistance and provides a novel mechanism by which a central resistin-TLR4 pathway promotes whole-body

insulin resistance through the impairment of adiponectin signaling and by promoting FGF21 resistance (Fig. 8).

**Duality of Interest.** No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

**Author Contributions.** Y.B. and M.T. designed and supervised experiments. Y.B. performed most experiments. H.A., D.C., S.A.R., L.R., and M.T. contributed to research data. Y.B. and M.T. performed data analysis. A.G. contributed to the manuscript revision and discussion and produced recombinant resistin. Y.B. and M.T. wrote the manuscript. M.T. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

#### References

1. Heindel JJ. Endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Toxicol Sci* 2003;76:247–249
2. Heindel JJ. Role of exposure to environmental chemicals in the developmental basis of disease and dysfunction. *Reprod Toxicol* 2007;23:257–259
3. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004;4:579–591
4. Thaler JP, Schwartz MW. Minireview: inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* 2010;151:4109–4115
5. Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:473–481
6. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1785–1788
7. Cai D, Liu T. Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1243:E1–E39
8. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, et al. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* 2001;50:2199–2202

9. Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, et al. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:472–476
10. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 2001;409:307–312
11. Silha JV, Krsek M, Skrha JV, Sucharda P, Nyomba BL, Murphy LJ. Plasma resistin, adiponectin and leptin levels in lean and obese subjects: correlations with insulin resistance. *Eur J Endocrinol* 2003;149:331–335
12. Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res* 2004;12:962–971
13. Berghoff M, Hochberg A, Schmid A, et al. Quantification and regulation of the adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid. *Eur J Clin Invest* 2016;46:15–26
14. Wilkinson M, Wilkinson D, Wiesner G, Morash B, Ur E. Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone. *Neuroendocrinology* 2005;81:19–30
15. Brunetti L, Orlando G, Recinella L, Michelotto B, Ferrante C, Vacca M. Resistin, but not adiponectin, inhibits dopamine and norepinephrine release in the hypothalamus. *Eur J Pharmacol* 2004;493:41–44
16. Tovar S, Nogueiras R, Tung LY, et al. Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. *Eur J Endocrinol* 2005;153:R1–R5
17. Muse ED, Lam TK, Scherer PE, Rossetti L. Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 2007;117:1670–1678
18. Vázquez MJ, González CR, Varela L, et al. Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. *Endocrinology* 2008;149:4534–4543
19. Singhal NS, Lazar MA, Ahima RS. Central resistin induces hepatic insulin resistance via neuropeptide Y. *J Neurosci* 2007;27:12924–12932
20. Benomar Y, Gertler A, De Lacy P, et al. Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes* 2013;62:102–114
21. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996;271:10697–10703
22. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005;26:439–451
23. Kubota N, Yano W, Kubota T, et al. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 2007;6:55–68
24. Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006;116:1784–1792
25. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941–946
26. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 2001;7:947–953
27. Cheng KK, Lam KS, Wang B, Xu A. Signaling mechanisms underlying the insulin-sensitizing effects of adiponectin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014;28:3–13
28. Deepa SS, Dong LQ. APPL1: role in adiponectin signaling and beyond. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E22–E36
29. Coope A, Milanski M, Araújo EP, et al. AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptin-like actions of adiponectin in the hypothalamus. *FEBS Lett* 2008;582:1471–1476
30. Qi Y, Takahashi N, Hileman SM, et al. Adiponectin acts in the brain to decrease body weight. *Nat Med* 2004;10:524–529
31. Koch CE, Lowe C, Legler K, et al. Central adiponectin acutely improves glucose tolerance in male mice. *Endocrinology* 2014;155:1806–1816
32. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002;8:1288–1295
33. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 2005;115:1627–1635
34. Ding X, Boney-Montoya J, Owen BM, et al.  $\beta$ Klotho is required for fibroblast growth factor 21 effects on growth and metabolism. *Cell Metab* 2012;16:387–393
35. Véniant MM, Hale C, Helmering J, et al. FGF21 promotes metabolic homeostasis via white adipose and leptin in mice. *PLoS One* 2012;7:e40164
36. Adams AC, Yang C, Coskun T, et al. The breadth of FGF21's metabolic actions are governed by FGFR1 in adipose tissue. *Mol Metab* 2012;2:31–37
37. Chen W, Hoo RL, Konishi M, et al. Growth hormone induces hepatic production of fibroblast growth factor 21 through a mechanism dependent on lipolysis in adipocytes. *J Biol Chem* 2011;286:34559–34566
38. Kharitonov A, Dunbar JD, Bina HA, et al. FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by betaKlotho. *J Cell Physiol* 2008;215:1–7
39. Woo YC, Xu A, Wang Y, Lam KS. Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013;78:489–496
40. Lin Z, Tian H, Lam KS, et al. Adiponectin mediates the metabolic effects of FGF21 on glucose homeostasis and insulin sensitivity in mice. *Cell Metab* 2013;17:779–789
41. Bookout AL, de Groot MH, Owen BM, et al. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med* 2013;19:1147–1152
42. Sarruf DA, Thaler JP, Morton GJ, et al. Fibroblast growth factor 21 action in the brain increases energy expenditure and insulin sensitivity in obese rats. *Diabetes* 2010;59:1817–1824
43. Fisher FM, Chui PC, Antonellis PJ, et al. Obesity is a fibroblast growth factor 21 (FGF21)-resistant state. *Diabetes* 2010;59:2781–2789
44. Hale C, Chen MM, Stanislaus S, et al. Lack of overt FGF21 resistance in two mouse models of obesity and insulin resistance. *Endocrinology* 2012;153:69–80
45. Zhang X, Yeung DC, Karpisek M, et al. Serum FGF21 levels are increased in obesity and are independently associated with the metabolic syndrome in humans. *Diabetes* 2008;57:1246–1253
46. Benomar Y, Roy AF, Aubourg A, Djiane J, Taouis M. Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. *Biochem J* 2005;388:929–939
47. Flier JS. Insulin receptors and insulin resistance. *Annu Rev Med* 1983;34:145–160
48. Koren S, Fantus IG. Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;21:621–640
49. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 2005;87:99–109
50. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 2000;275:9047–9054

## RESEARCH

# Resistin inhibits neuronal autophagy through Toll-like receptor 4

Jie Miao<sup>1,2,3</sup>, Yacir Benomar<sup>1,2</sup>, Sarah Al Rifai<sup>1</sup>, Ghislaine Poizat<sup>1,2</sup>, Laure Riffault<sup>1,2</sup>, Delphine Crépin<sup>1,2</sup> and Mohammed Taouis<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>UMR 9197, Molecular Neuroendocrinology of Food Intake, University Paris-Sud, University Paris-Saclay, Orsay, France

<sup>2</sup>Department of Molecules and Circuits, CNRS UMR 9197, Molecular Neuroendocrinology of Food Intake, Paris-Saclay Institute of Neuroscience, Orsay, France

<sup>3</sup>Department of Geriatrics, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University, School of Medicine, Shanghai, China

Correspondence should be addressed to M Taouis: [mohammed.taouis@u-psud.fr](mailto:mohammed.taouis@u-psud.fr)

## Abstract

Autophagy is a non-selective degradation pathway induced in energy-deprived cells and in non-starved cells by participating in cellular inflammatory responses mainly through the elimination of injured and aged mitochondria that constitute an important source of reactive oxygen species. We have previously reported that resistin/TLR4 signaling pathway induces inflammation and insulin resistance in neuronal cell. However, the impact of resistin-induced inflammation on neuronal autophagy is unknown. In the present study, we hypothesized that resistin-induced neuroinflammation could be attributed, at least partially, to the impairment of autophagy pathways in neuronal cells. Our data show that resistin decreases neuronal autophagy as evidenced by the repression of the main autophagy markers in SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. Furthermore, the silencing of TLR4 completely abolished these effects. Resistin also inhibits AMPK phosphorylation and increases that of Akt/mTOR contrasting with activated autophagy where AMPK phosphorylation is augmented and mTOR inhibited. *In vivo*, resistin treatment inhibits the mRNA expression of autophagy markers in the hypothalamus of WT mice but not in *Tlr4*<sup>-/-</sup> mice. In addition, resistin strongly diminished LC3 (a marker of autophagy) labeling in the arcuate nucleus of WT mice, and this effect is abolished in *Tlr4*<sup>-/-</sup> mice. Taken together, our findings clearly reveal resistin/TLR4 as a new regulatory pathway of neuronal autophagy.

## Key Words

- ▶ autophagy
- ▶ resistin
- ▶ TLR4
- ▶ neurons
- ▶ hypothalamus
- ▶ signaling

Journal of Endocrinology  
(2018) 238, 77–89

## Introduction

Resistin is described as a potential factor in obesity-mediated insulin resistance and type 2 diabetes (Savage *et al.* 2001, Steppan *et al.* 2001). Resistin is a cysteine-rich peptide secreted by adipose tissue in rodents and humans and macrophages in humans (Savage *et al.* 2001, Patel *et al.* 2003), promoting inflammation and insulin resistance (Savage *et al.* 2001, Mojiminiyi & Abdella 2007). Furthermore, plasma resistin levels are increased in obese insulin-resistant rodents and humans (Savage

*et al.* 2001, Olefsky & Glass 2010), while fasting decreases resistin mRNA expression (5, 6). In addition, resistin gene deletion or infusion of resistin antibodies or antisense oligonucleotides restores insulin responsiveness (Savage *et al.* 2001, Muse *et al.* 2004, Satoh *et al.* 2004, Qi *et al.* 2006). Resistin has been also linked to other pathologies such as atherosclerosis (Reilly *et al.* 2005). These effects are mainly attributed to the peripheral action of resistin; however, resistin expression and action have been reported

in hypothalamic neurons (Brunetti *et al.* 2004, Wilkinson *et al.* 2005, Benomar *et al.* 2013) suggesting a potential role of resistin in the brain. Indeed, central resistin modulates glucose/lipid metabolism and food intake and impairs liver insulin sensitivity (Muse *et al.* 2007, Vasquez *et al.* 2008). Resistin also modulates the synthesis and secretion of key pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL12 in macrophages via a nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-dependent pathway (Rajal *et al.* 2003, Olefsky & Glass 2010). We have recently reported that central resistin treatment inhibited insulin signaling and promoted neuroinflammation through TLR-4 via the activation of Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (Benomar *et al.* 2013). At the cellular level, the activation of resistin/TLR4 pathway impairs insulin signaling and increases pro-inflammatory cytokines' expression deregulating intrinsic cellular energy homeostasis. Beside, autophagy is a key mechanism in the maintenance of cellular homeostasis through subcellular organelle degradation (Mizushima *et al.* 2004). Indeed, autophagy is identified as a non-selective degradation pathway induced when cells are energy deprived. However, autophagy also occurs in non-starved cells by degrading cargo materials as damaged mitochondria, invading pathogens and aggregate-prone proteins for instance those induced by many neurodegenerative diseases. Hence, by eliminating injured and aged mitochondria that constitute an important source of reactive oxygen species. Thus, in contrast with resistin action, autophagy reduces cellular inflammatory responses (De Lavera *et al.* 2017, Fahy *et al.* 2017). However, the impact of resistin on neuronal autophagy is unknown. Here, we hypothesize that resistin/TLR4 signaling pathway could affect neuronal autophagy. Thus, we aimed to (1) determine the impact of resistin/TLR4 signaling pathway on the expression of autophagy markers in human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, (2) decipher the signaling pathways linking resistin to the alteration of autophagy and (3) validate *in vivo* the direct impact of resistin/TLR4 signaling pathway on autophagy markers using TLR4-knockout mice.

## Materials and methods

### Cell culture and stimulation

SH-SY5Y human neuroblastoma cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies) supplemented with 10% FCS, 2 mmol L-glutamine and 100 U/mL penicillin. Serum-starved cells were incubated

in serum-free Dulbecco's modified Eagle's medium for indicated time. Cells were incubated in serum-free medium for 4 h, and then incubated in the presence or absence of resistin (200 ng/mL) (Abcam) during 2 h. The resistin concentration used is chosen according to our previous work (Benomar *et al.* 2013). Cells were then washed twice with ice-cold PBS prior to protein or RNA extraction using adequate buffers.

### Animal treatment

Adult male C57BL6J mice (27–32 g) and TLR4-knockout mice (Jackson Laboratories) were treated with resistin or vehicle via intracerebroventricular infusion during 3 days. Briefly, mini-osmotic pumps (model 2002; Alzet, Charles River, L'Arbresle, France) were implanted under ketamine (150 mg/kg; Vibrac, Lyon, France)/xylazine (5 mg/kg; Rompun; Bayer) anesthesia. Brain infusion cannulas were stereotaxically placed into the lateral brain ventricle. The osmotic pumps were housed in a subcutaneous pocket on the dorsal surface of the animal. The mice were then infused with either vehicle or resistin (1.2  $\mu$ g/12  $\mu$ L/day; pumping rate 0.5  $\mu$ L/h) for 3 days. All animals were overnight starved and then were killed ( $n=6$ , per group). The hypothalami were manually dissected and immediately frozen into liquid nitrogen and conserved at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The quality of the dissection was verified by the measurement of POMC and NPY expression known to be specific to the hypothalamus. All procedures were conducted according to the guidelines of laboratory animal care and were approved by the local government commission for animal research: Ethics Committee for animal experimentation of Paris Center and South # 59 (France), with authorization # 91-467.

### Western blot analysis

Protein lysates from SH-SY5Y cells were prepared and analyzed by Western blot. Equal amount of total protein extracts (30  $\mu$ g) were separated in SDS-PAGE, using 10% gels. Then, protein samples were transferred to PVDF membrane (Millipore). The membranes were blocked with 5% BSA in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween20 (TBST) for 1 h at room temperature and then incubated overnight with the primary antibodies at  $4^{\circ}\text{C}$ . The primary antibodies used according to manufacturers' recommendations and all antibodies were from Cell Signaling Technology: LC3A/B, ATG7, P62, phospho (p)-AKT (ser473), AKT, p-mTOR (ser2448), mTOR, AMPK, p-AMPK,  $\beta$ -tubulin and TLR4. Blots were then incubated

with secondary mouse or rabbit antibodies coupled to horseradish peroxidase for 1 h at room temperature. Chemiluminescence signal was developed using a Western Bright ECL kit (Advansta Ins., CA, USA). The blots were finally scanned using the Carestream Molecular Imaging System 4000MM PRO (Carestream Health Inc., CT, USA). Semi-quantitative analysis of the relative density of the bands in Western blots was performed using Carestream software. The protein expression levels were normalized to  $\beta$ -tubulin expression.

#### Autophagic flux measurement: LC3II turnover assay

The LC3II turnover assay measures the amount of LC3II delivered to the lysosomes by comparing the LC3II amounts in the presence and absence of the lysosomal inhibitor  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mM) (MERK, Darmstadt, Germany). Autophagic flux, expressed as 'LC3II net flux', was determined by subtracting the densitometric value of LC3II amount in samples non-treated with lysosomal inhibitor (LC3II- $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) from the corresponding sample treated with lysosomal inhibitor (LC3II+ $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). This calculation was performed for each experimental condition tested. For each independent experiment, results were expressed as percentage of control.

#### RNA extraction and quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent according to manufacturer's instructions (Life Technologies). RNA concentration and purity were measured using a NanoDrop ND1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific). RNA (0.5  $\mu\text{g}$ ) was subjected to reverse transcriptase and then to quantitative PCR analysis using specific primer pairs that target LC3A (sense 5'GCTGAACCCACGCA3', antisense 5'GTCCTCGTCTTCTCCTGCT3'), LC3B (sense 5'AGCATCCAACCAAATCCCG3', antisense 5'TCACCAACAGGAAGAAGGC3'), ATG7 (sense 5'TTGATGGGTTGGGGCGTG3', antisense 5'TCACAGGATTGGAGTAGGAGAT3'), Beclin-1 (sense 5'CCCGTGAATGGAATGAGAT3', antisense 5'CCCGTGAATGGAATGAGAT3'), TLR4 (sense 5'GACTTGCGGGTTCTACATCA3', antisense 5'CATAGGGTTCAGGGACAGT3'), IL6 (sense 5'TCCTCCTGGTGTGCCTGCT3', antisense 5'TGAGTGGCTGTCTGTGGGG3'), TNF $\alpha$  (5'GCTCCAGGCGGTGCCTGTTC3', antisense 5'AGGCTTGTCACTCGGGTTC3'),  $\beta$ -actin

(sense 5'ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG3', antisense 5'AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG3'). The PCR is performed in the Step One apparatus (Applied Biosystems), using Fast SYBR Green Master Mix (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelin, France). A ratio of specific mRNA/ $\beta$ -actin mRNA amplification was calculated to normalize the expression levels.

#### Immunofluorescence microscopy

SH-SY5Y cells were washed three times with PBS and then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. Cells were permeabilized and blocked with 0.1% triton-100, 0.2% fish gelatin and 2% donkey serum for 1 h. Cells were incubated with primary antibody anti-LC3 (1:100; Cell Signaling Technology) overnight at 4°C. Cells were then washed in PBS and incubated for one hour at room temperature with secondary antibody Alexa-Fluor 488 (1:500; Life Technologies). The nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (1:3000, Thermo). Cells were analyzed on a ZEISS LSM 880 Confocal Laser Scanning Microscope with Zen software. The procedure was performed for three independent cell culture preparations. Quantification of LC3 puncta immunoreactivity per cell was performed (>20 cells per group) and imaging procedures were calculated by ImageJ software (NIH). The results were expressed as the relative amount compared with control.

For hypothalamic immunofluorescence, brains were subjected to fixation-infusion with 4% paraformaldehyde/PBS. The frozen sections in the coronal plane through the mouse hypothalamus were processed for LC3 (autophagy marker) and NeuN (neuronal marker) immunoreactivities using standard immunohistochemical procedures. Briefly, sections were first incubated with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 20 min and were blocked/permeabilized with a solution containing 0.1% Triton X-100, 0.2% fish gelatin, 2% normal donkey serum for 1 h at room temperature. Then, sections were incubated overnight at 4°C with rabbit anti-LC3 (1:100; Cell Signaling Technology) and mouse anti-NeuN (1:1000; Millipore) antibodies. Immunofluorescence was performed with a combination of Alexa-Fluor 488- or Alexa-Fluor 568-labeled anti-mouse or anti-rabbit (1:400; Life Technologies) and DAPI (Sigma-Aldrich) in order to identify cell nuclei. Images were captured on a Zeiss LSM-700 confocal microscope. Quantification was performed in a blinded fashion on anatomically matched brain regions identified in  $\times 20$  images. Both sides of bilateral structures of the ARC were

counted on three slides per animal, and replicate values from each animal were individually averaged. For LC3 immunofluorescence, cell puncta were counted manually within pre-specified regions of interest using ImageJ.

### Gene silencing using siRNA

A pool of specific siRNA duplexes targeting human TLR4 gene and non-targeting siRNA (sicontrol) were purchased from ThermoFisher Scientific. Transfection of TLR4 and control siRNA into SH-SY5Y cells was performed using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) transfection reagent according to the manufacturer's guidelines. Downregulation of the TLR4 protein synthesis and TLR4 mRNA following siRNA transfection was evidenced by Western blot analysis and real-time RT-PCR.

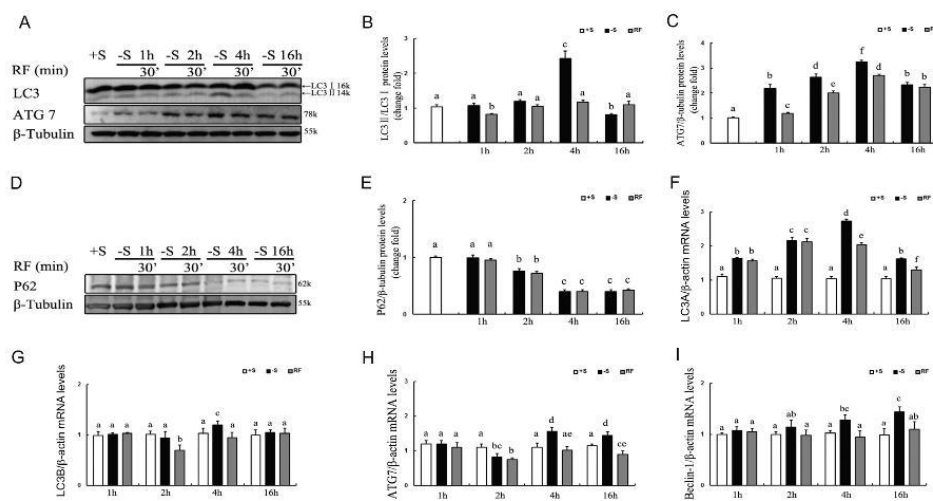
### Data analysis and statistics

Statistical analysis was performed using ANOVA and Fisher *post hoc* test (SPSS 16.0 software) to detect significant intergroup differences. Data are presented as mean  $\pm$  s.d., and a *P* value <0.05 was considered statistically significant.

## Results

### Impact of serum starvation on autophagy markers in SH-SY5Y human neuroblastoma cells

To determine the impact of serum starvation on autophagy, SH-SY5Y human neuroblastoma cells were serum-starved at the indicated times and then incubated with or without serum for 30 min (RF). The expression levels of autophagy markers were quantified by Western blot and qRT-PCR. The serum starvation for 4 h significantly increased the protein expression levels of the microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-I and LC3-II), known as components of the autophagic vacuole membranes, and then LC3I/LC3II expression returned to the basal level, measured in cells maintained with serum, after 16 h of starvation (Fig. 1A and B). The serum starvation-induced LC3II/LC3I overexpression was abolished after 30 min of serum addition (cell re-feeding) (RF) (Fig. 1A and B). We have also shown that serum starvation increased expression of both variants of LC3 gene LC3A and LC3B. One-hour serum starvation significantly increased LC3A expression (Fig. 1F). This augmentation was maintained during 16 h of starvation with a peak at 4 h. The addition of serum did reduce LC3A expression in cells serum-starved for 4 h or 16 h but in those



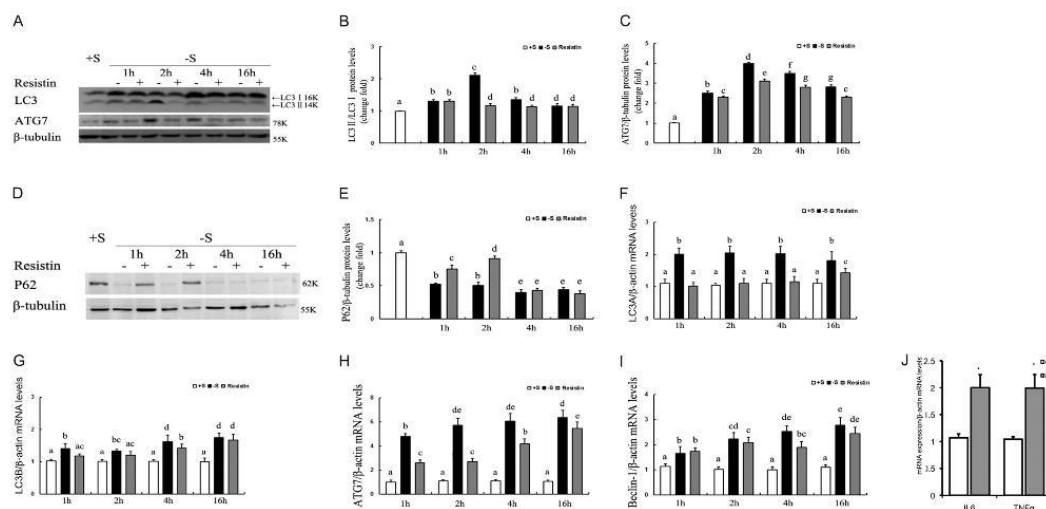
**Figure 1**

Serum starvation increases autophagy in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. SH-SY5Y cells were incubated with serum (+S) or without serum (-S) for indicated time or re-fed (RF) for 30 min. Western blot analyses were performed using anti-LC3 or anti-ATG7 (A) or anti-p62 (D) or  $\beta$ -tubulin (A). The results are expressed as ratio of LC3 II/LC3 I (B), ATG7/ $\beta$ -tubulin (C) or p62/ $\beta$ -tubulin (E). In parallel, total mRNA were prepared from cells and subjected to qRT-PCR using adequate primers in order to measure the expression levels of LC3A (F), LC3B (G), ATG7 (H) or Beclin (I). The results were normalized to  $\beta$ -actin. All the results are expressed as means  $\pm$  s.d. ( $n=3$ /group). Different letters indicate significant differences with  $P<0.05$ . Each blot for LC3, ATG7, p62 or  $\beta$ -tubulin is part of the same gel without any division or insertion.

starved for 1 or 2 h (Fig. 1F). LC3B expression was less affected by serum starvation, except after 4 h where its expression exhibited a significant augmentation (Fig. 1G). We have also measured the expression ATG7, autophagy-related 7 that encodes an E1-like-activating enzyme essential for autophagy initiation and vacuole formation. ATG7 protein expression was increased in response to serum starvation since the first hour, and this augmentation was maintained during 16 hours of starvation (Fig. 1A and C). The addition of serum after 1, 2 or 4 h of starvation significantly reduced ATG7 expression (Fig. 1C). At the mRNA level, ATG7 expression was augmented after 4 and 16 hours of starvation and declined after 2 h (Fig. 1H). Furthermore, we measured the expression of Beclin-1, which is involved in the initiation of autophagosome formation. We showed that 4- and 16-h serum starvation increased its expression that was abolished by the addition of serum (Fig. 1I). Finally, we measured the expression of p62 known as the specific autophagic substrate that declines when autophagy is activated. We showed that serum deprivation for 2, 4 and 16 h significantly reduced p62 expression and the addition of serum for 30 min was not able to restore the basal level of p62 expression (Fig. 1D and E).

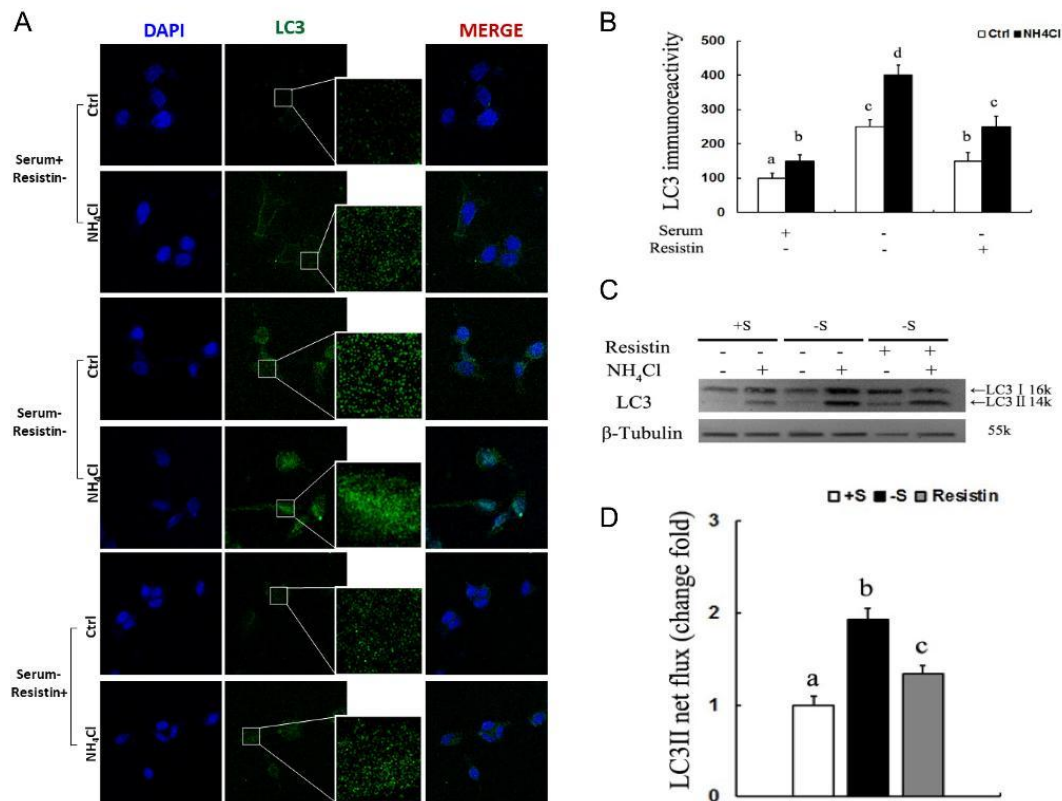
### Resistin reduces the starvation-induced autophagy and increases inflammation

To investigate the effect of resistin on autophagy, SH-SY5Y cells were serum starved for various periods of time in the presence or absence of resistin. Resistin significantly reduced LC3-II/LC3I ratio induced by 2 or 4 h of starvation (Fig. 2A and B). Resistin treatment decreased LC3A expression induced by 1, 4 or 16 h of serum starvation (Fig. 2F). LC3B expression was less affected by resistin treatment, except after 1 or 4 h of starvation (Fig. 2G). Resistin also significantly reduced ATG7 expression at the protein and mRNA levels since 1 h of serum starvation till 16 h (Fig. 2A, C and H). Furthermore, the cell exposure to resistin diminished the expression of Beclin-1 after 4 h of serum starvation (Fig. 2I). The serum starvation also downregulated p62 from 1 to 16 h (Fig. 2D and E) and resistin treatment transiently recovered p62 expression in cells starved for 1 or 2 h (Fig. 2D and E). Furthermore, following 4 h of resistin treatment, serum-starved cells exhibited a higher expression of pro-inflammatory markers IL6 and TNF $\alpha$  as compared to control cells (Fig. 2J).



**Figure 2**

Resistin reduces autophagy and increases inflammation in SH-SY5Y cells. Cells were serum-starved during 4 h and then incubated with resistin (200 ng/mL) (R) or without resistin (–S) for 1, 2, 4 and 16 h. Control cells were maintained in the presence of serum (+S). Western blot analyses were performed using anti-LC3 and anti-ATG7 (A), P62 (D). The proteins on the blots were revealed by ECL and bands were quantified by densitometry. The results are expressed as ratio of LC3 II/LC3 I (B), ATG7/ $\beta$ -tubulin (C) and P62/ $\beta$ -tubulin (E). LC3A (F), LC3B (G), ATG7 (H), Beclin-1 (I), IL6 (I) and TNF $\alpha$  (J) mRNA expression levels were measured by real-time RT-PCR. All the results are expressed as means  $\pm$  s.d. ( $n=3$ /group). Different letters indicate significant differences with  $P<0.05$ . For IL6 and TNF $\alpha$ , \* indicates  $P<0.05$  when comparing control cells to cells treated with resistin. Each blot for LC3, ATG7, p62 or  $\beta$ -tubulin is part of the same gel without any division or insertion.

**Figure 3**

Resistin reduces LC3II net flux. (A) LC3 expression was assessed by immunocytochemistry assay. SH-SY5Y was labeled for LC3 using anti-LC3 antibodies (green) and DAPI (blue, nuclei). Figures are representative of three independent experiments (bar = 20  $\mu$ m). Cells were pretreated with inhibitor NH<sub>4</sub>Cl (10 mM) (an inhibitor of lysosomal degradation) or without NH<sub>4</sub>Cl for 1 h in the presence or not of resistin. (B) Quantification of the number of LC3 puncta immunoreactivity (green) per cell in each condition (>20 cells per group). All data are means  $\pm$  s.d. ( $n = 3-6$ /group). (C) Protein lysates of SH-SY5Y cells that were incubated with serum or without serum, in the presence or absence of resistin and pretreated or not with NH<sub>4</sub>Cl (10 mM) were subjected to Western blot using anti-LC3 antibodies and normalized to  $\beta$ -tubulin. (D) Values of LC3II net flux were determined by subtracting the densitometric values of LC3II amount in NH<sub>4</sub>Cl untreated cells from the corresponding cells treated with NH<sub>4</sub>Cl. All the results are expressed as means  $\pm$  s.d. ( $n = 3-6$ /group). <sup>a,b,c,d,e</sup>Denote significant difference at  $P < 0.05$  by ANOVA and Fisher *post hoc* test. Each blot for LC3 or  $\beta$ -tubulin is part of the same gel without any division or insertion.

### Resistin inhibits autophagic flux

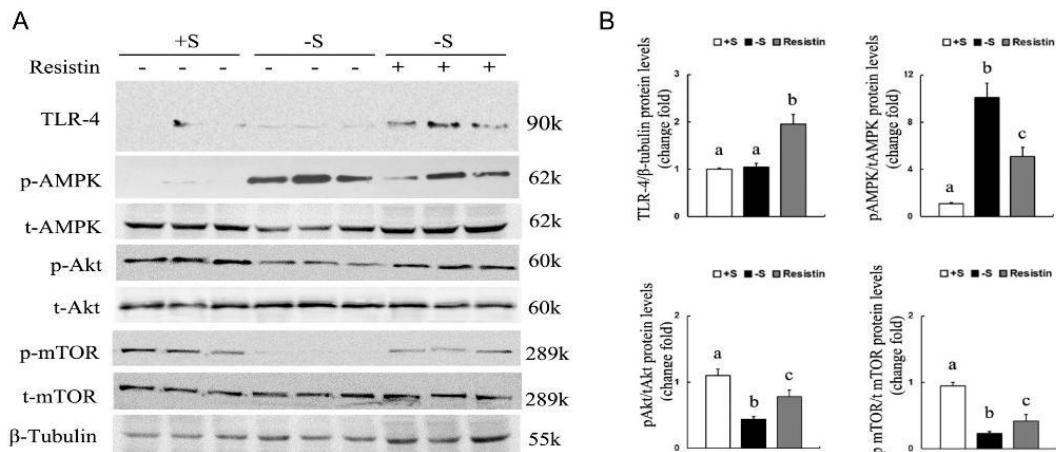
To further investigate the inhibition of autophagy by resistin, we have measured LC3 expression levels in the absence or presence of NH<sub>4</sub>Cl, an inhibitor of autophagosomal degradation. Indeed, LC3 is degraded at the final stages of autophagy, and in the presence of NH<sub>4</sub>Cl, LC3 is accumulated as evidenced by LC3 puncta immunoreactivity in serum-starved cells as compared to non-starved cells (Fig. 3A). Despite the presence of NH<sub>4</sub>Cl, resistin significantly diminished the LC3 accumulation (Fig. 3A and B). We next determined autophagic flux by the LC3II turnover through the measurement of LC3-II

delivered to the lysosomes by comparing the LC3-II amounts in the presence and absence NH<sub>4</sub>Cl (LC3-II net flux). We found that resistin reduced starvation-induced LC3-II net flux in SH-SY5Y cells (Fig. 3C and D).

### Resistin acts on signaling pathways implicated in serum starvation-induced autophagy

To investigate the possible mechanisms underlying the resistin-dependent inhibition of autophagy, we examined AMPK-mTOR pathways. Indeed, AMPK is known as an inducer of autophagy through different mechanisms





**Figure 4**

Resistin inhibits AMPK phosphorylation and activates Akt/mTOR pathway. SH-SY5Y cells were incubated in the absence or presence of serum for 4 h or in the absence of serum and in the presence of resistin (200 ng/mL) during 2 h. Cell lysates were subjected to Western blot in order to measure AMPK, Akt and mTOR phosphorylation. TLR4 was also measured and all blots were normalized to total proteins and  $\beta$ -tubulin (panel A). The results were expressed as ratio of p-AMPK/total-AMPK, p-Akt/total-Akt, TLR-4/ $\beta$ -tubulin (panel B). Results are expressed as means  $\pm$  s.d. ( $n = 3$ /group). Different letters indicate significant differences with  $P < 0.05$ . Each blot for TLR4, p-AMPK, t-AMPK, p-Akt, tAkt, p-mTOR, t-mTOR or  $\beta$ -tubulin is part of the same gel without any division or insertion.

including the inhibition of PI3K-mTOR pathway. We have previously shown that resistin binds to TLR4, here we confirmed the upregulation of TLR4 in serum-starved cells treated with resistin (Fig. 4A and B). Our data also showed that resistin decreased AMPK phosphorylation in serum-starved cells (Fig. 4A and B). In contrast, serum deprivation decreased both Akt and mTOR phosphorylation that were recovered by resistin treatment (Fig. 4A and B). This suggests that resistin could modulate autophagy process through the inhibition of AMPK phosphorylation and the activation Akt-mTOR signaling pathways.

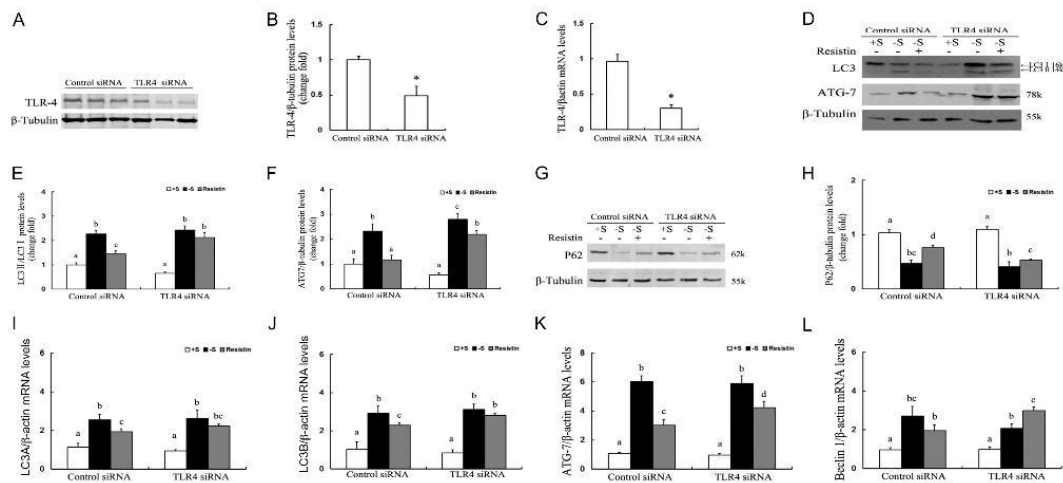
#### Resistin inhibits autophagy through TLR4

We have previously shown that resistin/TLR4 signaling pathway promotes insulin resistance and neuroinflammation (13). In order to investigate whether resistin inhibits autophagy through TLR4, this receptor was silenced in SH-SY5Y cells using siRNA strategy leading to marked downregulation of TLR4 expression at both mRNA and protein levels (Fig. 5A, B and C). Here, we have shown that resistin treatment reduced the starvation-induced upregulation of LC3I (Fig. 5D and E) and LC3II (Fig. 5D and E). LC3A and LC3B mRNA expressions were also inhibited by resistin treatment (Fig. 5I and J). Similar results were found concerning the expression of

ATG7 at both protein and mRNA levels (Fig. 5D, F and K). These effects were abolished in cells expressing siTLR4 (Fig. 5). We have also shown that Beclin-1 expression was slightly, but not significantly, inhibited by resistin and in cells lacking TLR-4, this effect is abolished (Fig. 5L). The starvation-induced downregulation of p62 was partially but significantly diminished by resistin treatment (Fig. 5G and H), this effect was strongly decreased in siTLR4 cells (Fig. 5G and H).

To further assess the role of resistin/TLR4 signaling pathway on autophagy, we measured LC3 expression in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . We have shown that the resistin-induced diminution of LC3I and LC3II in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  was completely abolished in siTLR4 cells (Fig. 6A and B). Furthermore, TLR4 silencing abolished the inhibitory effect of resistin on AMPK phosphorylation (Fig. 6C and D) and the resistin-dependent phosphorylation of Akt and mTOR (Fig. 6C, E and F).

We have also investigated the impact of TLR4 silencing on LC3 expression and accumulation in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  using immunohistochemistry approach. We confirmed that resistin reduced the accumulation of LC3 in the presence  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in serum-starved cells (Fig. 7A and B). In siTLR4 cells, resistin effect was strongly diminished as evidenced by a higher LC3 accumulation in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  as compared to control cells (Fig. 7A and B).



**Figure 5**

Resistin inhibits autophagy through TLR4. SH-SY5Y cells were treated by control siRNA and specific siRNA duplexes targeting TLR4. (A) Immunoblot of TLR4 in control and siTLR4-treated cells. The results were expressed as the ratio of TLR4/ $\beta$ -tubulin ( $n=3$ ). (B) (C) TLR4 mRNA levels were measured by real-time RT-PCR ( $n=3$ ) and normalized to  $\beta$ -actin in cells treated by control siRNA or siTLR4. (D) Immunoblots for LC3 and ATG7 in the presence or absence of serum, and in the presence or absence of resistin (200 ng/mL for 2 h) in SH-SY5Y cells treated with control siRNA or TLR4 siRNA ( $n=3$ ). The results were expressed as the ratio of LC3II/LC3I (E) and ATG 7/ $\beta$ -tubulin (F) ( $n=3$ ). (G) Immunoblots for p62 in the presence or absence of serum, and in the presence or absence of resistin (200 ng/mL for 2 h) in SH-SY5Y cells treated with control siRNA or TLR4 siRNA ( $n=3$ ). The results were expressed as the ratio of p62/ $\beta$ -tubulin (H) ( $n=3$ ). LC3A (I), LC3B (J), ATG 7 (K) and Beclin-1 (L) mRNA expression levels were determined by real-time RT-PCR ( $n=3$ ). The expression levels were normalized to  $\beta$ -actin. All the results are expressed as means  $\pm$  s.d. ( $n=3$ /group). Different letters indicate significant differences with  $P < 0.05$ . Each blot for TLR4, LC3, ATG7, p62 or  $\beta$ -tubulin is part of the same gel without any division or insertion.

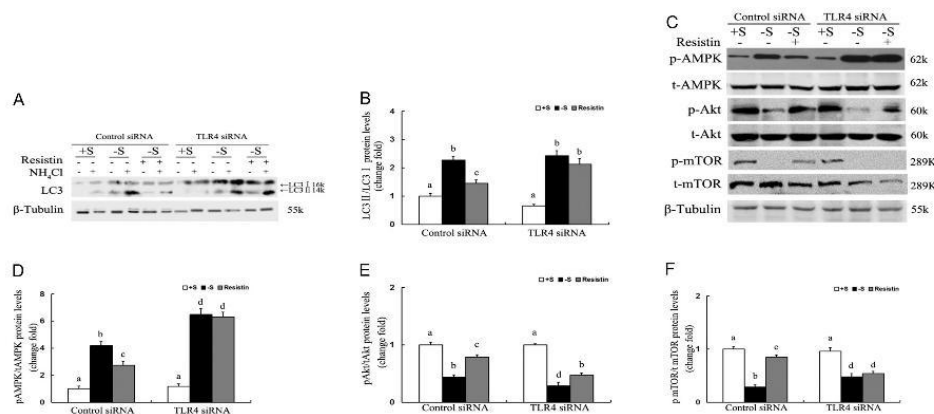
### Resistin inhibits autophagy and increases inflammation in the hypothalamus through TLR4

We next studied *in vivo* the impact of resistin on autophagy. For this purpose, we measured the expression of autophagy markers in the hypothalamus of WT mice and *Tlr4*<sup>-/-</sup> mice in response to resistin treatment. This treatment significantly reduced LC3A, LC3B, ATG7 and Beclin-1 mRNAs expression in WT mice (Fig. 8A, B, C and D). Importantly, resistin effect was completely abolished in the hypothalamus of *Tlr4*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 8A, B, C and D). Resistin treatment also increased the expression of pro-inflammatory cytokines IL6 and TNF $\alpha$  in the hypothalamus of WT mice but not in *Tlr4*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 8E and F). To further investigate the impact of resistin on autophagy, we measured the LC3 immunofluorescence in the arcuate nucleus in response to resistin in WT and *Tlr4*<sup>-/-</sup> mice. We showed that resistin ICV treatment for 3 days significantly reduced LC3 neuronal immunofluorescence (Fig. 9A and B). Resistin effect on LC3 immunofluorescence is completely abolished in *Tlr4*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 9C and D).

### Discussion

In the current study, we hypothesized that the activation of resistin/TLR4 signaling pathway could compromise autophagy in neuronal cells. Using human neuroblastoma SH-SY5Y cell line, we show that resistin treatment inhibits autophagy and increases inflammation in a TLR4-dependent manner TLR4. We also show that resistin activates Akt and mTOR phosphorylation and reduces that of AMPK. This could constitute the signaling pathways implicated in the resistin-dependent inhibition of autophagy. This study also shows that resistin is able to inhibit autophagy and to increase inflammation in mice hypothalamus through TLR4.

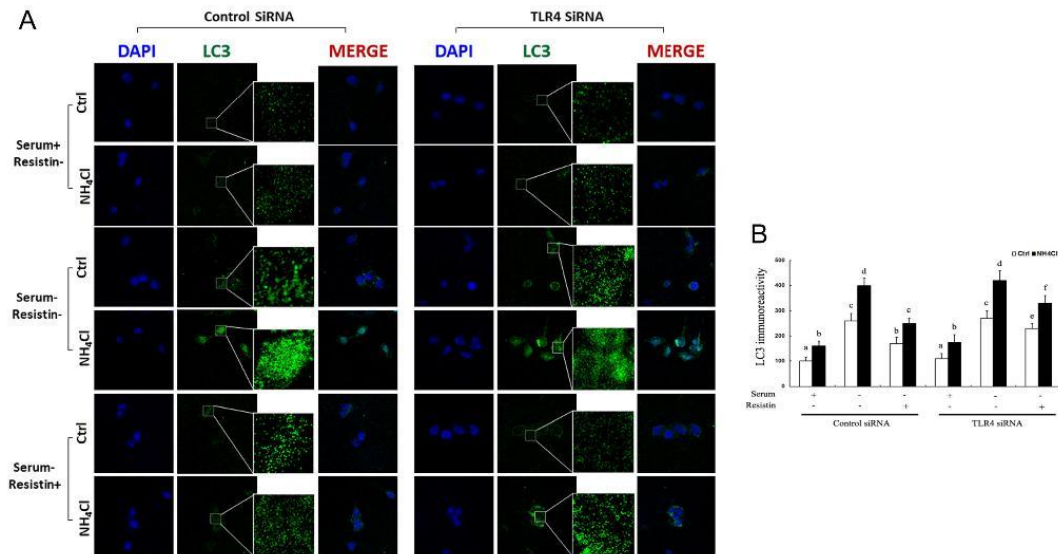
Recent studies associate compromised autophagy with the onset of obesity, insulin resistance and type 2 diabetes (Mizunoe *et al.* 2017, Moller *et al.* 2017). These metabolic disorders are characterized by the alteration of energy homeostasis control and low-grade inflammation status. The link between obesity and insulin resistance has been recognized for decades as reported in recent findings (Kahn & Flier 2000, Wellen & Hotamisligil 2003,

**Figure 6**

Resistin inhibits LC3II net flux and AMPK through TLR4. Immunoblots of LC3 in the presence of serum, or absence of serum or resistin (200 ng/mL for 2 h) treated with or without  $\text{NH}_4\text{Cl}$  lysosomal inhibitor in SH-SY5Y cells transfected by control siRNA or TLR4 siRNA (A). LC3 flux were determined by subtracting LC3-II densitometric value of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -untreated cells from corresponding cells treated with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (B) ( $n=3$ ). Panel C shows immunoblots of phosphorylated AMPK, mTOR and Akt in the presence of serum, or absence of serum or resistin (200 ng/mL for 2 h) in SH-SY5Y cells treated with control siRNA or TLR4 siRNA. The results were expressed as ratio of p-AMPK/t-AMPK (D), p-Akt/t-Akt (E) and pmTOR/mTOR (F), the protein load control is assessed by  $\beta$ -tubulin (C) ( $n=3$ ). All the results are expressed as means  $\pm$  s.d. ( $n=3$ /group). Different letters denote significant differences at  $P<0.05$  by ANOVA and Fisher *post hoc* test. Each blot for LC3, p-AMPK, t-AMPK, p-Akt, t-Akt, p-mTOR, t-mTOR or  $\beta$ -tubulin is part of the same gel without any division or insertion.

Benomar *et al.* 2016). In this context, inflammation is a common feature of obesity, insulin resistance and type 2 diabetes. Beside the deleterious effect of inflammation on peripheral tissues, its impact at the neuronal level especially in the hypothalamus is now recognized as a strong promoter of overall insulin resistance and inflammation (Thaler & Schwartz 2010, Cai & Lin 2011). Recent studies reported a novel mechanism linking neuroinflammation to whole-body insulin resistance onset orchestrated by resistin, an adipokine, which acts through the activation of hypothalamic TLR4 signaling pathway (Benomar *et al.* 2013, 2016). This promotes both hypothalamic and peripheral inflammation leading to the alteration of insulin, adiponectin and FGF21 signaling (Benomar *et al.* 2016). Furthermore, it has been reported that neuroinflammation impairs autophagy (Bosch & Kichian 2015, Su *et al.* 2016, Yerra & Kumar 2017), but the impact of resistin on autophagy was not yet investigated and remains unknown. Here, we used human neuroblastoma SH-SY5Y cell line as model to decipher the mechanism by which resistin could potentially affect neuronal autophagy. We firstly showed that serum starvation increases autophagy as evidenced by the higher expression of autophagy markers. This is in good agreement with previously published data showing that cell energy restriction increased autophagy to fulfill cell energy needs (Yang *et al.* 2016). We show

that resistin inhibits starvation-induced autophagy, and this effect is exacerbated in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , an inhibitor of autophagosomal degradation. Thus, resistin strongly diminished LC3II net flux. This is the first study demonstrating the role of resistin in the inhibition of neuronal autophagy. Thus, besides its deleterious effects such neuroinflammation and the alteration of both insulin and adiponectin signaling at the neuronal level (Benomar *et al.* 2013, 2016), resistin inhibits neuronal autophagy, which is considered as a neuronal protective mechanism during fasting conditions or nutrient deprivation (Du *et al.* 2009, Alirezaci *et al.* 2010). Furthermore, we decipher the signaling pathways involved in resistin action and demonstrate that resistin reduced the starvation-induced AMPK phosphorylation. Indeed, this is in good agreement with previous reports demonstrating that AMPK phosphorylation promotes autophagy in the hypothalamus and increases NPY and decreases POMC expressions (Oh *et al.* 2016). Resistin treatment also increased mTOR and Akt phosphorylation contributing most likely to the inhibition of neuronal autophagy. This finding corroborates with previous reports where the inhibition of mTOR promoted autophagy (Lee *et al.* 2010, Alers *et al.* 2012). Interestingly, our findings show that resistin increased the expression of TLR4, the binding site for resistin (Benomar *et al.* 2013); this may further potentiate the resistin-induced inhibition of neuronal

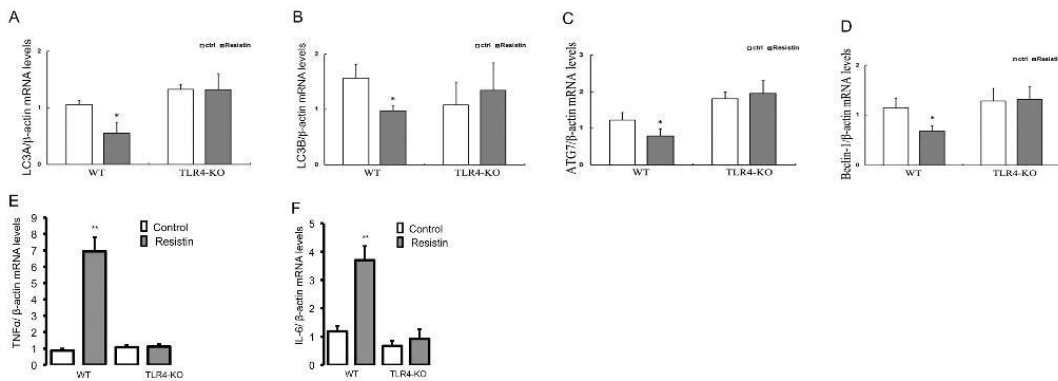


**Figure 7**

The immunohistochemical distribution of LC3 is inhibited by resistin in TLR4-dependent manner even in the presence of NH<sub>4</sub>Cl. (A) LC3 distribution was assessed by immunocytochemistry assay. SH-SY5Y was labeled for LC3 using anti-LC3 antibodies (green) and DAPI (blue, nuclei). Figures are representative of three independent experiments (bar = 20 μm). siControl or siTLR4 Cells were pretreated with inhibitor NH<sub>4</sub>Cl (10 mM) (an inhibitor of lysosomal degradation) or without NH<sub>4</sub>Cl for 1 h in the presence or not of resistin. (B) Quantification of the number of LC3 puncta immunoreactivity (green) per cell in each condition (>20 cells per group). All data are means ± s.d. (n = 3–6/group). Different letters indicate a significant difference with  $P < 0.05$ .

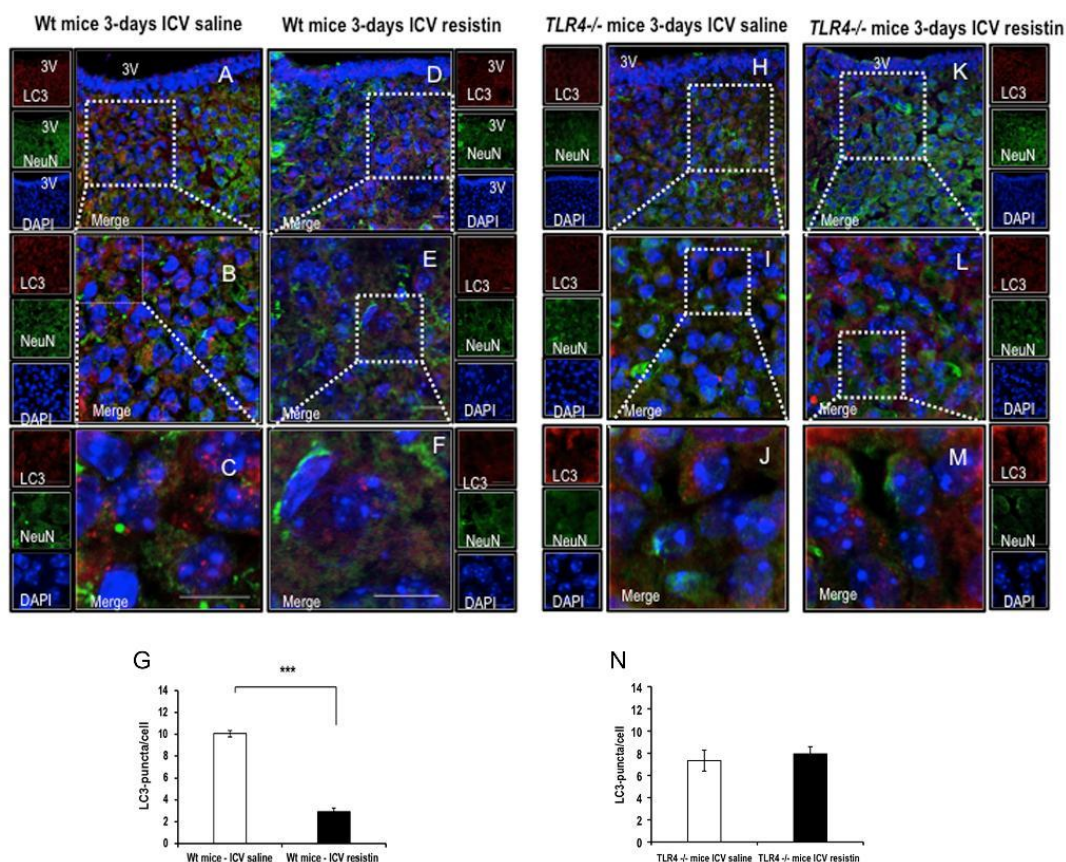
autophagy. This is further evidenced in si-TLR4 neuronal cells where resistin was unable to diminish or increase AMPK or mTOR/Akt phosphorylation, respectively. It is noteworthy to indicate that resistin is able to inhibit

autophagy markers at the mRNA levels; however, the underlying mechanisms are unknown. Taken together, these data indicate that resistin compromises neuronal autophagy through TLR4. Importantly, this finding was



**Figure 8**

Resistin/TLR4 pathway decreases autophagy and increases inflammation in mice hypothalamus. Male WT C57BL mice or TLR4-knockout mice were treated through ICV route by resistin (1.2 μg/day) or placebo for 3 days. At the end of the infusion period, the animals were killed. LC3I (A), LC3II (B), ATG7 (C), Beclin-1 (D), TNFα (E) and IL6 (F) mRNA were measured by real-time RT-PCR in hypothalamus of mice. Results were normalized to β-actin. All data are expressed as means ± s.d. (n = 3–6/group). \* and \*\* indicate respectively  $P < 0.05$  and  $P < 0.005$  when comparing control to resistin treatment.



**Figure 9**

Resistin/TLR4 pathway decreases hypothalamic neuronal LC3 immunofluorescence. Immunofluorescence detection of LC3 protein (autophagy marker) and NeuN (neuronal marker) was performed in coronal sections of hypothalamus (20  $\mu$ m) from mice ( $n=2$ ) that have received 3-day ICV resistin infusion (1.2  $\mu$ g/day/mice) or saline. WT or TLR<sup>-/-</sup> mice were used. (A, B and C) LC3 and NeuN staining throughout the ARC of Wt mice that received 3-day ICV of saline. (D, E and F) LC3 and NeuN staining of Wt mice ARC that received 3-day ICV of resistin. (A) Low-magnification view (original magnification ( $\times 40$ )). The dashed box represents the view in B. (B) Higher-magnification view (zoom  $\times 2$ , original magnification ( $\times 40$ )). The dashed box represents the view in C. (C) Higher-magnification view (zoom  $\times 6$ , original magnification ( $\times 40$ )). (D) Low-magnification view (original magnification ( $\times 40$ )). The dashed box represents the view in E. (E) Higher-magnification view (zoom  $\times 2$ , original magnification ( $\times 40$ )). The dashed box represents the view in F. (F) Higher-magnification view (zoom  $\times 6$ , original magnification ( $\times 40$ )). Scale bar 10  $\mu$ m, 3V third ventricle. (G) Quantification of the number of LC3 puncta immunoreactivity (red) per cell in each condition ( $>20$  cells per group). All data are means  $\pm$  s.d. \*\*\* indicates  $P < 0.01$ . (H, I and J) LC3 and NeuN staining throughout the ARC of KO TLR4 mice that received 3-day ICV of saline. (K, L and M) LC3 and NeuN staining throughout the ARC of KO TLR4 mice that received 3-day ICV of resistin. (H) Low-magnification view (original magnification ( $\times 40$ )). The dashed box represents the view in I. (I) Higher-magnification view (zoom  $\times 2$ , original magnification ( $\times 40$ )). The dashed box represents the view in J. (J) Higher-magnification view (zoom  $\times 6$ , original magnification ( $\times 40$ )). (K) Low-magnification view (original magnification ( $\times 40$ )). The dashed box represents the view in L. (L) Higher-magnification view (zoom  $\times 2$ , original magnification ( $\times 40$ )). The dashed box represents the view in M. (M) Higher-magnification view (zoom  $\times 6$ , original magnification ( $\times 40$ )). Scale bar 10  $\mu$ m, 3V third ventricle. (N) Quantification of the number of LC3 puncta immunoreactivity (red) per cell in each condition ( $>20$  cells per group).

confirmed *in vivo* using mice lacking TLR4, where the resistin-dependent inhibition of autophagy is completely abolished. We have chosen the ICV route for resistin because we aimed to investigate the role of central resistin on hypothalamic autophagy to validate data obtained in cell model. Indeed, resistin intravenous or intraperitoneal

treatment might implicate other peripheral components (for instance, inflammatory cytokines) and thus the direct effect of resistin on hypothalamic autophagy would be difficult to evaluate. For the same reasons, we have used mice-fed chow diet and not HFD, in order to only evaluate the effect of central resistin without

interference of metabolic or hormonal changes induced by HFD. However, as we have clearly established the role of central resistin, it would be interesting to evaluate resistin effects on HFD context in order to mimic the human situation. Furthermore, our investigation is also limited because we did not perform power analysis of the animals needed. Indeed, we have introduced the mice model in order to validate the direct resistin/TLR4 effects on hypothalamic autophagy. Thus, further experiments with more animals are needed to investigate the impact of HFD on hypothalamic resistin-dependent inhibition of autophagy. The implication of TLR4 as a negative regulator of autophagy has been previously reported at the cardiac level where TLR4 knockout promoted autophagy in a context of HFD (Hu & Zhang 2017). Furthermore, we have previously demonstrated that resistin/TLR4 signaling pathway at the neuronal level directly activates inflammatory pathways such as JNK, p38 MAP kinase and induces IL6 and TNF $\alpha$  expression contributing to the low-grade inflammation (Benomar et al. 2013). This inflammatory status contributes to the deregulation of cellular energy homeostasis that is evidenced by a deep alteration of autophagy. However, one limitation of our study is that we cannot translate these findings to humans. Indeed, further *in vivo* experiments are needed for the translation of the results to the clinic.

In summary, our study reveals resistin/TLR4 signaling pathway as a novel mechanism for the negative regulation of autophagy at the neuronal and hypothalamic levels. Indeed, our findings clearly link resistin-induced low-grade inflammation to the impairment of neuronal autophagy. In conclusion, our findings could contribute to the understanding of the underlying mechanisms linking neuroinflammation to the alteration of neuronal autophagy.

#### Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

#### Funding

This work is supported by the National Natural Science Foundation of China (Project #81300725, M J). This work is also supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the University of Paris-Sud and University of Paris-Saclay.

#### Authors' contribution statement

M T and J M conceived and designed the experiments; J M, Y B, S A R, G P, L R and D C performed experiments; M T and J M analyzed the data.

M T wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript prior to its submission.

## References

- Alers S, Loffler AS, Wessborg S & Stork B 2012 Role of AMPK-mTOR-ULK1/2 in the regulation of autophagy: cross-talk, shortcuts, and feed-backs. *Molecular and Cellular Biology* **32** 2–11. (<https://doi.org/10.1128/MCB.06159-11>)
- Alirezaci M, Kembal CC, Flynn CT, Wood MR, Whitton JL & Kiosses WB 2010 Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy* **6** 702–710. (<https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12376>)
- Benomar Y, Gertler A, De Lacy P, Crépin D, Ould Hamouda H, Riffault L & Taouis M 2013 Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes* **62** 102–114. (<https://doi.org/10.2337/db12-0237>)
- Benomar Y, Amine H, Crépin D, Al Rifai S, Riffault L, Gertler A & Taouis M 2016 Central resistin/TLR4 impairs adiponectin signaling, contributing to insulin and FGF21 resistance. *Diabetes* **65** 913–926. (<https://doi.org/10.2337/db15-1029>)
- Bosch ME & Kichian T 2015 Neuroinflammatory paradigms in lysosomal storage diseases. *Frontiers in Neuroscience* **9** 417. (<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00417>)
- Brunetti L, Orlando G, Recinella L, Michelotto B, Ferrante C & Vacca M 2004 Resistin, but not adiponectin, inhibits dopamine and norepinephrine release in the hypothalamus. *European Journal of Pharmacology* **493** 41–44. (<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.04.020>)
- Cai D & Lin T 2011 Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1243** E1–E39. (<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06388.x>)
- De Laveria I, Pavon AD, Paz MV, Oropesa-Avila M, de la Mata M, Alcocer-Gomez E, Garrido-Maraver J, Cotan D, Alvarez-Cordoba M & Sanchez-Alcazar JA 2017 The connections among autophagy, inflammasome and mitochondria. *Current Drug Targets* **18** 1030–1038. (<https://doi.org/10.2174/1389450117666160527143143>)
- Du L, Hickey RW, Bayir H, Watkins SC, Tyurin VA, Guo F, Kochanek PM, Jenkins LW, Ren J, Gibson G, et al. 2009 Starving neurons show sex difference in autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **284** 2383–2396. (<https://doi.org/10.1074/jbc.M804396200>)
- Fahy D, Sanad MN, Duscha K, Lyons M, Lin E, Bozhkov P, Kunz HH, An J, Neuhans HE, Steel PG, et al. 2017 Impact of salt stress, cell death and autophagy on peroxisomes: quantitative and morphological analyses using small fluorescent probe N-BODIPY. *Scientific Reports* **7** 39069. (<https://doi.org/10.1038/srep39069>)
- Hu N & Zhang Y 2017 TLR4 knockout attenuated high fat diet-induced cardiac dysfunction via NF- $\kappa$ B: JNK-dependent activation of autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta* **1863** 2001–2011. (<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.010>)
- Kahn BB & Hler JS 2000 Obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **151** 4109–4115.
- Lee JW, Park S, Takahashi Y & Wang HG 2010 The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS ONE* **5** e15394. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015394>)
- Mizunoe Y, Sudo Y, Okita N, Hiraoka H, Mikami K, Narahara T, Nagishi A, Yoshida M, Higashibata R, Watanabe S, et al. 2017 Involvement of lysosomal dysfunction in autophagosome accumulation and early pathologies in adipose tissue of obese mice. *Autophagy* **13** 642–653. (<https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1274850>)
- Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi T & Ohsumi Y 2004 In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell* **15** 1101–1111. (<https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0704>)

- Mojiminiyi OA & Abdella NA 2007 Association of resistin with inflammation and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* **67** 215–225. (<https://doi.org/10.1080/00365510601032532>)
- Moller AB, Kampmann U, Hedegaard J, Thorsen K, Nordentoft I, Vendalbo, MH, Moller N & Jessen N 2017 Altered gene expression and repressed markers of autophagy in skeletal muscle of insulin resistant patients with type 2 diabetes. *Scientific Reports* **2** 43775. (<https://doi.org/10.1038/srep43775>)
- Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala NW, Scherer PE & Rossetti L 2004 Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **114** 232–239. (<https://doi.org/10.1172/JCI200421270>)
- Muse ED, Lam TK, Scherer PE & Rossetti L 2007 Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **117** 1670–1678. (<https://doi.org/10.1172/JCI30440>)
- Oh TS, Cho H, Cho JH, Yu SW & Kim EK 2016 Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression. *Autophagy* **11** 2009–2025. (<https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1215382>)
- Olefsky JM & Glass CK 2010 Macrophages, inflammation and insulin resistance. *Annual Review of Physiology* **72** 219–246. (<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135846>)
- Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphhee CH & Smith SA 2003 Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated PPAR gamma activators. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **300** 472–476. ([https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02841-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02841-3))
- Qi Y, Nie Z, Lee YS, Singhal NS, Scherer PE, Lazar MA & Ahima RS 2006 Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* **55** 3083–3090. (<https://doi.org/10.2337/db05-0615>)
- Rajal MW, Obici S, Scherer PE & Rossetti L 2003 Adipose derived resistin and gut-derived resistin-like molecule beta selectively impair insulin action on glucose production. *Journal of Clinical Investigation* **111** 225–230. (<https://doi.org/10.1172/JCI16521>)
- Reilly MP, Lehrke M, Wolfe ML, Rohatgi A, Lazar MA & Rader J 2005 Resistin is an inflammatory marker of atherosclerosis in humans. *Circulation* **111** 932–939. (<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000155620.10387.43>)
- Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I & Olefski JM 2004 Adenovirus-mediated chronic hyperresistinemia leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *Journal of Clinical Investigation* **114** 224–231. (<https://doi.org/10.1172/JCI20785>)
- Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV & O'Rahilly S 2001 Resistin/Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes* **50** 2199–2202. (<https://doi.org/10.2337/diabetes.50.10.2199>)
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* **409** 307–312. (<https://doi.org/10.1038/35053000>)
- Su P, Zhang J, Wang D, Zhao F, Cao Z, Aschner M & Luo W 2016 The role of autophagy in modulation of neuroinflammation in microglia. *Neuroscience* **319** 155–167. (<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.01.035>)
- Thaler JP & Schwartz MW 2010 Inflammation and obesity pathogenesis: the hypothalamus heats up. *Endocrinology* **151** 4109–4115. (<https://doi.org/10.1210/en.2010-0336>)
- Vasquez MJ, Gonzalez CR, Varela L, Lage R, Tovar S, Sangiao-Alvarellos S, Williams LM, Vidal-puig, A, Nogueiras, R, Lopez M, et al. 2008 Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional dependent fashion. *Endocrinology* **149** 4534–4543. (<https://doi.org/10.1210/en.2007-1708>)
- Wellen KE & Hotamisligil GS 2003 Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *Journal of Clinical Investigation* **112** 1785–1788. (<https://doi.org/10.1172/JCI20514>)
- Wilkinson M, Wilkinson D, Wiesner G, Morash B & Ur E 2005 Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanocostimulating hormone. *Neuroendocrinology* **81** 19–30. (<https://doi.org/10.1159/000084871>)
- Yang L, Licastro D, Cave E, Veronese N, Spetta F, Rizza W, Bertozzi B, Villareal DT, Hotamisligil GS, Holloszy JD, et al. 2016 Long-term caloric restriction enhances cellular quality-control processes in human skeletal muscle. *Cell Reports* **14** 422–428. (<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.042>)
- Yerra VG & Kumar A 2017 Adenosine-monophosphate-activated protein kinase abates hyperglycemia-induced neuronal injury in experimental models of diabetic neuropathy: effect on mitochondrial biogenesis, autophagy and neuroinflammation. *Molecular Neurobiology* **54** 2301–2312. (<https://doi.org/10.1007/s12035-016-9824-3>)

Received in final form 15 May 2018

Accepted 17 May 2018

Accepted Preprint published online 17 May 2018

## RESEARCH ARTICLE

# Maternal resistin predisposes offspring to hypothalamic inflammation and body weight gain

Ghislaine Poizat, Coralie Alexandre, Sarah Al Rifai, Laure Riffault, Delphine Crepin, Yacir Benomar, Mohammed Taouis\*

CNRS NeuroPSI UMR 9197, Molecular Neuroendocrinology of Food Intake, University Paris-Sud, University Paris-Saclay, Orsay, France

\* [mohammed.taouis@u-psud.fr](mailto:mohammed.taouis@u-psud.fr)



## Abstract

Resistin promotes hypothalamic neuroinflammation and insulin resistance through Toll like receptor 4 (TLR4), this hormone is thought to be a link between obesity and insulin-resistance. Indeed, resistin plasma levels are higher in obese and insulin resistant subjects. However, the impact of maternal resistin on the predisposition of offspring to hypothalamic neuroinflammation is unknown. Here, female mice were treated with resistin during gestation/lactation periods, then hypothalamic neuroinflammation was investigated in male offspring at p28 and p90. At p28, resistin increased the expression of inflammation markers (IL6, TNF $\alpha$  and NF $\kappa$ B) and TLR4 in the hypothalamus and decreased both hypothalamic insulin and leptin receptors' expression. The hypothalamic up-regulation IL6, TNF $\alpha$  and TLR4 was sustained until p90 promoting most likely hypothalamic inflammation. Maternal resistin also increased IL6 and TNF $\alpha$  in the adipose tissue of offspring at p90 associated with a higher body weight gain. In contrast, liver and muscle were not affected. These findings reveal that the augmentation of maternal resistin during gestation and lactation promotes hypothalamic and adipose tissue inflammation of offspring as evidenced by sustained increase of inflammation markers from weaning to adulthood. Thus, maternal resistin programs offspring hypothalamic and adipose tissue inflammation predisposing then offspring to body weight gain.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Poizat G, Alexandre C, Al Rifai S, Riffault L, Crepin D, Benomar Y, et al. (2019) Maternal resistin predisposes offspring to hypothalamic inflammation and body weight gain. *PLoS ONE* 14 (3): e0213267. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213267>

**Editor:** Jonathan M. Peterson, East Tennessee State University, UNITED STATES

**Received:** July 12, 2018

**Accepted:** February 18, 2019

**Published:** March 7, 2019

**Copyright:** © 2019 Poizat et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work is supported by University Paris Sud and CNRS.

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

## Introduction

The low-grade inflammation in obese, insulin-resistant or type-2 diabetes subjects is an important issue in developmental programming of inflammation and its long-term consequences on offspring [1, 2]. Indeed, hypercaloric maternal diet programs inflammation in offspring tissues [3–6]. Moreover, accumulated evidences suggest that changes of inflammatory markers in early life could have a strong impact on the prevalence of metabolic and cardiovascular diseases [7–9]. It has been suggested that offspring inflammation is promoted by LPS-induced maternal inflammation. This treatment led to strong changes in offspring immune system



evidenced by more pro-inflammatory macrophages M1 and a higher Interleukin-1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) production [10, 11]. It is also well documented that maternal obesity increased pro-inflammatory cytokine in the placenta enhancing then inflammatory responses of offspring. Furthermore, fatty acids, cholesterol, and triglyceride plasma levels were increased in fetuses born to obese ewes that also exhibited up-regulated Toll Like Receptor 4 (TLR4), Nuclear Factor-kappa B (NF $\kappa$ B) and c-Jun N-Terminal kinase (JNK) [12]. TLR4 is considered as the binding site for LPS and, more recently TLR4 was described as a receptor for resistin, an adipokine [13, 14]. Resistin is implicated in the onset of low-grade inflammation found in obese or insulin resistant rodent models [15, 16]. Indeed, resistin decreases insulin responsiveness and contributes to the onset of type 2 diabetes [17]. Interestingly, intracerebroventricular (ICV) resistin treatment induces overall inflammation and insulin resistance through the activation of hypothalamic TLR4 signaling pathway. This treatment also altered both adiponectin and FGF21 signaling pathways known as insulin sensitizers [18]. These findings are in line with previous studies suggesting that resistin links obesity to insulin resistance [17]. The impact of resistin during pregnancy on the placenta and offspring has been suspected. Indeed, resistin is expressed in human placenta, and it has been suggested that placental resistin modulates insulin sensitivity during pregnancy [19]. Furthermore, resistin plasma levels are increased in women with gestational diabetes [20–22]. However, this augmentation remains controversial, since other studies reported that gestational diabetes does not affect plasma resistin levels [23]. Moreover, several studies reported high resistin plasma levels in pregnant women as compared to non-pregnant women [22, 24]. It has been also reported that TLR4 was highly expressed in the placenta of obese women as compared to lean women, suggesting the implication of TLR4 in placental inflammation that could affect the fetus [25]. Based on our previous findings demonstrating the implication of hypothalamic resistin/TLR4 signaling pathway in the onset of inflammation and insulin resistance [14], we hypothesized that maternal resistin could be implicated in the predisposition of offspring to inflammation and insulin resistance especially when subjected to inappropriate diet such as HFD. Indeed, the role and the implication of maternal resistin on the development of inflammation in offspring are still unknown especially at the hypothalamic level. Thus, in the present study, we aim to investigate whether maternal resistin has long-term effects on the predisposition of offspring to develop inflammation and metabolic disorders when subjected to HFD, with a special focus on hypothalamic neuroinflammation, termed as perinatal programmed hypothalamic inflammation. Indeed, HFD is known to promote inflammation and in this study feeding CC and CR offspring with HFD from p60 to p90 will respond to the question whether offspring born to dams treated with resistin (CR group) are prone to hypothalamic inflammation and alterations of metabolic parameters as compared CC group. For this purpose, pregnant mice were treated with resistin during gestation and lactation and then we analyzed the expression of inflammation markers in the hypothalamus and adipose tissue together with body weight gain and metabolic parameters of male offspring at p28 and adult mice following a 30 days HFD challenge.

## Methods

### Animals

Swiss adult female mice (Janvier labs) were randomly divided in 2 groups in individual cages, in a temperature-controlled environment with 12-h light 12-h dark cycles and unrestricted access to water and standard chow diet (SAFE, Augy, France). Housing females were mated with Swiss CD1 males during two days. All experimental procedures were performed according to the institutional guidelines of laboratory animal care and approved by the governmental commission of animal research: Ethic Committee for animal experimentation of Paris Center

and South # 59 (France), with authorization # 2016–3. The number of animals used in each group has been determined after power test analysis using R Software Two Sample t-test calculation (RcmdrPlugin.IPSUR) as previously described [26]. Pregnant females were maintained in individual cages and during pregnancy; dams were daily injected intraperitoneally with physiologic saline (CC for Chow Diet Control group) or with human Resistin (obtained from Shenandoah Biotechnology, Warwick, PA, USA) at a dose of 20µg/animal (CR for Chow diet Resistin group) (Fig 1A). Body weight of dams was measured every day during gestation and every 2–3 days during lactation period until weaning. During the first 2 weeks of lactation period, dams were injected intraperitoneally with physiologic saline (CC group) or with human Resistin (CR group) at a dose of 20µg/animal every two days. Litter size was adjusted to 13–14 animals per dam in average. At weaning (p28), only males were used for the following experiments. Indeed, in this pilot project in the field of maternal programmed neuroinflammation we firstly focused on male in order to avoid potential sexual dimorphism for the studied parameters. Additionally, for budgetary reasons we decided to perform another investigation for female. Thus, female mice were donated to colleagues for another project. For the present experiment, 10 males per group were maintained and fed standard chow diet (19.6% proteins, 11.9% lipids, 68.5% carbohydrates) until day 60 (p60). At this age, animals were switched to a high fat diet (HFD 235HF-U8955 version2-SAFE, 15.6% proteins, 44.6% lipids, 39.9% carbohydrates, these values are percent of total calories) from p60 to p90. Animals weight and food intake are regularly measured. Indeed, offspring body weight and food intake were measured twice a week from P60 to P90.

Sacrifice of overnight fasted animals was done at weaning for dams and p28 or p90 for offspring.

### Serum and tissue collection

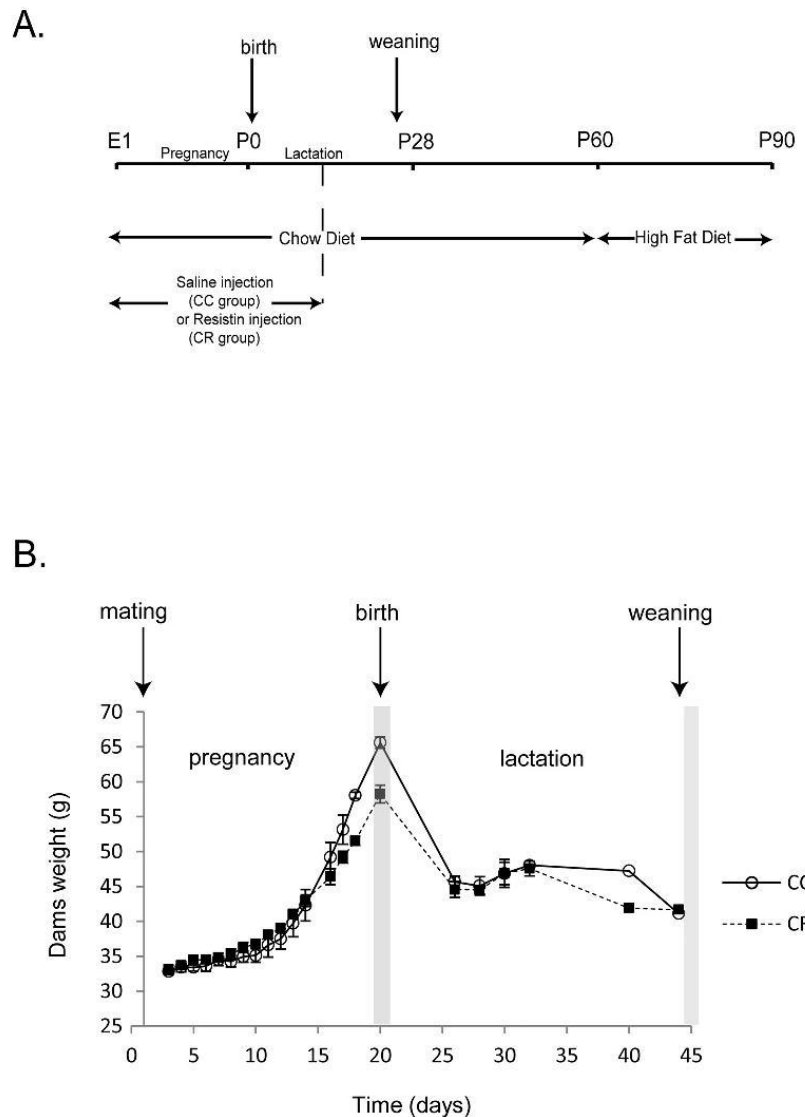
Mice were rapidly decapitated and then blood was collected immediately in tubes containing 12U/mL of heparin, plasma was prepared after blood centrifugation at 2000 g at 4°C during 15 minutes and then stored at -20°C until assayed for ELISA experiments. Brain was extracted and the hypothalamus was immediately dissected out, flash-frozen in liquid nitrogen and then store at -80°C. The quality of hypothalamus dissection is routinely validated by the measurement of Pro-Opiomelanocortin (POMC) expression. Liver, muscle and abdominal adipose tissue (AAT) were also collected and flash-frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C.

### Measurement of plasma hormones and cytokines

Plasma levels of resistin, insulin, leptin, Interleukin-6 (IL6) and Tumor Necrosis Factor (TNF $\alpha$ ) were determined by ELISA. ELISA kits for IL6 (M6000B) and TNF $\alpha$  and resistin (MRSN00) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and those for insulin (EZRMI-13K) and leptin (EZML-82K) were from Millipore (Burlington, VT, USA). The measurements were performed according to manufacturer recommendations using plasma samples stored at -20°C.

### Glucose tolerance test (GTT)

The intraperitoneal GTT was performed after fasting the mice overnight. Basal glycemia (time 0) of overnight fasted mice (p28 or p90) is measured prior to intraperitoneal injection of glucose (2 mg/kg) and then tail blood samples were collected to measure glycemia 15, 30, 60, 120 min and 200 min after the injection. Plasma glucose was monitored using Accu-Check system (Roche, France). The first drop of blood is discarded and the second used for measurement.



**Fig 1. Impact of resistin treatment on dams' body weight during pregnancy and lactation.** Experimental protocol: Dams were treated with saline (CC group) or resistin 20 µg/animal (CR group) and fed with standard diet (Chow Diet). Dams received daily injections of saline or resistin during pregnancy and every two days during the first two weeks of lactation period. From weaning to p60, offspring were fed Chow diet and then switched to high fat diet (HFD) from p60 to p90. Sacrifice of animals has been done just after weaning for dams and a part of offspring, and at p90 for the rest of offspring. B- Dams body weight from pregnancy to weaning. Dams body weight (g) is expressed as mean ± SEM. No significant difference between CC and CR Group (n = 4) has been noticed using non-parametric ANOVA statistical test for longitudinal data.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213267.g001>

## Hormones and chemical

Human Resistin is from Shenandoah Biotechnology (Warwick, PA, USA). D-Glucose is from Euromedex (Souffelweyersheim, France).

## RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNA from mice was isolated using Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). 0.5 µg of RNA was reverse transcribed and the cDNA were submitted to Quantitative real-time PCR analysis using SYBR Green QPCR system (Biorad, Les Ulis, France). qScript cDNA Synthesis Kit and SYBR Green mix kit are from VWR (Fontenay sous Bois, France). Specific primers are from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA): IL6 (sense: 5' GCCTTC TTGGGACTGATGCTGGT3', antisense: 5' TCCTCTGTGAAGTCTCCTCTCCG3'), TNF $\alpha$  (sense: 5' AAGTCAACCTCTCTGCC3', antisense: 5' TCCAAAGTAGACCTGCCCG3'); TLR4 (sense: 5' CTGGGGAGGCACATCTTCTGG3', antisense: 5' TGCCGTTTCTTGTCTTCCCTCTGCT3'), resistin (sense: 5' CCCAGAAGGCACAGCAG3', antisense: 5' TCACGAATGTCCACGAGC3'), NF $\kappa$ b (sense: 5' ACAGATGGGCTACACAGAGG3', antisense: 5' GTGGAGGAAGACGAGAGAGG3'), GFAP (sense: 5' AAGAGACAGAGGAGTGGTATCGG3', antisense: 5' GCTTCGTGCTTGGCTTGGC3'), IBA1 (sense: 5' GAAAGGGGAAGTGTGAG A3', antisense: 5' TGGCTCATGGCTCCTCA G3'), CD68 (sense: 5' GGGGCTCTGGGAACACAA3', antisense: 5' GAGAGACAGGTGGGGATG3'), ICAM1 (sense: 5' GACACCCCTGACCTCC TG3', antisense: 5' CTGCTGGTTTGTGCTCTCCTG3'), IR (sense: 5' GCCGCCTCTATGCT CTGGTATC3', antisense: 5' GAGTGATGGTGAGGTTGTGTTTGC3'), PTP1B (sense: 5' CTCTTCTCCAGCCACCAGT3', antisense: 5' CCACCATCCGTCTCCTAACT3'), SOCS3 (sense: 5' CCAGCTCCAGCTTCTTTCAAGT3', antisense: 5' GAGAGTCCGCTTGTCAAAGGTATT G3'), LepR (Taqman primers designed by Applied Biosystems). All results are normalized with 18S and GAPDH mRNA expression (and sometimes Actin mRNA). These house-keeping genes were previously tested in this model and specifically in each tissue. All samples were measured in duplicates.

## Data analysis and statistics

Dams weight and plasma glucose levels during GTT are expressed as mean  $\pm$ SEM. GTT Area under curve quantification has been done with imageJ and Excel Software. Metabolic/endo-crine data and qPCR mRNA results are represented as boxplots made with R software, showing median and interquartile range (Q1-Q3).

The number of animals used in each experiment was determined by power test analysis using R Software Two sample t-test calculation (RcmdrPlugin.IPSUR) based on previous experiments (14, 18) considering an  $\alpha$  risk of 0,05% and a power of 90% ( $p < 0.05$ ).

Mann & Whitney non-parametric test has been used for all statistical analysis using Excel or R software ( $n = 4-9$  per group). For dams' body weight analysis and glucose tolerance test (GTT) experiments, non parametric ANOVA including longitudinal data has been performed with R Software and nparLD library.

## Results

### Increased body weight, insulinemia and leptinemia of offspring born to dams treated with resistin

Female mice were treated with resistin or placebo during a period covering from pregnancy to the two first weeks of lactation (Fig 1A). Firstly, we have measured dams' body weight from pregnancy to weaning. We noticed that resistin treatment did not affect body weight (Fig 1B).

**Table 1. Impact of maternal resistin on metabolic and endocrine parameters.**

	Dams (at weaning)		P28 Offspring		P90 Offspring	
	CC	CR	CC	CR	CC	CR
Body weight (g)	41.1±1	41.7±0.3	12.69±0.26	17.08±1.95	40.5±1.1	45.8±1.8*
Plasma Glucose (g/L)	1.74±0.06	1.64±0.12	0.96±0.08	0.84±0.1	0.88±0.04	0.86±0.07
Plasma Insulin (ng/mL)	0.72±0.04	0.5±0.22	0.52±0.14	0.48±0.09	0.2±0.02	1.16±0.41*
Plasma Leptin (ng/mL)	1.97±0.63	4.70±1.09	0.05±0.03	0.20±0.14	0.52±0.21	3.56±1.25*
Plasma Resistin (ng/mL)	42.54±3.57	45.41±0.60	12.56±1.01	6.47±0.61*	11.47±2.44	7.74±2.16

Impact of maternal resistin on Body weight and metabolic/endocrine parameters. Dams were treated with physiologic saline (CC) or resistin (20 mg/animal) during pregnancy and lactation. Body weight, plasma levels of glucose, insulin, leptin and resistin were measured in dams at weaning, and offspring at p28 and p90. All data are expressed as mean ± SEM (n = 4–9 per group for body weight analysis and 4–5 per group for plasma measurements).

\* P<0.05 compared to CC group by non-parametric Mann & Whitney statistical test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213267.t001>

Moreover, this treatment did not alter metabolic or endocrine parameters of dams despite a slight but non-significant increase of leptin plasma levels (Table 1). The offspring were subjected to normal diet from weaning (p28) to p60 and then switched to high fat diet from p60 to p90. At p28, offspring exhibit a slight but not significant increase of body weight (Table 1). Plasma glucose, leptin or insulin levels of offspring born to dams treated with resistin (CR) were not affected. At p90, body weight, insulinemia and leptinemia were significantly increased in CR as compared to CC group (Table 1).

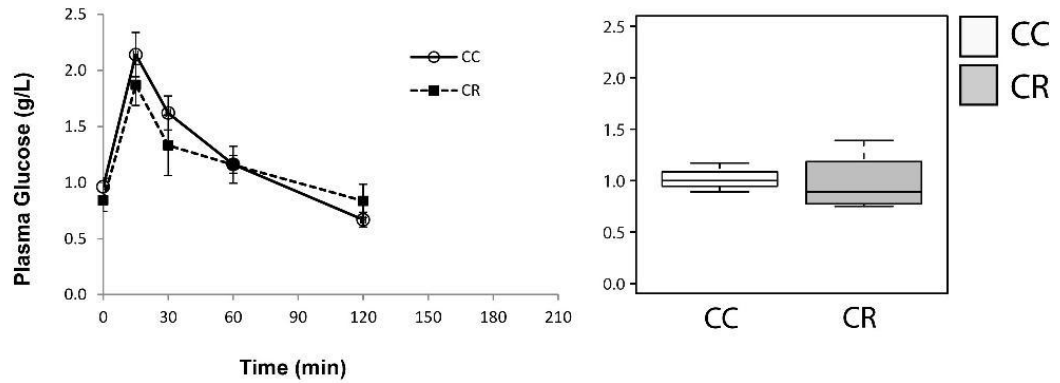
Resistin plasma levels were not affected by dams' resistin treatment. Indeed, a slight but non-significant increase was found in CR dams as compared to CC dams. In offspring at p90, resistin plasma levels were not affected for CC and CR, respectively. In contrast, in p28 offspring resistin plasma levels were significantly decreased in CR group as compared to CC (Table 1).

Moreover, the plasma levels of pro-inflammatory markers IL6 and TNF $\alpha$  were measured in dams and offspring. In dams plasma levels of IL6 (15.96 ± 5.95 pg/mL vs 18.91 ± 16 pg/mL for CC and CR, respectively) and TNF $\alpha$  (11.49 ± 3.25 pg/mL vs 11.81 ± 5.35 pg/mL for CC and CR, respectively) were not affected by resistin treatment. At p28, IL6 and TNF $\alpha$  plasma levels were not detectable (below ELISA KIT threshold sensitivity). Similarly to dams, in p90 offspring plasma levels of IL6 (4.77 ± 0.27 pg/mL vs 5.58 ± 0.26 pg/mL for CC and CR, respectively) and TNF $\alpha$  (12.74 ± 5.94 pg/mL vs 12.32 ± 5.24 pg/mL for CC and CR, respectively) exhibit similar values when comparing CC to CR groups.

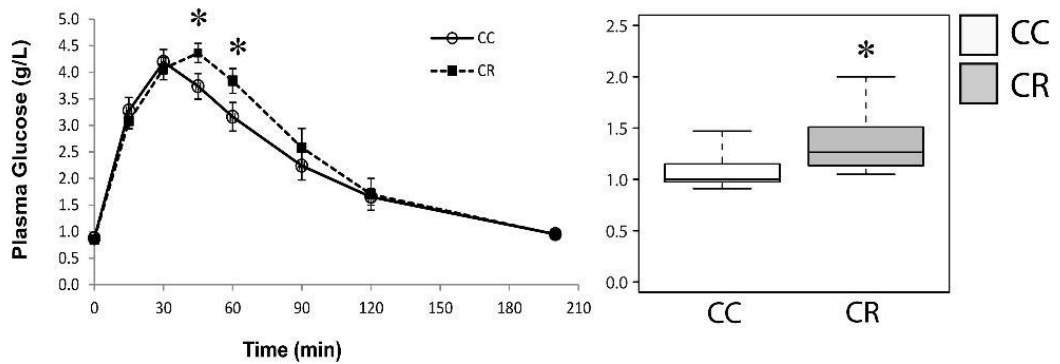
### Impaired glucose tolerance of adult offspring born to dams treated with resistin

To determine the long-term effect of maternal resistin treatment on glucose tolerance of offspring, we have performed glucose tolerance test (GTT) at p28 and p90 in both CC and CR groups. At p28, GTT was similar in CC and CR groups and in both groups glycemia returned to basal levels within 120 min after glucose load (Fig 2A). At p90, GTT was performed in both CC and CR groups that were subjected to HFD between p60 and p90. The area under the curve (AUC) of GTT was significantly increased in CR as compared to CC group based on non-parametric Mann Whitney test. This indicates decreased glucose tolerance in CR group as compared to CC group (Fig 2B). For the GTT analysis, the repeated measures were analyzed by non-parametric ANOVA including longitudinal data, this analysis revealed a non-significant difference between CC and CR groups. However, considering each time course point individually, we show significant differences between CC and CR groups at 45 and 60 min. In both groups, glycemia returned to the basal level after 200 min after glucose load (Fig 2B).

## A. P28



## B. P90



**Fig 2. Maternal resistin treatment alters offspring glucose tolerance.** Glucose Tolerance Tests were performed on p28 (A,  $n = 4$ ) and p90 (B,  $n = 8$ ), animals received through IP injection glucose (2mg/kg) and then blood glucose levels (g/L) were measured at the indicated times. Basal glycaemia was measured just before injection. The area under the curve representative of glucose tolerance was measured using ImageJ software. Data are presented as boxplots (right panels) and expressed as mean  $\pm$  SEM in graphs. For the GTT analysis, the repeated measures were analyzed by non-parametric ANOVA including longitudinal data. The area under the curve (AUC) of GTT and the individual comparison of time course points were analyzed using non-parametric Mann Whitney test. \*  $P < 0.05$  when comparing CC group to CR group using non-parametric Mann & Whitney statistical test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213267.g002>

### Increased gene expression of neuroinflammation and reactive gliosis markers in the hypothalamus of offspring born to dams treated with resistin

We have measured the expression levels of several markers of neuroinflammation and reactive gliosis that mirror the activation of microglia cells, as well as genes involved in the control of energy homeostasis in the hypothalamus of dams and offspring.

In dams, resistin treatment did not affect hypothalamic expression of neuroinflammation and reactive gliosis markers as well as IR, ObRb, PTP1B and SOCS3 (Fig 3A, 3B and 3C).

In offspring, at p28, CR group exhibits a significantly higher expression of neuroinflammation markers as IL6, NF $\kappa$ B, TNF $\alpha$  and TLR4, the latest is known to be the binding site for LPS and resistin (Fig 3D). The expression levels of resistin were not affected. CR group also exhibits a higher expression of reactive gliosis markers such as CD68, IBA1 and ICAM1 as compared to CC group revealing the activation of microglia cells (Fig 3E). Additionally, IR and ObRb hypothalamic expression is diminished in CR as compared to CC group at p28 as well as PTP1-B expression (Fig 3F). In contrast, the expression of SOCS3, a negative regulator of both insulin and leptin signaling, is increased CR group as compared to CC group (Fig 3F).

At p90, the long-term impact of maternal resistin is evidenced by a significant increase of hypothalamic IL6, TNF $\alpha$ , TLR4 and resistin gene expression (Fig 3G). ICAM1 expression is also significantly increased in CR group, however the other measured gliosis markers were not affected (Fig 3H). We have also shown that PTP1B is significantly increased in CR group as compared to CC group without modification of IR, ObRb or SOCS3 expression (Fig 3I).

To investigate whether maternal resistin treatment affects other brain regions, we have measured the expression of proinflammatory markers in the cortex. This treatment had no effect in dams and p28 offspring (Fig 4A and 4B). In p90 offspring, the cortex expression of IL6, TNF $\alpha$  and TLR4 are significantly higher in CR as compared to CC group, whereas resistin expression is not affected (Fig 4C).

### Increased expression of IL6 and TNF $\alpha$ in the adipose tissue of offspring born to dams treated with resistin

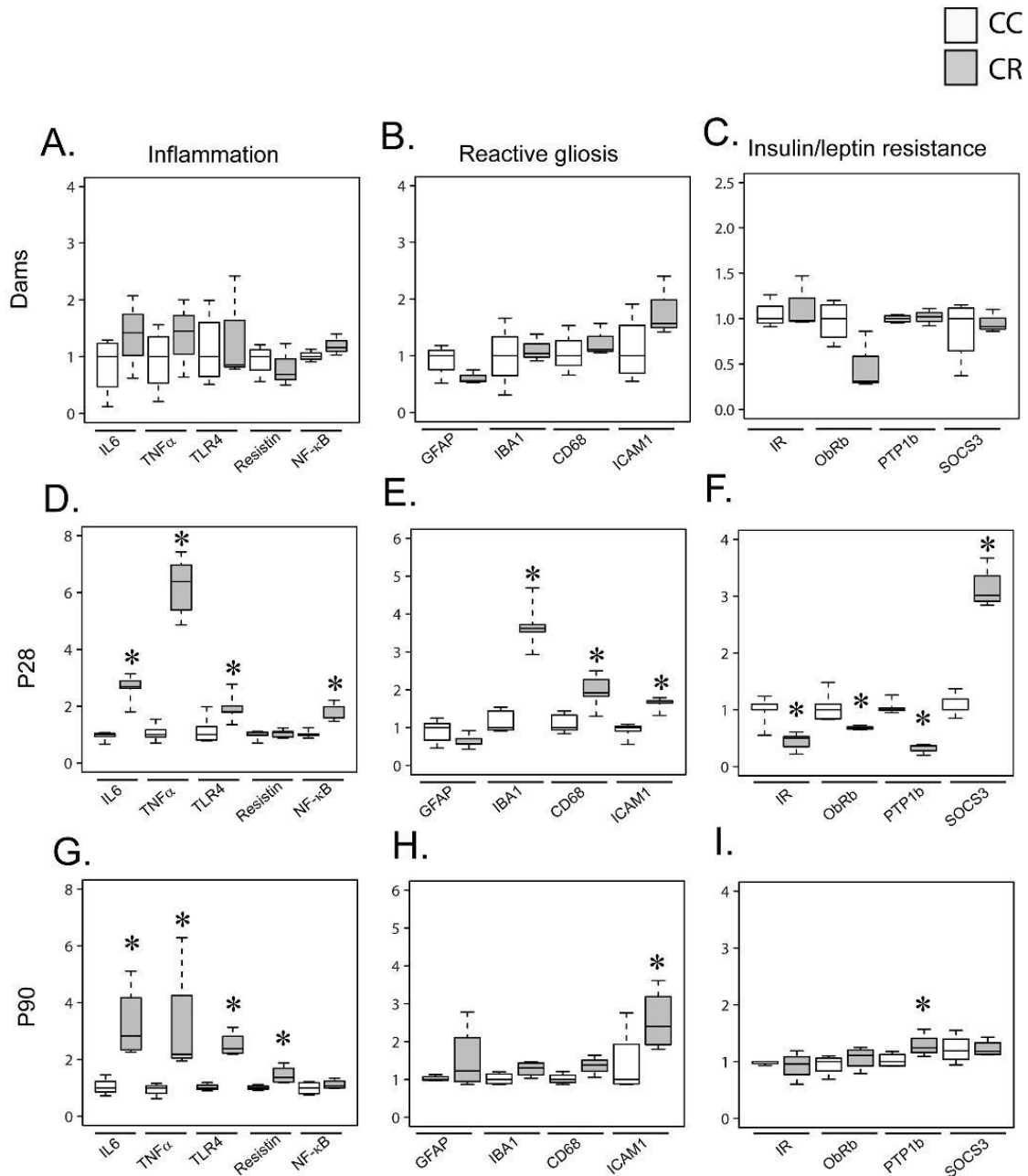
To determine whether maternal resistin has also impacted peripheral tissues we measured the expression of proinflammatory markers in adipose tissue, liver and muscle.

At p28, resistin treatment did not affect inflammatory markers in liver and muscle (Fig 5A). At p28, the adipose tissue was not studied due to the very weak amount of adipose tissue at this age.

At p90, we measured the expression of IL6 and TNF $\alpha$  in offspring born to dams treated or not with resistin. We show as in the hypothalamus that CR group exhibits significantly higher expression levels of IL6, TNF $\alpha$  and TLR4 in adipose tissue as compared to CC group (Fig 5B). In contrast, in liver and muscle the expression of these inflammatory markers was not affected (Fig 5B).

## Discussion

During pregnancy, maternal obesity is associated with metabolic inflammation attributed to increased adipose tissue and circulating proinflammatory cytokine levels [1, 27]. In addition, maternal obesity modifies the secretion of adipokines including resistin that is known to be involved in the onset of inflammation [13]. Indeed, resistin is considered as a potential link between obesity and insulin resistance. However, the pro-inflammatory role of resistin during perinatal period is unknown. Furthermore, the correlation between circulating levels of resistin and the BMI of pregnant women are conflicting. Some of these studies revealed positive correlation between resistin plasma levels and the BMI in obese pregnant women and others showed similar plasma resistin levels between obese and non-obese women [22, 24, 28, 29]. However, there is a consensus concerning the deleterious effects of maternal inflammation, even though the specific effect of resistin has not been investigated independently of the controversy concerning its secretion by adipocyte in humans. Thus, the mouse model is of interest to investigate the effect of resistin in perinatal period. In this extensive preliminary study in the



**Fig 3. Maternal resistin increases offspring hypothalamic inflammation and reactive gliosis markers.** Total mRNA prepared from the hypothalamus of dams and offspring (p28 and p90) were used to determine gene expression of different markers using RT-qPCR. Gene expression was normalized to GAPDH and 18S. Hypothalamic inflammatory markers are presented in panel A for dams, panel D for p28 offspring and panel G for p90 offspring. Hypothalamic gliosis markers are presented in panel B for dams, in panel E for p28 offspring and panel H for p90 offspring. Hypothalamic insulin/leptin responsiveness

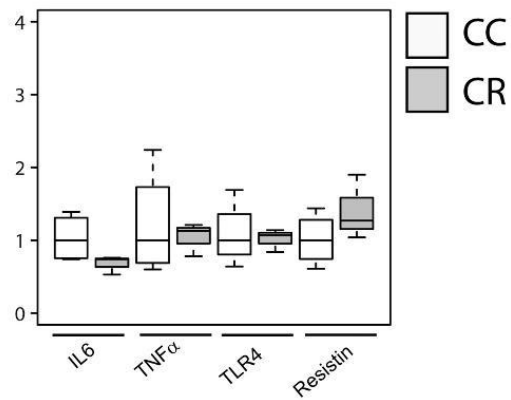


markers are presented in panel C for dams, panel F for p28 offspring and panel I for p90 offspring. Data are presented as boxplots (n = 4–5). \*P < 0.05 when comparing CC group to CR group using non-parametric Mann & Whitney statistical test.

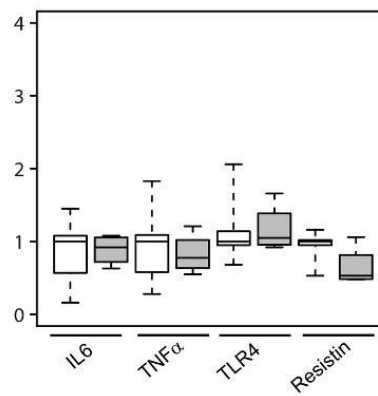
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213267.g003>

field, we investigated the long-term effects of maternal resistin on the predisposition of offspring to develop hypothalamic neuroinflammation and subsequent metabolic disorders. Here, we focused on the effects of resistin independently of systemic inflammation on normal dams and studied the long-term effects of this treatment on offspring and attempted to answer the question whether maternal resistin predisposes offspring to hypothalamic inflammation. For this purpose, the chosen resistin dose induced a slight but not significant increase of resistin plasma levels to avoid a high inflammation that could lead to abortion. However, resistin plasma levels of dams are higher when compared to offspring and this could be attributed to gender as previously reported [30]. We demonstrate that resistin treatment during pregnancy and lactation periods induced long-term effects on hypothalamic inflammation of male offspring associated with the alteration of metabolic parameters. Resistin treatment of dams did not modify their metabolic status or inflammatory markers as evidenced by unchanged glycaemia, insulinemia and body weight. Furthermore, IL6 and TNF $\alpha$  plasma levels were not affected. Thus, in these conditions, we selectively investigated the impact of resistin perinatal treatment independently from systemic pro-inflammatory cytokine changes. At weaning (p28), offspring born to dams treated with resistin, CR group, exhibited lower resistin plasma levels without any changes in the other circulating parameters. This could be attributed to the alteration of adipose tissue resistin secretion consequently to perinatal resistin treatment that acts as a negative feedback regulatory loop, however the mechanism is unknown. This decrease is most likely compensated by the significant increase of TLR4, which is the binding site of resistin, and this could explain the increased expression hypothalamic inflammatory markers. Indeed, the expression of pro-inflammatory markers (IL6, NF $\kappa$ B, TNF $\alpha$ ) was significantly increased in the hypothalamus of CR group as well as microgliosis markers (ICAM, CD68, IBA1) and astrogliosis (GFAP) markers. This suggests a potential hypothalamic neuroinflammation resulting from the maternal resistin treatment. Importantly, the long-term consequences of maternal resistin seem to differentially affect other brain regions such as the cortex. Indeed, inflammatory markers were not affected in the cortex of dams and p28 offspring, the effect is nevertheless observed in p90 CR group with increased IL6, TNF $\alpha$  and TLR4 expression. This indicates that the hypothalamus is affected earlier than the cortex. Additionally, p28 CR group exhibits a significant diminution of hypothalamic insulin and leptin receptor associated to the up-regulation of SOCS3 a negative regulator of insulin/leptin signaling. However, the expression level of PTP-1B was reduced in CR group as compared to CC group. These data show most likely the impairment of both IR and ObRb early in life. This finding suggests a strong impact later in life as previously described where leptin plays a crucial role in the neuronal organization of hypothalamic nuclei and especially ARC to PVN neuronal projections [31]. Indeed, the alteration of leptin action early in life has long-term impact on energy homeostasis [32, 33] and contributes to metabolic diseases. We have also investigated the impact of resistin perinatal treatment on the predisposition of offspring to inflammation and glucose intolerance when challenged with HFD. In fact, we have anticipated that using HFD will exacerbate the difference between CC and CR offspring and determine whether offspring born to dams treated with resistin are prone to inflammation and metabolic disorders. Indeed, HFD is known to promote these disorders. However, in future experiments It will be interesting to perform identical studies using Chow diet. At p90, CR group showed a significant increase in body weight gain and plasma insulin levels associated with slight glucose intolerance. Indeed, we have shown that AUC of GTT curves are significantly different between CC

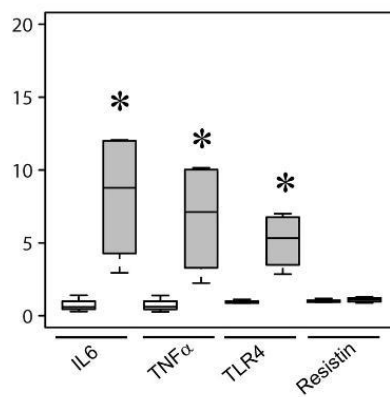
### A. Dams



### B. P28



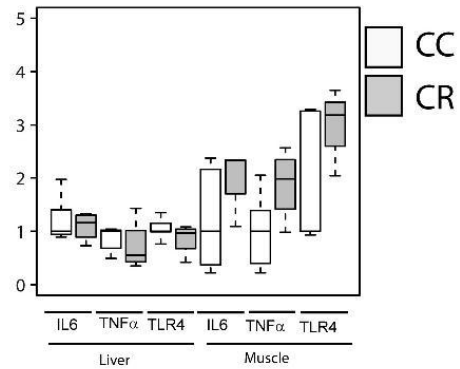
### C. P90



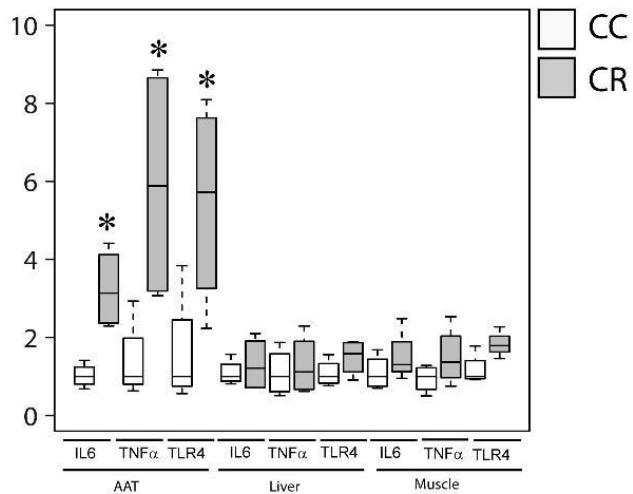
**Fig 4. Maternal resistin increases cortical inflammation markers of offspring at p90.** Total mRNA prepared from the cortex of dams and offspring (p28 and p90) were used to determine gene expression of different markers using RT-qPCR. Gene expression was normalized to GAPDH, 18S and Actin. Cortex inflammatory markers are presented in panel A for dams, panel B for p28 offspring and panel C for p90 offspring. Data are presented as boxplots (n = 4–5). \*P<0.05 when comparing CC group to CR group using non-parametric Mann & Whitney statistical test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213267.g004>

A. P28



B. P90



**Fig 5. Maternal resistin increases adipose tissue inflammation markers of P90 offspring.** Total mRNA prepared from abdominal adipose tissue (AAT), liver and muscle of p28 and p90 offspring were used to determine gene expression of inflammatory markers (IL6, TNF $\alpha$  and TLR4) using RT-qPCR. Gene expression was normalized to GAPDH, actin and 18S. Panel A presents inflammatory markers in liver and muscle of p28 offspring. Panel B presents inflammatory markers of AAT, liver and muscle of p90 offspring. Results are presented as boxplots (n = 4–5). \*P<0.05 when comparing CC group to CR group using non-parametric Mann & Whitney statistical test.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213267.g005>

and CR, but non parametric ANOVA test showed no significant difference between the two groups when considering the time course curves. Thus, we conclude that maternal resistin led to a slight glucose intolerance, but when combined to the hyperinsulinemia found in CR group this fairly reveals most likely a potential insulin resistance. Plasma levels of IL6 and TNF $\alpha$  were not modified. However, as at p28, TLR4 was up-regulated in the hypothalamus despite a stable resistin plasma level this may contribute to hypothalamic inflammation. Indeed, hypothalamic expression of IL6, resistin, TLR4 and TNF $\alpha$  is increased in CR group at p90 as compared to CC group, revealing a sustained expression of inflammation markers in

the hypothalamus. The expression levels of reactive astrogliosis and microgliosis markers were similar between CR and CC except for ICAM as well as IR and ObRb. This could be attributed to the fact that both groups were fed HFD and this most likely attenuated the differences except for the hypothalamic neuroinflammation markers. Our findings also show the up-regulation of IL6 and TNF $\alpha$  in the adipose tissue of CR group as compared to CC but not in liver or muscle. This indicates that the hypothalamus and adipose tissue of offspring are the most affected tissues in response to the augmentation of maternal resistin during gestation and lactation.

It is noteworthy to indicate that these extensive preliminary findings were obtained in male offspring and it is of great interest to extend these studies to female offspring in future investigations to determine whether long-term effects of maternal resistin concern both genders or if it is gender-dependent due to hormonal environment. Indeed, it has been recently demonstrated that neonatal overnutrition differentially affects males and females [34].

In conclusion, our findings demonstrate, for the first time to our knowledge, that maternal resistin predisposes male offspring to hypothalamic neuroinflammation and adipose tissue inflammation as evidenced by the up-regulation of inflammation markers independently from systemic inflammation markers associated to body weight gain, hyperinsulinemia and hyperleptinemia.

### Author Contributions

**Conceptualization:** Mohammed Taouis.

**Data curation:** Ghislaine Poizat, Mohammed Taouis.

**Formal analysis:** Ghislaine Poizat, Mohammed Taouis.

**Funding acquisition:** Mohammed Taouis.

**Investigation:** Ghislaine Poizat, Coralie Alexandre, Sarah Al Rifai, Laure Riffault, Delphine Crepin, Yacir Benomar, Mohammed Taouis.

**Methodology:** Ghislaine Poizat, Yacir Benomar, Mohammed Taouis.

**Project administration:** Ghislaine Poizat, Mohammed Taouis.

**Supervision:** Mohammed Taouis.

**Validation:** Mohammed Taouis.

**Writing – original draft:** Mohammed Taouis.

**Writing – review & editing:** Mohammed Taouis.

### References

1. Madan JC, Damman O, Allan W, Quinn R & Davis J 2009 Maternal obesity and markers of inflammation and pregnancy. *Cytokine* 47, 61–64. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.05.004> PMID: 19505831
2. Segovia SA, Vickers MH, Gray C & Reynolds C M 2014 Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. *Biomed. Res. Int.* 2014, 418975. <https://doi.org/10.1155/2014/418975> PMID: 24967364
3. Howie GJ, Sloboda DM, Reynolds CM & Vickers MH 2013 Timing of maternal exposure to a high fat diet and development of obesity and hyperinsulinemia in male rat offspring: same metabolic phenotype, different developmental pathways? *J. Nutr. Metab.* 2013, 517384. <https://doi.org/10.1155/2013/517384> PMID: 23762542
4. Du M, Yan X, Tong JF, Zhao J & Zhu MJ 2010 Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. *Biol. Repro.* 82, 4–12.

5. Fan L, Lindsley SR, Comstock SM, Takahashi DL, Evans AE, He GW, Thornburg KL & Grove KL 2013 Maternal high-fat diet impacts endothelial function in nonhuman primate offspring. *Int. J. Obes.* 37, 254–262.
6. Latouche C, Heywood SE, Henry SL, Ziemann M, Lazarus R, El-Osta A, Armitage JA & Kingwell BA 2014 Maternal overnutrition programs changes in the expression of skeletal muscle genes that are associated with insulin resistance and defects of oxidative phosphorylation in adult male rat offspring. *J. Nut.* 144, 237–244.
7. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A & Evans RM 1999 PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell.* 4, 585–95. PMID: [10549290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10549290/)
8. Yan X, Zhu MJ, Xu W, Tong JF, Ford SP, Nathanielsz PW & Du M 2010 Up-regulation of Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappaB signaling is associated with enhanced adipogenesis and insulin resistance in fetal skeletal muscle of obese sheep at late gestation. *Endocrinology.* 151, 380–7. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0849> PMID: [19887565](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19887565/)
9. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D, Neale GA, Hooiveld GJ, Hijmans A, Vroegrijk I, van den Berg S, Romijn J, Rensen PC, Joosten LA, Netea MG & Kaneganti TD 2011 Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 108, 15324–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100255108> PMID: [21876127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21876127/)
10. Kirsten TB, Lippi LL, Bevilacqua E & Bernardi MM 2013 LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1B levels in adult rat offspring: relevance to autism. *PLoS One.* 8, e82244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082244> PMID: [24312647](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24312647/)
11. Onore CE, Schwartz JJ, Careaga M, Berman RF & Ashwood P 2014 Maternal immune activation leads to activated inflammatory macrophages in offspring. *Brain Behav. Immun.* 38, 220–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.02.007> PMID: [24566386](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24566386/)
12. Zhu MJ, Du M, Nathanielsz PW & Ford SP 2010 Maternal obesity up-regulates inflammatory signaling pathways and enhances cytokine expression in the mid-gestation sheep placenta. *Placenta* 31, 387–391. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.02.002> PMID: [20185176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20185176/)
13. Park BS, Song DH, Kim HM, Choi BS, Lee H & Lee JO 2009 The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458, 1191–5. <https://doi.org/10.1038/nature07830> PMID: [19252480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19252480/)
14. Benomar Y, Gertler A, De Lacy P, Crépin D, Ould Hamouda H, Riffault L, Taouis M 2013 Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes* 62, 102–114. <https://doi.org/10.2337/db12-0237> PMID: [22961082](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22961082/)
15. Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV & O'Rahilly 2001 S. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes.* 50, 2199–202. PMID: [11574398](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11574398/)
16. Olefsky JM & Glass CK 2010 Macrophages, inflammation and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* 72, 219–246. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135846> PMID: [20148674](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20148674/)
17. Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS & Lazar MA 2001 The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307–12. <https://doi.org/10.1038/35053000> PMID: [11201732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11201732/)
18. Benomar Y, Amine H, Crépin D, Al Rifai S, Riffault L, Gertler A & Taouis M 2016 Central Resistin/TLR4 Impairs Adiponectin Signaling, Contributing to Insulin and FGF21 Resistance. *Diabetes* 65, 913–26. <https://doi.org/10.2337/db15-1029> PMID: [26740596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26740596/)
19. Yura S, Sagawa N, Itoh H, Kakui K, Nuamah MA, Korita D, Takemura M & Fujii S 2003 Resistin is expressed in the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 1394–7. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-011926> PMID: [12629135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12629135/)
20. Chen D, Fang Q, Chai Y, Wang H, Huang H & Dong M 2007 Serum resistin in gestational diabetes mellitus and early postpartum. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 67, 208–211.
21. Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S, Pelle F, Marconi A, Cozzi V, Cetin I, Cortelazzi R, Beck-Peccoz P & Spada A 2007 Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 66, 447–53.
22. Palik E, Baranyi E, Melczer Z, Audikovsky M, Szöcs A, Winkler G & Cseh K 2007 Elevated serum acylated (biologically active) ghrelin and resistin levels associate with pregnancy-induced weight gain and insulin resistance. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 76, 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2006.09.005> PMID: [17010469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17010469/)
23. Lobo TF, Torloni MR, Gueuvoghlian-Silva BY, Mattar R & Daher S 2013 Resistin concentration and gestational diabetes: a systematic review of the literature. *J. Reprod. Immunol.* 97, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.004> PMID: [23432878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23432878/)

24. Nien JK, Mazaki-Tovi S, Romero R, Kusanovic JP, Erez O, Gotsch F, Pineles BL, Friel LA, Espinoza J, Goncalves L, Santolaya J, Gomez R, Hong JS, Edwin S, Soto E, Richani K, Mazor M & Hassan SS 2007 Resistin: a hormone which induces insulin resistance is increased in normal pregnancy. *J. Perinat Med.* 35, 513–21. <https://doi.org/10.1515/JPM.2007.122> PMID: 17919114
25. Yang X, Li M, Haghiac M, Catalano PM, O'Tierney-Ginn P & Hauguel-de Mouzon S 2016 Causal relationship between obesity-related traits and TLR4-driven responses at the maternal-fetal interface. *Diabetologia.* 59, 2459–2466. <https://doi.org/10.1007/s00125-016-4073-6> PMID: 27535280
26. McDonald JH 2014 Handbook of Biological Statistics (3rd ed.). Sparky House Publishing, Baltimore (MD, USA).
27. Basu S, Haghiac M, Surace P, Challier JC, Guerre-Millo M, Singh K, Waters T, Minium J, Presley L, Catalano PM & Hauguel-de Mouzon S 2011 Pregravid obesity associates with increased maternal endotoxemia and metabolic inflammation. *Obesity (Silver Spring).* 19, 476–82.
28. Hendler I, Blackwell SC, Mehta SH, Whitty JE, Russell E, Sorokin Y & Cotton DB 2005 The levels of leptin, adiponectin, and resistin in normal weight, overweight, and obese pregnant women with and without preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 193, 979–83. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.06.041> PMID: 16157097
29. Ozias MK, Li S, Hull HR, Brooks WM & Carlson SE 2014 Relationship of circulating adipokines to body composition in pregnant women. *Adipocyte.* 4, 44–49. <https://doi.org/10.4161/adip.29805> PMID: 26167401
30. De Luis DA, Gonzalez Sagrado L, Conde R, Aller R, Izaola O, Perez Castrillon JL & Dueñas A 2009 Relation of resistin levels with cardiovascular risk factors and insulin resistance in non-diabetes obese patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 84, 174–8. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.01.017> PMID: 19243851
31. Bouret SG, Draper SJ & Simerly RB 2004 Trophic Action of Leptin on Hypothalamic Neurons That Regulate Feeding. *Science.* 304:108–110. <https://doi.org/10.1126/science.1095004> PMID: 15064420
32. Yamashita H, Shao J, Ishizuka T, Klepcyk PJ, Muhlenkamp P, Qiao L, Hoggard N & Friedman JE 2001 Leptin administration prevents spontaneous gestational diabetes in heterozygous *Lepr*(db/+) mice: effects on placental leptin and fetal growth. *Endocrinology.* 142, 2888–2897. <https://doi.org/10.1210/endo.142.7.8227> PMID: 11416008
33. Benoit C, Ould-Hamouda H, Crepin D, Gertler A, Amar L & Taouis M 2013 Early leptin blockade predisposes fat-fed rats to overweight and modifies hypothalamic microRNAs. *J. Endocrinol.* 218, 35–47. <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0561> PMID: 23576026
34. Argente-Arizon P, Diaz F, Ros P, Barrios V, Tena-Sempere M, Garcia-Segura LM, Argente J & Chowen JE 2018 The hypothalamic inflammation/gliosis response to neonatal overnutrition is sex and age dependent. *Endocrinology.* 159, 368–387. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00539> PMID: 29077836



# BIBLIOGRAPHIE



- Ailhaud, G., Grimaldi, P., & Negrel, R. (1992). Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Annu Rev Nutr*, 12, 207-233.
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nat Rev Immunol*, 4(7), 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Cell*, 124(4), 783-801.
- Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., et al. (2009). Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. [Consensus Development Conference Practice Guideline Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Circulation*, 120(16), 1640-1645.
- Amano, S. U., Cohen, J. L., Vangala, P., Tencerova, M., Nicoloso, S. M., Yawe, J. C., et al. (2014). Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Metab*, 19(1), 162-171.
- Amar, J., Chabo, C., Waget, A., Klopp, P., Vachoux, C., Bermudez-Humaran, L. G., et al. (2011). Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med*, 3(9), 559-572.
- Anand, B. K., Dua, S., & Shoenberg, K. (1955). Hypothalamic control of food intake in cats and monkeys. *J Physiol*, 127(1), 143-152.
- Arnoldussen, I. A., Kiliaan, A. J., & Gustafson, D. R. (2014). Obesity and dementia: adipokines interact with the brain. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 24(12), 1982-1999.
- Arruda, A. P., Milanski, M., Coope, A., Torsoni, A. S., Ropelle, E., Carvalho, D. P., et al. (2011). Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Endocrinology*, 152(4), 1314-1326.
- Arruda, A. P., Milanski, M., Romanatto, T., Solon, C., Coope, A., Alberici, L. C., et al. (2010). Hypothalamic actions of tumor necrosis factor alpha provide the thermogenic core for the

- wastage syndrome in cachexia. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Endocrinology*, 151(2), 683-694.
- Aruna, B., Islam, A., Ghosh, S., Singh, A. K., Vijayalakshmi, M., Ahmad, F., et al. (2008). Biophysical analyses of human resistin: oligomer formation suggests novel biological function. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Biochemistry*, 47(47), 12457-12466.
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. [Review]. *Neurobiol Dis*, 16(1), 1-13.
- Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., et al. (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Metab*, 19(2), 293-301.
- Balthasar, N., Dalgaard, L. T., Lee, C. E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., et al. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Cell*, 123(3), 493-505.
- Banerjee, R. R., Rangwala, S. M., Shapiro, J. S., Rich, A. S., Rhoades, B., Qi, Y., et al. (2004). Regulation of fasted blood glucose by resistin. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Science*, 303(5661), 1195-1198.
- Baroncini, M., Jissendi, P., Balland, E., Besson, P., Pruvo, J. P., Francke, J. P., et al. (2012). MRI atlas of the human hypothalamus. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neuroimage*, 59(1), 168-180.
- Bassuk, S. S., Rifai, N., & Ridker, P. M. (2004). High-sensitivity C-reactive protein: clinical importance. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Curr Probl Cardiol*, 29(8), 439-493.
- Baufeld, C., Osterloh, A., Prokop, S., Miller, K. R., & Heppner, F. L. (2016). High-fat diet-induced brain region-specific phenotypic spectrum of CNS resident microglia. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Acta Neuropathol*, 132(3), 361-375.
- Beilharz, J. E., Maniam, J., & Morris, M. J. (2016). Short-term exposure to a diet high in fat and sugar, or liquid sugar, selectively impairs hippocampal-dependent memory, with differential impacts on inflammation. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Behav Brain Res*, 306, 1-7.
- Belgardt, B. F., Mauer, J., Wunderlich, F. T., Ernst, M. B., Pal, M., Spohn, G., et al. (2010). Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(13), 6028-6033.
- Benoit, S. C., Kemp, C. J., Elias, C. F., Abplanalp, W., Herman, J. P., Migrenne, S., et al. (2009).

- Palmitic acid mediates hypothalamic insulin resistance by altering PKC-theta subcellular localization in rodents. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Clin Invest*, 119(9), 2577-2589.
- Benomar, Y., Gertler, A., De Lacy, P., Crepin, D., Ould Hamouda, H., Riffault, L., et al. (2013). Central resistin overexposure induces insulin resistance through Toll-like receptor 4. *Diabetes*, 62(1), 102-114.
- Benomar, Y., Roy, A. F., Aubourg, A., Djiane, J., & Taouis, M. (2005). Cross down-regulation of leptin and insulin receptor expression and signalling in a human neuronal cell line. *Biochem J*, 388(Pt 3), 929-939.
- Benomar, Y., Wetzler, S., Larue-Achagiotis, C., Djiane, J., Tome, D., & Taouis, M. (2005). In vivo leptin infusion impairs insulin and leptin signalling in liver and hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol*, 242(1-2), 59-66.
- Berg, A. H., Combs, T. P., Du, X., Brownlee, M., & Scherer, P. E. (2001). The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Nat Med*, 7(8), 947-953.
- Berghoff, M., Hochberg, A., Schmid, A., Schlegel, J., Karrasch, T., Kaps, M., et al. (2016). Quantification and regulation of the adipokines resistin and progranulin in human cerebrospinal fluid. *Eur J Clin Invest*, 46(1), 15-26.
- Berner, H. S., Lyngstadaas, S. P., Spahr, A., Monjo, M., Thommesen, L., Drevon, C. A., et al. (2004). Adiponectin and its receptors are expressed in bone-forming cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Bone*, 35(4), 842-849.
- Beydoun, M. A., Beydoun, H. A., & Wang, Y. (2008). Obesity and central obesity as risk factors for incident dementia and its subtypes: a systematic review and meta-analysis. [Meta-Analysis Systematic Review]. *Obes Rev*, 9(3), 204-218.
- Billington, C. J., Briggs, J. E., Grace, M., & Levine, A. S. (1991). Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Am J Physiol*, 260(2 Pt 2), R321-327.
- Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., & Tarkowski, A. (2005). Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Immunol*, 174(9), 5789-5795.
- Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigne, C., Mazzucotelli, A., et al. (2005). Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology*, 146(4), 1764-1771.
- Bousquet, M., St-Amour, I., Vandal, M., Julien, P., Cicchetti, F., & Calon, F. (2012). High-fat diet exacerbates MPTP-induced dopaminergic degeneration in mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neurobiol Dis*, 45(1), 529-538.
- Briggs, D. I., Enriori, P. J., Lemus, M. B., Cowley, M. A., & Andrews, Z. B. (2010). Diet-induced

obesity causes ghrelin resistance in arcuate NPY/AgRP neurons. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Endocrinology*, 151(10), 4745-4755.

Brobeck, J. R., Tepperman, J., & Long, C. N. (1943). Experimental Hypothalamic Hyperphagia in the Albino Rat. *Yale J Biol Med*, 15(6), 831-853.

Brown, R., Thompson, H. J., Imran, S. A., Ur, E., & Wilkinson, M. (2008). Traumatic brain injury induces adipokine gene expression in rat brain. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neurosci Lett*, 432(1), 73-78.

Bruce-Keller, A. J., Keller, J. N., & Morrison, C. D. (2009). Obesity and vulnerability of the CNS. [Review]. *Biochim Biophys Acta*, 1792(5), 395-400.

Buckman, L. B., Hasty, A. H., Flaherty, D. K., Buckman, C. T., Thompson, M. M., Matlock, B. K., et al. (2014). Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Brain Behav Immun*, 35, 33-42.

Burns, K., Martinon, F., Esslinger, C., Pahl, H., Schneider, P., Bodmer, J. L., et al. (1998). MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biol Chem*, 273(20), 12203-12209.

Cai, D., & Liu, T. (2011). Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Ann N Y Acad Sci*, 1243, E1-39.

Calegari, V. C., Torsoni, A. S., Vanzela, E. C., Araujo, E. P., Morari, J., Zoppi, C. C., et al. (2011). Inflammation of the hypothalamus leads to defective pancreatic islet function. [Research Support, Non-U.S. Gov't Retracted Publication]. *J Biol Chem*, 286(15), 12870-12880.

Campfield, L. A., Smith, F. J., Guisez, Y., Devos, R., & Burn, P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science*, 269(5223), 546-549.

Canello, R., Henegar, C., Viguerie, N., Taleb, S., Poitou, C., Rouault, C., et al. (2005). Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, 54(8), 2277-2286.

Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., et al. (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, 56(7), 1761-1772.

Cansell, C., Denis, R. G., Joly-Amado, A., Castel, J., & Luquet, S. (2012). Arcuate AgRP neurons and the regulation of energy balance. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3, 169.

Catalan, V., Gomez-Ambrosi, J., Rodriguez, A., Ramirez, B., Rotellar, F., Valenti, V., et al. (2012). Increased tenascin C and Toll-like receptor 4 levels in visceral adipose tissue as a link

between inflammation and extracellular matrix remodeling in obesity. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Endocrinol Metab*, 97(10), E1880-1889.

Ceddia, R. B., Somwar, R., Maida, A., Fang, X., Bikopoulos, G., & Sweeney, G. (2005). Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetologia*, 48(1), 132-139.

Chaby, R. (2004). Lipopolysaccharide-binding molecules: transporters, blockers and sensors. [Review]. *Cell Mol Life Sci*, 61(14), 1697-1713.

Challis, B. G., Coll, A. P., Yeo, G. S., Pinnock, S. B., Dickson, S. L., Thresher, R. R., et al. (2004). Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effects of peptide-YY(3-36). [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(13), 4695-4700.

Charriere, G., Cousin, B., Arnaud, E., Andre, M., Bacou, F., Penicaud, L., et al. (2003). Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biol Chem*, 278(11), 9850-9855.

Chen, A., Mumick, S., Zhang, C., Lamb, J., Dai, H., Weingarh, D., et al. (2005). Diet induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its impact on obesity. *Obes Res*, 13(8), 1311-1320.

Chen, B. H., Song, Y., Ding, E. L., Roberts, C. K., Manson, J. E., Rifai, N., et al. (2009). Circulating levels of resistin and risk of type 2 diabetes in men and women: results from two prospective cohorts. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes Care*, 32(2), 329-334.

Choi, C., Kutsch, O., Park, J., Zhou, T., Seol, D. W., & Benveniste, E. N. (2002). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces caspase-dependent interleukin-8 expression and apoptosis in human astrogloma cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Mol Cell Biol*, 22(3), 724-736.

Chow, B. W., & Gu, C. (2015). The molecular constituents of the blood-brain barrier. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Trends Neurosci*, 38(10), 598-608.

Clegg, D. J., Gotoh, K., Kemp, C., Wortman, M. D., Benoit, S. C., Brown, L. M., et al. (2011). Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Physiol Behav*, 103(1), 10-16.

Clement, K., Viguier, N., Poitou, C., Carette, C., Pelloux, V., Curat, C. A., et al. (2004). Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. [Clinical Trial

Controlled Clinical Trial

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *FASEB J*, 18(14), 1657-1669.

Codoner-Franch, P., & Alonso-Iglesias, E. (2015). Resistin: insulin resistance to malignancy.

[Review]. *Clin Chim Acta*, 438, 46-54.

Coll, A. P., Farooqi, I. S., Challis, B. G., Yeo, G. S., & O'Rahilly, S. (2004). Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6), 2557-2562.

Cournot, M., Marquie, J. C., Ansiau, D., Martinaud, C., Fonds, H., Ferrieres, J., et al. (2006). Relation between body mass index and cognitive function in healthy middle-aged men and women. [Controlled Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neurology*, 67(7), 1208-1214.

Cousin, B., Munoz, O., Andre, M., Fontanilles, A. M., Dani, C., Cousin, J. L., et al. (1999). A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J*, 13(2), 305-312.

Cousin, S. P., Hugl, S. R., Wrede, C. E., Kajio, H., Myers, M. G., Jr., & Rhodes, C. J. (2001). Free fatty acid-induced inhibition of glucose and insulin-like growth factor I-induced deoxyribonucleic acid synthesis in the pancreatic beta-cell line INS-1. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Endocrinology*, 142(1), 229-240.

Csiffary, A., Gorcs, T. J., & Palkovits, M. (1990). Neuropeptide Y innervation of ACTH-immunoreactive neurons in the arcuate nucleus of rats: a correlated light and electron microscopic double immunolabeling study. *Brain Res*, 506(2), 215-222.

Cullinan, S. B., & Diehl, J. A. (2006). Coordination of ER and oxidative stress signaling: the PERK/Nrf2 signaling pathway. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(3), 317-332.

Curat, C. A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R., et al. (2004). From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, 53(5), 1285-1292.

Dale, N. (2011). Purinergic signaling in hypothalamic tanycytes: potential roles in chemosensing. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Semin Cell Dev Biol*, 22(2), 237-244.

Dalmas, E., Clement, K., & Guerre-Millo, M. (2011). Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Trends Immunol*, 32(7), 307-314.

Daquinag, A. C., Zhang, Y., Amaya-Manzanares, F., Simmons, P. J., & Kolonin, M. G. (2011). An isoform of decorin is a resistin receptor on the surface of adipose progenitor cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Stem Cell*, 9(1), 74-86.

Davies, L. C., & Taylor, P. R. (2015). Tissue-resident macrophages: then and now. [Research Support, N.I.H., Intramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Immunology*, 144(4), 541-548.

- Davis, E. J., Foster, T. D., & Thomas, W. E. (1994). Cellular forms and functions of brain microglia. [Research Support, Non-U.S. Gov't  
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.  
Review]. *Brain Res Bull*, 34(1), 73-78.
- de Kloet, A. D., Pioquinto, D. J., Nguyen, D., Wang, L., Smith, J. A., Hiller, H., et al. (2014). Obesity induces neuroinflammation mediated by altered expression of the renin-angiotensin system in mouse forebrain nuclei. [Research Support, N.I.H., Extramural  
Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Physiol Behav*, 136, 31-38.
- de Luca, C., & Olefsky, J. M. (2008). Inflammation and insulin resistance. [Research Support, N.I.H.,  
Extramural  
Review]. *FEBS Lett*, 582(1), 97-105.
- De Souza, C. T., Araujo, E. P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R. L., Boschero, A. C., et al. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Endocrinology*, 146(10), 4192-4199.
- Debette, S., Beiser, A., Hoffmann, U., Decarli, C., O'Donnell, C. J., Massaro, J. M., et al. (2010). Visceral fat is associated with lower brain volume in healthy middle-aged adults. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Ann Neurol*, 68(2), 136-144.
- Djogo, T., Robins, S. C., Schneider, S., Kryzskaya, D., Liu, X., Mingay, A., et al. (2016). Adult NG2-Glia Are Required for Median Eminence-Mediated Leptin Sensing and Body Weight Control. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Metab*, 23(5), 797-810.
- Dutheil, S., Ota, K. T., Wohleb, E. S., Rasmussen, K., & Duman, R. S. (2016). High-Fat Diet Induced Anxiety and Anhedonia: Impact on Brain Homeostasis and Inflammation. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neuropsychopharmacology*, 41(7), 1874-1887.
- Egawa M, Y. H., Bray G.A. (1990). Effect of corticotropin releasing hormone and neuropathies Y on electrophysiological activity of sympathetic nerves to interscapular brown adipose tissue. *Neuroscience*, 34(3), 771-775.
- F, S. (2010). Tendances passées et projections pour l'avenir. L'obésité et l'économie de la prévention: objectif santé  
*OCDE*, 63-82.
- Festi, D., Colecchia, A., Sacco, T., Bondi, M., Roda, E., & Marchesini, G. (2004). Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. [Review]. *Obes Rev*, 5(1), 27-42.
- Filkova, M., Haluzik, M., Gay, S., & Senolt, L. (2009). The role of resistin as a regulator of inflammation: Implications for various human pathologies. [Research Support, Non-U.S. Gov't  
Review]. *Clin Immunol*, 133(2), 157-170.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., & Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*, 170(6),

2081-2095.

- Flier, J. S., Cook, K. S., Usher, P., & Spiegelman, B. M. (1987). Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Science*, 237(4813), 405-408.
- Frayling, C., Britton, R., & Dale, N. (2011). ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Physiol*, 589(Pt 9), 2275-2286.
- Frayn, K. N. (2002). Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Diabetologia*, 45(9), 1201-1210.
- Fried, L. P., Kronmal, R. A., Newman, A. B., Bild, D. E., Mittelmark, M. B., Polak, J. F., et al. (1998). Risk factors for 5-year mortality in older adults: the Cardiovascular Health Study. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *JAMA*, 279(8), 585-592.
- Friedman, J. M. (1997). The alphabet of weight control. [Comment News]. *Nature*, 385(6612), 119-120.
- Friedman, J. M., Leibel, R. L., Siegel, D. S., Walsh, J., & Bahary, N. (1991). Molecular mapping of the mouse ob mutation. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Genomics*, 11(4), 1054-1062.
- Fruebis, J., Tsao, T. S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M. R., Yen, F. T., et al. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(4), 2005-2010.
- Frydryk, J., Berne, C., Berglund, L., Jensevik, K., Flyvbjerg, A., & Zethelius, B. (2007). Serum adiponectin is a predictor of coronary heart disease: a population-based 10-year follow-up study in elderly men. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(2), 571-576.
- Geerling, J. J., Wang, Y., Havekes, L. M., Romijn, J. A., & Rensen, P. C. (2013). Acute central neuropeptide Y administration increases food intake but does not affect hepatic very low-density lipoprotein (VLDL) production in mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS One*, 8(2), e55217.
- Gemma, C., & Bachstetter, A. D. (2013). The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis. [Review]. *Front Cell Neurosci*, 7, 229.
- Gething, M. J., & Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nature*, 355(6355), 33-45.
- Ghosh, S., Singh, A. K., Aruna, B., Mukhopadhyay, S., & Ehtesham, N. Z. (2003). The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Gene*, 305(1), 27-34.



- Gohda, J., Matsumura, T., & Inoue, J. (2004). Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Immunol*, *173*(5), 2913-2917.
- Gomez-Nicola, D., & Perry, V. H. (2015). Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Neuroscientist*, *21*(2), 169-184.
- Goodman, T., & Hajihosseini, M. K. (2015). Hypothalamic tanycytes-masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. [Review]. *Front Neurosci*, *9*, 387.
- Graeber, M. B., Li, W., & Rodriguez, M. L. (2011). Role of microglia in CNS inflammation. [Review]. *FEBS Lett*, *585*(23), 3798-3805.
- Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Annu Rev Immunol*, *29*, 415-445.
- Guillemot-Legris, O., Masquelier, J., Everard, A., Cani, P. D., Alhouayek, M., & Muccioli, G. G. (2016). High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Neuroinflammation*, *13*(1), 206.
- Gustafson, D., Lissner, L., Bengtsson, C., Bjorkelund, C., & Skoog, I. (2004). A 24-year follow-up of body mass index and cerebral atrophy. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neurology*, *63*(10), 1876-1881.
- Hagan, M. M., Rushing, P. A., Schwartz, M. W., Yagaloff, K. A., Burn, P., Woods, S. C., et al. (1999). Role of the CNS melanocortin system in the response to overfeeding. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Neurosci*, *19*(6), 2362-2367.
- Han, M. S., Jung, D. Y., Morel, C., Lakhani, S. A., Kim, J. K., Flavell, R. A., et al. (2013). JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Science*, *339*(6116), 218-222.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Cell*, *132*(3), 344-362.
- Herde, M. K., Geist, K., Campbell, R. E., & Herbison, A. E. (2011). Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Endocrinology*, *152*(10), 3832-3841.
- Hill, A. A., Anderson-Baucum, E. K., Kennedy, A. J., Webb, C. D., Yull, F. E., & Hasty, A. H. (2015). Activation of NF-kappaB drives the enhanced survival of adipose tissue macrophages in an obesogenic environment. *Mol Metab*, *4*(10), 665-677.

- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., et al. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Nature*, *420*(6913), 333-336.
- Holland, W. L., Bikman, B. T., Wang, L. P., Yuguang, G., Sargent, K. M., Bulchand, S., et al. (2011). Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Invest*, *121*(5), 1858-1870.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nature*, *444*(7121), 860-867.
- Hotamisligil, G. S., Arner, P., Caro, J. F., Atkinson, R. L., & Spiegelman, B. M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Clin Invest*, *95*(5), 2409-2415.
- Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S., & Spiegelman, B. M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Science*, *259*(5091), 87-91.
- Hu, W. K., Liu, R., Pei, H., & Li, B. (2012). Endoplasmic reticulum stress-related factors protect against diabetic retinopathy. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Exp Diabetes Res*, *2012*, 507986.
- Hubberstey, A. V., & Mottillo, E. P. (2002). Cyclase-associated proteins: CAPacity for linking signal transduction and actin polymerization. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *FASEB J*, *16*(6), 487-499.
- Hundal, R. S., Petersen, K. F., Mayerson, A. B., Randhawa, P. S., Inzucchi, S., Shoelson, S. E., et al. (2002). Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Clin Invest*, *109*(10), 1321-1326.
- Itani, S. I., Ruderman, N. B., Schmieder, F., & Boden, G. (2002). Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I $\kappa$ B-alpha. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Diabetes*, *51*(7), 2005-2011.
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Brain Res Mol Brain Res*, *57*(1), 1-9.
- Ito, T., Schaffer, S. W., & Azuma, J. (2012). The potential usefulness of taurine on diabetes mellitus and its complications. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Amino Acids*, 42(5), 1529-1539.

Jamaluddin, M. S., Weakley, S. M., Yao, Q., & Chen, C. (2012). Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Br J Pharmacol*, 165(3), 622-632.

Janzer, R. C., & Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature*, 325(6101), 253-257.

Jialal, I., Adams-Huet, B., Duong, F., & Smith, G. (2014). Relationship between retinol-binding protein-4/adiponectin and leptin/adiponectin ratios with insulin resistance and inflammation. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Metab Syndr Relat Disord*, 12(4), 227-230.

Jin, M. S., & Lee, J. O. (2008). Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Immunity*, 29(2), 182-191.

Juge-Aubry, C. E., Henrichot, E., & Meier, C. A. (2005). Adipose tissue: a regulator of inflammation. [Review]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 19(4), 547-566.

Jung, H. S., Park, K. H., Cho, Y. M., Chung, S. S., Cho, H. J., Cho, S. Y., et al. (2006). Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cardiovasc Res*, 69(1), 76-85.

Kahn, B. B., & Flier, J. S. (2000). Obesity and insulin resistance. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *J Clin Invest*, 106(4), 473-481.

Kalman M. (2004). Glial reaction and reactive glia. In: Non neuronal cells of the nervous system: function and dysfunction *Hertz L, ed*, 787-835.

Kalra, S. P., Dube, M. G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T. L., & Kalra, P. S. (1999). Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Endocr Rev*, 20(1), 68-100.

Kamei, M., Saunders, W. B., Bayless, K. J., Dye, L., Davis, G. E., & Weinstein, B. M. (2006). Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, N.I.H., Intramural]. *Nature*, 442(7101), 453-456.

Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., et al. (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Invest*, 116(6), 1494-1505.

Kang, E. B., Koo, J. H., Jang, Y. C., Yang, C. H., Lee, Y., Cosio-Lima, L. M., et al. (2016). Neuroprotective Effects of Endurance Exercise Against High-Fat Diet-Induced Hippocampal

Neuroinflammation. *J Neuroendocrinol*, 28(5).

- Kang, Y. M., Ma, Y., Zheng, J. P., Elks, C., Sriramula, S., Yang, Z. M., et al. (2009). Brain nuclear factor-kappa B activation contributes to neurohumoral excitation in angiotensin II-induced hypertension. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cardiovasc Res*, 82(3), 503-512.
- Kaur, J. (2014). A comprehensive review on metabolic syndrome. [Review]. *Cardiol Res Pract*, 2014, 943162.
- Kawai, T., & Akira, S. (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. [Review]. *Trends Mol Med*, 13(11), 460-469.
- Kim, J. G., Suyama, S., Koch, M., Jin, S., Argente-Arizon, P., Argente, J., et al. (2014). Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nat Neurosci*, 17(7), 908-910.
- Kirk, E. A., Sagawa, Z. K., McDonald, T. O., O'Brien, K. D., & Heinecke, J. W. (2008). Monocyte chemoattractant protein deficiency fails to restrain macrophage infiltration into adipose tissue [corrected]. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Diabetes*, 57(5), 1254-1261.
- Klein, J., Perwitz, N., Kraus, D., & Fasshauer, M. (2006). Adipose tissue as source and target for novel therapies. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Trends Endocrinol Metab*, 17(1), 26-32.
- Kleiner, D. E., Brunt, E. M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M. J., Cummings, O. W., et al. (2005). Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. [Multicenter Study Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Validation Studies]. *Hepatology*, 41(6), 1313-1321.
- Kleinridders, A., Schenten, D., Konner, A. C., Belgardt, B. F., Mauer, J., Okamura, T., et al. (2009). MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Metab*, 10(4), 249-259.
- Konner, A. C., & Bruning, J. C. (2011). Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Trends Endocrinol Metab*, 22(1), 16-23.
- Kornbluth, R. S., Oh, P. S., Munis, J. R., Cleveland, P. H., & Richman, D. D. (1989). Interferons and bacterial lipopolysaccharide protect macrophages from productive infection by human immunodeficiency virus in vitro. [Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Exp Med*, 169(3), 1137-1151.
- Kos, K., Harte, A. L., da Silva, N. F., Tonchev, A., Chaldakov, G., James, S., et al. (2007). Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the

human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab*, 92(3), 1129-1136.

Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. [Review]. *Trends Neurosci*, 19(8), 312-318.

Lafontan, M., & Langin, D. (2009). Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Prog Lipid Res*, 48(5), 275-297.

Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V., & Dehouck, B. (2013). Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Comp Neurol*, 521(15), 3389-3405.

Lanuz-Masdeu, J., Arevalo, M. I., Vila, C., Barbera, A., Gomis, R., & Caelles, C. (2013). In vivo JNK activation in pancreatic beta-cells leads to glucose intolerance caused by insulin resistance in pancreas. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, 62(7), 2308-2317.

Lazar, M. A. (2007). Resistin- and Obesity-associated metabolic diseases. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Horm Metab Res*, 39(10), 710-716.

Lee, D. A., Bedont, J. L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., et al. (2012). Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Nat Neurosci*, 15(5), 700-702.

Lee, E. B. (2011). Obesity, leptin, and Alzheimer's disease. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Ann N Y Acad Sci*, 1243, 15-29.

Lee, H. G., Casadesus, G., Zhu, X., Castellani, R. J., McShea, A., Perry, G., et al. (2009). Cell cycle re-entry mediated neurodegeneration and its treatment role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Neurochem Int*, 54(2), 84-88.

Lee, S., Lee, H. C., Kwon, Y. W., Lee, S. E., Cho, Y., Kim, J., et al. (2014). Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Metab*, 19(3), 484-497.

Letra, L., Santana, I., & Seica, R. (2014). Obesity as a risk factor for Alzheimer's disease: the role of adipocytokines. [Review]. *Metab Brain Dis*, 29(3), 563-568.

Levin, B. E., Magnan, C., Dunn-Meynell, A., & Le Foll, C. (2011). Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how? [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Endocrinology*, 152(7), 2552-2557.

- Li, J., Tang, Y., & Cai, D. (2012). IKKbeta/NF-kappaB disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nat Cell Biol*, 14(10), 999-1012.
- Loftus, T. M. (1999). An adipocyte-central nervous system regulatory loop in the control of adipose homeostasis. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Semin Cell Dev Biol*, 10(1), 11-18.
- Lokken, K. L., Boeka, A. G., Austin, H. M., Gunstad, J., & Harmon, C. M. (2009). Evidence of executive dysfunction in extremely obese adolescents: a pilot study. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Surg Obes Relat Dis*, 5(5), 547-552.
- Lord, E., Ledoux, S., Murphy, B. D., Beaudry, D., & Palin, M. F. (2005). Expression of adiponectin and its receptors in swine. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Anim Sci*, 83(3), 565-578.
- Lu, J., Wu, D. M., Zheng, Y. L., Hu, B., Cheng, W., Zhang, Z. F., et al. (2011). Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and IkkappaB kinase beta/nuclear factor-kappaB-mediated inflammatory pathways in mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Brain Behav Immun*, 25(8), 1658-1667.
- Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. [Review]. *Cytokine*, 42(2), 145-151.
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Clin Invest*, 117(1), 175-184.
- Lumeng, C. N., & Saltiel, A. R. (2011). Inflammatory links between obesity and metabolic disease. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *J Clin Invest*, 121(6), 2111-2117.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., et al. (1995). Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Nat Med*, 1(11), 1155-1161.
- Martinez de Morentin, P. B., & Lopez, M. (2010). "Mens sana in corpore sano": exercise and hypothalamic ER stress. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS Biol*, 8(8).
- McNay, D. E., Briancon, N., Kokoeva, M. V., Maratos-Flier, E., & Flier, J. S. (2012). Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Invest*, 122(1), 142-152.

- McNeilly, A. D., Williamson, R., Sutherland, C., Balfour, D. J., & Stewart, C. A. (2011). High fat feeding promotes simultaneous decline in insulin sensitivity and cognitive performance in a delayed matching and non-matching to position task. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Behav Brain Res*, *217*(1), 134-141.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. [Review]. *Cell*, *91*(3), 295-298.
- Meng, Q., & Cai, D. (2011). Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the I $\kappa$ B kinase beta (IKK $\beta$ )/NF- $\kappa$ B pathway. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biol Chem*, *286*(37), 32324-32332.
- Menzies, M., & Ingham, A. (2006). Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Vet Immunol Immunopathol*, *109*(1-2), 23-30.
- Milanski, M., Arruda, A. P., Coope, A., Ignacio-Souza, L. M., Nunez, C. E., Roman, E. A., et al. (2012). Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, *61*(6), 1455-1462.
- Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D. E., 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. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Neurosci*, *29*(2), 359-370.
- Milic, S., Lulic, D., & Stimac, D. (2014). Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. [Review]. *World J Gastroenterol*, *20*(28), 9330-9337.
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. [Comparative Study Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Immunol*, *164*(12), 6166-6173.
- Mizuno, T. M., Kleopoulos, S. P., Bergen, H. T., Roberts, J. L., Priest, C. A., & Mobbs, C. V. (1998). Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in ob/ob and db/db mice, but is stimulated by leptin. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Diabetes*, *47*(2), 294-297.
- Montague, C. T., Farooqi, I. S., Whitehead, J. P., Soos, M. A., Rau, H., Wareham, N. J., et al. (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature*, *387*(6636), 903-908.
- Moraes, J. C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D. E., Roman, E. A., Pauli, J. R., et al. (2009). High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS One*, *4*(4), e5045.
- Morash, B. A., Willkinson, D., Ur, E., & Wilkinson, M. (2002). Resistin expression and regulation in mouse pituitary. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *FEBS Lett*, *526*(1-3), 26-30.

- Mraz, M., Lacinova, Z., Drapalova, J., Haluzikova, D., Horinek, A., Matoulek, M., et al. (2011). The effect of very-low-calorie diet on mRNA expression of inflammation-related genes in subcutaneous adipose tissue and peripheral monocytes of obese patients with type 2 diabetes mellitus. [Controlled Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Endocrinol Metab*, 96(4), E606-613.
- Mucke, L., Oldstone, M. B., Morris, J. C., & Nerenberg, M. I. (1991). Rapid activation of astrocyte-specific expression of GFAP-lacZ transgene by focal injury. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *New Biol*, 3(5), 465-474.
- Murray, A. J., Knight, N. S., Cochlin, L. E., McAleese, S., Deacon, R. M., Rawlins, J. N., et al. (2009). Deterioration of physical performance and cognitive function in rats with short-term high-fat feeding. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *FASEB J*, 23(12), 4353-4360.
- Muse, E. D., Obici, S., Bhanot, S., Monia, B. P., McKay, R. A., Rajala, M. W., et al. (2004). Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Clin Invest*, 114(2), 232-239.
- Myers, M. G., Jr. (2008). Metabolic sensing and regulation by the hypothalamus. [Editorial Introductory]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294(5), E809.
- Nadeau, S., & Rivest, S. (1999). Effects of circulating tumor necrosis factor on the neuronal activity and expression of the genes encoding the tumor necrosis factor receptors (p55 and p75) in the rat brain: a view from the blood-brain barrier. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neuroscience*, 93(4), 1449-1464.
- Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Hatazaki, M., Miyatsuka, T., Matsuoka, T. A., et al. (2004). Modulation of the JNK pathway in liver affects insulin resistance status. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biol Chem*, 279(44), 45803-45809.
- Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E., & Rubin, B. Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Exp Med*, 158(3), 670-689.
- NCgrel, R., Grimaldi, P., Forest, C. and Ailhaud, G. (1985). *Methods Enzymol* (Vol. 109).
- Nerurkar, P. V., Johns, L. M., Buesa, L. M., Kipyakwai, G., Volper, E., Sato, R., et al. (2011). *Momordica charantia* (bitter melon) attenuates high-fat diet-associated oxidative stress and neuroinflammation. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Neuroinflammation*, 8, 64.
- Nguyen, M. T., Favelukis, S., Nguyen, A. K., Reichart, D., Scott, P. A., Jenn, A., et al. (2007). A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Biol Chem*, 282(48), 35279-35292.



- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Trends Neurosci*, 29(10), 547-553.
- Ogawa, Y., Masuzaki, H., Hosoda, K., Aizawa-Abe, M., Suga, J., Suda, M., et al. (1999). Increased glucose metabolism and insulin sensitivity in transgenic skinny mice overexpressing leptin. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, 48(9), 1822-1829.
- Olefsky, J. M., & Glass, C. K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Annu Rev Physiol*, 72, 219-246.
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. [Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Nat Rev Immunol*, 11(2), 85-97.
- Ozcan, L., Ergin, A. S., Lu, A., Chung, J., Sarkar, S., Nie, D., et al. (2009). Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Metab*, 9(1), 35-51.
- Pal, D., Dasgupta, S., Kundu, R., Maitra, S., Das, G., Mukhopadhyay, S., et al. (2012). Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nat Med*, 18(8), 1279-1285.
- Parimisetty, A., Dorsemans, A. C., Awada, R., Ravanan, P., Diotel, N., & Lefebvre d'Hellencourt, C. (2016). Secret talk between adipose tissue and central nervous system via secreted factors- an emerging frontier in the neurodegenerative research. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *J Neuroinflammation*, 13(1), 67.
- Park, H. K., & Ahima, R. S. (2013). Resistin in rodents and humans. *Diabetes Metab J*, 37(6), 404-414.
- Park, H. K., Qatanani, M., Briggs, E. R., Ahima, R. S., & Lazar, M. A. (2011). Inflammatory induction of human resistin causes insulin resistance in endotoxemic mice. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, 60(3), 775-783.
- Parkash, J., Messina, A., Langlet, F., Cimino, I., Loyens, A., Mazur, D., et al. (2015). Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic median eminence. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nat Commun*, 6, 6385.
- Patel, L., Buckels, A. C., Kinghorn, I. J., Murdock, P. R., Holbrook, J. D., Plumpton, C., et al. (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. *Biochem Biophys Res Commun*, 300(2), 472-476.
- Patel, S. D., Rajala, M. W., Rossetti, L., Scherer, P. E., & Shapiro, L. (2004). Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. [Research Support, Non-U.S. Gov't

- Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.  
Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Science*, 304(5674), 1154-1158.
- Patsouris, D., Li, P. P., Thapar, D., Chapman, J., Olefsky, J. M., & Neels, J. G. (2008). Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Metab*, 8(4), 301-309.
- Pekny, M., Johansson, C. B., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallen, A., Perlmann, T., et al. (1999). Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Cell Biol*, 145(3), 503-514.
- Perlemuter, G., Bigorgne, A., Cassard-Doulcier, A. M., & Naveau, S. (2007). Nonalcoholic fatty liver disease: from pathogenesis to patient care. [Review]. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 3(6), 458-469.
- Pierce, A. A., & Xu, A. W. (2010). De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Neurosci*, 30(2), 723-730.
- Posey, K. A., Clegg, D. J., Printz, R. L., Byun, J., Morton, G. J., Vivekanandan-Giri, A., et al. (2009). Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296(5), E1003-1012.
- Prager-Khoutorsky, M., & Bourque, C. W. (2015). Anatomical organization of the rat organum vasculosum laminae terminalis. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 309(4), R324-337.
- Purkayastha, S., Zhang, H., Zhang, G., Ahmed, Z., Wang, Y., & Cai, D. (2011). Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(7), 2939-2944.
- Raghu, P., Ghosh, S., Soundarya, K., Haseeb, A., Aruna, B., & Ehtesham, N. Z. (2004). Dimerization of human recombinant resistin involves covalent and noncovalent interactions. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Biochem Biophys Res Commun*, 313(3), 642-646.
- Ramalho, A. F., Bombassaro, B., Dragano, N. R., Solon, C., Morari, J., Fioravante, M., et al. (2018). Dietary fats promote functional and structural changes in the median eminence blood/spinal fluid interface-the protective role for BDNF. *J Neuroinflammation*, 15(1), 10.
- Reaven, G., Abbasi, F., & McLaughlin, T. (2004). Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. [Review]. *Recent Prog Horm Res*, 59, 207-223.
- Reverchon M, M. V., Froment P, Ramé C and Dupont J. (2013). Adiponectin and resistin: a role in the reproductive functions? *Med Sci (Paris)*, 29, 417 - 424.

- Reyna, S. M., Ghosh, S., Tantiwong, P., Meka, C. S., Eagan, P., Jenkinson, C. P., et al. (2008). Elevated toll-like receptor 4 expression and signaling in muscle from insulin-resistant subjects. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Diabetes*, 57(10), 2595-2602.
- Rodriguez, E. M., Blazquez, J. L., Pastor, F. E., Pelaez, B., Pena, P., Peruzzo, B., et al. (2005). Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Int Rev Cytol*, 247, 89-164.
- Romano, M. (2008). Inflammation resolution: does the bone marrow have a say? [Comment Editorial Review]. *Am J Hematol*, 83(6), 435-436.
- Rosen, E. D., & Spiegelman, B. M. (2014). What we talk about when we talk about fat. [Review]. *Cell*, 156(1-2), 20-44.
- Sabio, G., Cavanagh-Kyros, J., Barrett, T., Jung, D. Y., Ko, H. J., Ong, H., et al. (2010). Role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in metabolic regulation by JNK1. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Genes Dev*, 24(3), 256-264.
- Saddi-Rosa, P., Oliveira, C. S., Giuffrida, F. M., & Reis, A. F. (2010). Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: a review of evidence. *Diabetol Metab Syndr*, 2, 21.
- Samad, F., Pandey, M., & Loskutoff, D. J. (1998). Tissue factor gene expression in the adipose tissues of obese mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7591-7596.
- Sanchez-Solana, B., Laborda, J., & Baladron, V. (2012). Mouse resistin modulates adipogenesis and glucose uptake in 3T3-L1 preadipocytes through the ROR1 receptor. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mol Endocrinol*, 26(1), 110-127.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., et al. (2005). Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nat Immunol*, 6(11), 1087-1095.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., et al. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neuron*, 74(4), 691-705.
- Schenk, S., Saberi, M., & Olefsky, J. M. (2008). Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *J Clin Invest*, 118(9), 2992-3002.
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., & Lodish, H. F. (1995). A novel serum protein

similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Biol Chem*, 270(45), 26746-26749.

Schroder, M., & Kaufman, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Annu Rev Biochem*, 74, 739-789.

Schwartz, D. R., & Lazar, M. A. (2011). Human resistin: found in translation from mouse to man. [Comparative Study Research Support, N.I.H., Extramural Review]. *Trends Endocrinol Metab*, 22(7), 259-265.

Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Nature*, 404(6778), 661-671.

Sethi, J. K., & Vidal-Puig, A. J. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *J Lipid Res*, 48(6), 1253-1262.

Sharp, F. R., Massa, S. M., & Swanson, R. A. (1999). Heat-shock protein protection. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review]. *Trends Neurosci*, 22(3), 97-99.

Shen, L., Tso, P., Wang, D. Q., Woods, S. C., Davidson, W. S., Sakai, R., et al. (2009). Up-regulation of apolipoprotein E by leptin in the hypothalamus of mice and rats. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Physiol Behav*, 98(1-2), 223-228.

Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H., & Flier, J. S. (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Clin Invest*, 116(11), 3015-3025.

Shoelson, S. E., Herrero, L., & Naaz, A. (2007). Obesity, inflammation, and insulin resistance. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Gastroenterology*, 132(6), 2169-2180.

Singhal, N. S., Lazar, M. A., & Ahima, R. S. (2007). Central resistin induces hepatic insulin resistance via neuropeptide Y. [Comparative Study Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Neurosci*, 27(47), 12924-12932.

- Solinas, G., Vilcu, C., Neels, J. G., Bandyopadhyay, G. K., Luo, J. L., Naugler, W., et al. (2007). JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *Cell Metab*, 6(5), 386-397.
- Soltys, Z., Ziaja, M., Pawlinski, R., Setkowicz, Z., & Janeczko, K. (2001). Morphology of reactive microglia in the injured cerebral cortex. Fractal analysis and complementary quantitative methods. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Neurosci Res*, 63(1), 90-97.
- Song, M. J., Kim, K. H., Yoon, J. M., & Kim, J. B. (2006). Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 346(3), 739-745.
- Sousa-Ferreira, L., de Almeida, L. P., & Cavadas, C. (2014). Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Trends Endocrinol Metab*, 25(2), 80-88.
- Stanley, B. G., Kyrkouli, S. E., Lampert, S., & Leibowitz, S. F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Peptides*, 7(6), 1189-1192.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., & Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Exp Med*, 176(1), 287-292.
- Steppan, C. M., Bailey, S. T., Bhat, S., Brown, E. J., Banerjee, R. R., Wright, C. M., et al. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Nature*, 409(6818), 307-312.
- Steppan, C. M., Wang, J., Whiteman, E. L., Birnbaum, M. J., & Lazar, M. A. (2005). Activation of SOCS-3 by resistin. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Mol Cell Biol*, 25(4), 1569-1575.
- Takeda, K., & Akira, S. (2015). Toll-like receptors. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Curr Protoc Immunol*, 109, 14 12 11-10.
- Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Cell*, 140(6), 805-820.
- Taki, Y., Kinomura, S., Sato, K., Inoue, K., Goto, R., Okada, K., et al. (2008). Relationship between body mass index and gray matter volume in 1,428 healthy individuals. [Comparative Study Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Obesity (Silver Spring)*, 16(1), 119-124.
- Tan, C. Y., & Vidal-Puig, A. (2008). Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Biochem Soc Trans*, 36(Pt 5), 935-940.

- Tanaka, H., Monahan, K. D., & Seals, D. R. (2001). Age-predicted maximal heart rate revisited. [Meta-Analysis Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Am Coll Cardiol*, 37(1), 153-156.
- Tanti, J. F., Ceppo, F., Jager, J., & Berthou, F. (2012). Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3, 181.
- Tapia-Gonzalez, S., Garcia-Segura, L. M., Tena-Sempere, M., Frago, L. M., Castellano, J. M., Fuente-Martin, E., et al. (2011). Activation of microglia in specific hypothalamic nuclei and the cerebellum of adult rats exposed to neonatal overnutrition. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Neuroendocrinol*, 23(4), 365-370.
- Tarkowski, A., Bjersing, J., Shestakov, A., & Bokarewa, M. I. (2010). Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Cell Mol Med*, 14(6B), 1419-1431.
- Thaler, J. P., Guyenet, S. J., Dorfman, M. D., Wisse, B. E., & Schwartz, M. W. (2013). Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis? [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Diabetes*, 62(8), 2629-2634.
- Thaler, J. P., Yi, C. X., Schur, E. A., Guyenet, S. J., Hwang, B. H., Dietrich, M. O., et al. (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *J Clin Invest*, 122(1), 153-162.
- Tisdale, M. J. (1997). Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. [Review]. *Nutrition*, 13(1), 1-7.
- Tosca L, C. C., Dupont J. (2008). L'AMPK : un lien entre métabolisme et reproduction ? . *Med Sci* 24, 297-300.
- Tovar, S., Nogueiras, R., Tung, L. Y., Castaneda, T. R., Vazquez, M. J., Morris, A., et al. (2005). Central administration of resistin promotes short-term satiety in rats. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Eur J Endocrinol*, 153(3), R1-5.
- Trayhurn, P. (2005). Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Acta Physiol Scand*, 184(4), 285-293.
- Tsaousidou, E., Paeger, L., Belgardt, B. F., Pal, M., Wunderlich, C. M., Bronneke, H., et al. (2014). Distinct Roles for JNK and IKK Activation in Agouti-Related Peptide Neurons in the Development of Obesity and Insulin Resistance. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Rep*, 9(4), 1495-1506.
- Tsukumo, D. M., Carvalho-Filho, M. A., Carvalheira, J. B., Prada, P. O., Hirabara, S. M., Schenka, A.

- A., et al. (2007). Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. [Retracted Publication]. *Diabetes*, 56(8), 1986-1998.
- Unger, E. K., Piper, M. L., Olofsson, L. E., & Xu, A. W. (2010). Functional role of c-Jun-N-terminal kinase in feeding regulation. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Endocrinology*, 151(2), 671-682.
- Vahanan, B. M., Raj, G. D., Pawar, R. M., Gopinath, V. P., Raja, A., & Thangavelu, A. (2008). Expression profile of toll like receptors in a range of water buffalo tissues (*Bubalus bubalis*). *Vet Immunol Immunopathol*, 126(1-2), 149-155.
- Valdearcos, M., Robblee, M. M., Benjamin, D. I., Nomura, D. K., Xu, A. W., & Koliwad, S. K. (2014). Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Rep*, 9(6), 2124-2138.
- Valdearcos, M., Xu, A. W., & Koliwad, S. K. (2015). Hypothalamic inflammation in the control of metabolic function. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Annu Rev Physiol*, 77, 131-160.
- van der Heijden, R. A., Sheedfar, F., Morrison, M. C., Hommelberg, P. P., Kor, D., Kloosterhuis, N. J., et al. (2015). High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Aging (Albany NY)*, 7(4), 256-268.
- Varvel, N. H., Grathwohl, S. A., Baumann, F., Liebig, C., Bosch, A., Brawek, B., et al. (2012). Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(44), 18150-18155.
- Vazquez, M. J., Gonzalez, C. R., Varela, L., Lage, R., Tovar, S., Sangiao-Alvarellos, S., et al. (2008). Central resistin regulates hypothalamic and peripheral lipid metabolism in a nutritional-dependent fashion. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Endocrinology*, 149(9), 4534-4543.
- Velloso, L. A., & Schwartz, M. W. (2011). Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. [Review]. *Int J Obes (Lond)*, 35(12), 1455-1465.
- Verma, S., Li, S. H., Wang, C. H., Fedak, P. W., Li, R. K., Weisel, R. D., et al. (2003). Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Circulation*, 108(6), 736-740.
- Waise, T. M. Z., Toshinai, K., Naznin, F., NamKoong, C., Md Moin, A. S., Sakoda, H., et al. (2015). One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Biochem Biophys Res Commun*, 464(4), 1157-1162.
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Miyamoto, A., & Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Trends Neurosci*, 36(4), 209-217.

Walker, F. R., Beynon, S. B., Jones, K. A., Zhao, Z., Kongsui, R., Cairns, M., et al. (2014). Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Brain Behav Immun*, 37, 1-14.

Wang, J., Obici, S., Morgan, K., Barzilai, N., Feng, Z., & Rossetti, L. (2001). Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Diabetes*, 50(12), 2786-2791.

Ward, M. A., Carlsson, C. M., Trivedi, M. A., Sager, M. A., & Johnson, S. C. (2005). The effect of body mass index on global brain volume in middle-aged adults: a cross sectional study. [Comparative Study Research Support, N.I.H., Extramural]. *BMC Neurol*, 5, 23.

Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., et al. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Clin Invest*, 116(1), 115-124.

Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Clin Invest*, 112(12), 1796-1808.

Werner, A., Kloss, C. U., Walter, J., Kreutzberg, G. W., & Raivich, G. (1998). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the mouse facial motor nucleus after axonal injury and during regeneration. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Neurocytol*, 27(4), 219-232.

Wilkinson, M., Wilkinson, D., Wiesner, G., Morash, B., & Ur, E. (2005). Hypothalamic resistin immunoreactivity is reduced by obesity in the mouse: co-localization with alpha-melanostimulating hormone. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neuroendocrinology*, 81(1), 19-30.

Williams, M. J., Sutherland, W. H., McCormick, M. P., Yeoman, D., de Jong, S. A., & Walker, R. J. (2001). Normal endothelial function after meals rich in olive or safflower oil previously used for deep frying. [Clinical Trial Comparative Study Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 11(3), 147-152.

Won, J. C., Jang, P. G., Namkoong, C., Koh, E. H., Kim, S. K., Park, J. Y., et al. (2009). Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Obesity (Silver Spring)*, 17(10), 1861-1865.

Woods, S. C., D'Alessio, D. A., Tso, P., Rushing, P. A., Clegg, D. J., Benoit, S. C., et al. (2004). Consumption of a high-fat diet alters the homeostatic regulation of energy balance.



[Review]. *Physiol Behav*, 83(4), 573-578.

Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, 112(12), 1821-1830.

Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., et al. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature*, 423(6941), 762-769.

Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M. B., & Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nat Med*, 5(9), 1066-1070.

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. [Research Support, N.I.H., Extramural]. *J Biol Chem*, 281(40), 30299-30304.

Zabolotny, J. M., Bence-Hanulec, K. K., Stricker-Krongrad, A., Haj, F., Wang, Y., Minokoshi, Y., et al. (2002). PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Dev Cell*, 2(4), 489-495.

Zhang, P., & Tian, B. (2014). Metabolic syndrome: an important risk factor for Parkinson's disease. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 729194.

Zhang, X., Xu, A., Chung, S. K., Cresser, J. H., Sweeney, G., Wong, R. L., et al. (2011). Selective inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase in adipose tissue protects against diet-induced obesity and improves insulin sensitivity in both liver and skeletal muscle in mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Diabetes*, 60(2), 486-495.

Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., & Cai, D. (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell*, 135(1), 61-73.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. [Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Nature*, 372(6505), 425-432.

Zheng, C., Yang, Q., Cao, J., Xie, N., Liu, K., Shou, P., et al. (2016). Local proliferation initiates macrophage accumulation in adipose tissue during obesity. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cell Death Dis*, 7, e2167.



## Résumé

La prévalence de l'obésité est en net progrès et constitue un problème majeur de santé publique. Cette pathologie est d'autant plus dangereuse qu'elle s'accompagne d'un cluster de désordres métaboliques dont l'inflammation chronique de bas grade et la résistance à l'insuline, principal facteur de risque du diabète de type 2. Les études montrent que la consommation d'un régime hyper lipidique (HFD) représente la cause majeure qui expose à l'obésité et aux pathologies qui lui sont associées. L'obésité induite par un régime HFD s'associe en effet à une inflammation hypothalamique ainsi qu'une altération des circuits neuronaux régissant le contrôle de la balance énergétique, ces altérations sont propices aux développements de résistances à l'insuline et à la leptine. De récentes études montrent que la consommation d'un régime HFD de quelques jours seulement s'accompagne d'une inflammation hypothalamique transitoire, antérieure à l'installation de l'obésité et à l'inflammation périphérique. Ces résultats suggèrent que l'inflammation hypothalamique précoce représente une étape critique dans le développement de l'obésité et de ses altérations. Les médiateurs et les voies de signalisations impliqués dans l'installation de l'inflammation hypothalamique ne sont pas totalement élucidés. Chez les rongeurs, la résistine est associée à l'inflammation et l'insulino-résistance au cours de l'obésité. Bien que majoritairement produite par le tissu adipeux, les études montrent que la résistine est également exprimée par l'hypothalamus ; toutefois, peu d'études renseignent sur son action au niveau central. Notre équipe a démontré chez le rat, qu'une perfusion centrale de résistine altère fortement la sensibilité à l'insuline via l'activation du récepteur TLR4 et l'induction des principales voies de l'inflammation. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude a été d'investiguer le rôle de la voie résistine/TLR4 dans l'installation de l'inflammation hypothalamique associée au régime HFD. Nous montrons pour la première fois que, chez la souris, la consommation d'un régime HFD provoque une augmentation de l'expression génique de la résistine dans l'hypothalamus dès 3 jours de régime HFD. L'expression de la résistine est diminuée jusqu'au niveau basal après 8 jours et est de nouveau fortement augmentée après 8 semaines de régime HFD. Nous montrons que l'augmentation de l'expression de la résistine est concomitante avec la gliose réactionnelle associée au régime HFD de court terme, connue pour précocement altérer l'équilibre de la balance énergétique. De façon intéressante, nous montrons que l'augmentation de l'expression de la résistine est observée dans les neurones anorexigènes POMC, critiques pour le maintien de l'homéostasie énergétique ainsi que dans les tanocytes dont les prolongements contactent les capillaires fenêtrés du sang porte hypothalamohypophysaire et dont l'importance pour l'équilibre de la balance énergétique a été démontrée. De façon intéressante, nous montrons que la résistine active l'inflammation dans les tanocytes via TLR4 suggérant que la résistine pourrait promouvoir l'inflammation au sein des tanocytes en réponse au régime HFD, et ce même à court terme. De plus, nous montrons qu'une ICV de 3 jours de résistine chez la souris provoque une inflammation hypothalamique ainsi qu'une gliose réactionnelle au sein de l'ARC qui rappellent les effets du régime HFD. De façon intéressante, nos résultats montrent que l'inactivation du récepteur TLR4 abolit l'inflammation et la gliose réactionnelle hypothalamiques induites par l'ICV de résistine. L'ensemble nos données démontrent que la voie résistine/TLR4 pourrait jouer un rôle critique dans l'inflammation hypothalamique associée au régime HFD de court et long terme, qui prédispose à l'obésité.

## Abstract

Obesity is closely linked to a cluster of metabolic disorders including chronic low-grade inflammation and insulin resistance, which constitutes a principal risk factor for type 2 diabetes. In rodents, cumulative evidence support that the consumption of high fat diet (HFD) is among the most important nutritional factors predisposing to obesity associated insulin resistance and low-grade inflammation. Indeed, HFD induces hypothalamic inflammation and deregulates energy homeostasis control through the alteration of hypothalamic insulin and leptin responsiveness, considered as the main anorexigenic hormones. In addition, it has been shown that unlike peripheral inflammation, which occurs as a consequence of obesity, hypothalamic inflammation develops selectively in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) within the first days of HFD exposure. These data suggest that hypothalamic inflammation is a critical step in the early onset of the deregulation of energy homeostasis by HFD. The cellular and molecular mechanisms underlying obesity-induced hypothalamic inflammation are still not fully characterized. In rodents, resistin is described as a causal factor in obesity-mediated insulin resistance and type 2 diabetes. Resistin is mainly secreted by adipose tissue in rodents but an endogenous expression of resistin was also reported in the hypothalamus. However, its action at the central level is not fully understood. Our group recently demonstrated that central resistin, via hypothalamic TLR4, promotes overall insulin resistance through the promotion of inflammatory pathway. In this context, we aimed to investigate the role of resistin/TLR4 pathway in HFD-induced hypothalamic inflammation and insulin resistance. In the present study we report for the first time that both short and long term HFD are associated with a significant increase of resistin expression throughout the MBH. Our results revealed a transient increase in resistin mRNA expression in the ARC after 3 days of HFD, followed by a decline to baseline at day 8 and an expression that increases again after 8 weeks of HFD. We showed that the increase of resistin expression is concomitant with short term HFD-induced ARC reactive gliosis, known to early disrupt energy balance and to predispose to obesity. Interestingly, our results revealed that resistin is expressed by POMC neurons which are critical for energy balance and tanocytes that have the specificity to contact both cerebro-spinal fluid and fenestrated capillary in the median eminence. Interestingly, we show that resistin induces tanocytes inflammation through TLR4 suggesting that resistin could promote inflammation in tanocytes in response to short term HFD. Additionally, we show that ICV resistin markedly increases inflammatory markers in the hypothalamic arcuate nucleus in association with reactive gliosis involving recruitment of both microglia and astrocytes. Interestingly, we report that the knockdown of TLR4 almost completely abolished resistin-dependent both hypothalamic inflammation and reactive gliosis. Our data demonstrate that resistin/TLR4 pathway could play a critical role in HFD-diet induced hypothalamic inflammation in response to short and long term HFD which predispose to obesity, a hallmark of metabolic syndrome.