



**HAL**  
open science

# Rôle du FGF21 hypothalamique dans la régulation précoce de l'inflammation de l'hypothalamus mediobasal induite par la consommation du régime hyperlipidique : conséquences sur le contrôle de l'homéostasie glucidique

Coralie Alexandre

## ► To cite this version:

Coralie Alexandre. Rôle du FGF21 hypothalamique dans la régulation précoce de l'inflammation de l'hypothalamus mediobasal induite par la consommation du régime hyperlipidique : conséquences sur le contrôle de l'homéostasie glucidique. Endocrinologie et métabolisme. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASL016 . tel-04055298

**HAL Id: tel-04055298**

**<https://theses.hal.science/tel-04055298>**

Submitted on 2 Apr 2023

**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 du FGF21 hypothalamique dans la régulation  
précoce de l'inflammation de l'hypothalamus  
mediobasal induite par la consommation du régime  
hyperlipidique : conséquences sur le contrôle de  
l'homéostasie glucidique

*Role of hypothalamic FGF21 in the early onset of high-fat diet-induced hypothalamic  
inflammation and glucose intolerance*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°568 : signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)  
Spécialité de doctorat : Life Science and Health  
Réfèrent : Faculté de médecine

Thèse préparée dans l'unité de recherche **NeuroPSI (Université Paris-Saclay,  
CNRS)**, sous la direction du **Dr Yacir BENOMAR**, et sous la co-direction du **Pr  
Mohammed TAOUIS**

**Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 15 mars 2022, par**

**Coralie ALEXANDRE**

**Composition du Jury**

<b>Michael SCHUMACHER</b> DR1, INSERM, U1195	Président
<b>Ralf JOCKERS</b> DR1, INSERM, Institut Cochin, U1016	Rapporteur
<b>Luc PELLERIN</b> Pr, INSERM, Université de Poitiers, U1313	Rapporteur
<b>Catherine POSTIC</b> DR1, CNRS, Institut Cochin, UMR8104	Examinatrice
<b>Christophe MAGNAN</b> Pr, CNRS, Université de Paris, UMR8251	Examineur
<b>Yacir BENOMAR</b> Dr, CNRS, Université Paris-Saclay, UMR9197	Directeur
<b>Mohammed TAOUIS</b> Pr, CNRS, Université Paris-Saclay, UMR9197	Co-Directeur



**Titre :** Rôle du FGF21 hypothalamique dans la régulation précoce de l'inflammation de l'hypothalamus mediobasal induite par la consommation du régime hyperlipidique : conséquences sur le contrôle de l'homéostasie glucidique.

**Mots clés :** obésité, régime hyperlipidique, FGF21, Hypothalamus, inflammation, insulino-résistance

**Résumé :** L'hypothalamus, joue un rôle crucial dans la régulation de la prise alimentaire et de la balance énergétique. L'altération du contrôle hypothalamique, à la suite d'une consommation d'un régime enrichi en lipides (HF), conduit à des désordres métaboliques majeurs contribuant au développement de l'obésité : inflammation hypothalamique et insulino-résistance. Or, il a été montré que l'inflammation hypothalamique apparaît dès quelques jours de consommation d'un régime HF et donc bien avant l'apparition de l'obésité. Ce qui suggère, son rôle causal dans le développement de cette pathologie et des dysfonctions métaboliques associés. Toutefois, les facteurs hormonaux et métaboliques impliqués dans ces altérations restent encore inconnus à ce jour. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés au FGF21 (*Fibroblast growth factor 21*). Cette hépatokine, impliquée dans la régulation du métabolisme des glucides et des lipides, est connue pour ses propriétés anti-inflammatoires et insulino-sensibilisatrices périphériques en situation obésogène. Outre son expression hépatique, il a été récemment rapporté que le FGF21 est également produit dans l'hypothalamus. Cependant, le rôle du FGF21 hypothalamique, son mode d'action ainsi que sa régulation nutritionnelle demeurent très peu documentés à ce jour.

Dans ce contexte, les objectifs principaux de cette thèse ont été de : 1/ caractériser l'expression de FGF21 et ses récepteurs (FGFR1/KLB) dans les noyaux hypothalamiques et les populations cellulaires de l'hypothalamus médio-basal (MBH) . 2/ étudier l'impact de la consommation du régime obésogène HF à court terme (pendant 3 et 8 jours) sur l'expression de FGF21 et de ses récepteurs dans le MBH. 3/ étudier les effets de l'inactivation spécifique de FGF21 dans le MBH, sur le développement précoce de la gliose réactionnelle et l'intolérance au glucose induites par la consommation du régime HF pendant 3 jours.

Tout d'abord, en combinant des techniques d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie, nous avons mis en évidence une expression marquée de FGF21 dans les neurones et les tanocytes du MBH de souris C57Bl/6J. En revanche, aucune expression n'a été détectée ni dans les astrocytes ni dans les cellules microgliales. De plus, nos données révèlent la présence du récepteur à FGF21 (FGFR1) et du corécepteur (KLB) dans les neurones, les tanocytes, la microglie et les astrocytes. Ensuite, nos résultats montrent que la courte exposition au régime HF, pendant 3 et 8 jours, augmente significativement l'expression génique de FGF21, en particulier dans les tanocytes et dans les neurones du MBH. De plus, nous trouvons que l'augmentation de cette expression de FGF21 est corrélée positivement à la gliose réactionnelle et à l'intolérance au glucose induites par le régime HF. Enfin sur la base de ces résultats, nous avons cherché à déterminer le rôle du FGF21 hypothalamique. Pour cela, nous avons étudié l'impact de son inactivation spécifique, dans le MBH de souris C57Bl/6J soumises à 3 jours de régime HF, *via* une approche d'ARN interférent basée sur l'injection stéréotaxique de particules virales adéno-associées (AAV-ShRNA-FGF21). Nous montrons que la diminution dans l'ARC de l'expression de FGF21 exacerbe les effets délétères du régime HF de court terme, avec une gliose réactionnelle plus précoce associée à une accentuation de l'intolérance au glucose. Ces résultats suggèrent donc, pour la première fois, un rôle protecteur du FGF21 hypothalamique. En accord avec ces résultats, nous montrons *in vitro*, sur des cultures de cellules neuronales, microgliales et sur des cultures primaires de tanocytes et d'astrocytes, que le traitement par le FGF21 prévient la réponse inflammatoire induite par une surexposition au palmitate (mimant un régime HF).

**Title :** Role of hypothalamic FGF21 in the early onset of high-fat diet-induced hypothalamic inflammation and glucose intolerance.

**Keywords :** obesity, high fat diet, FGF21, Hypothalamus, inflammation, insulin-resistance.

**Abstract :** The central nervous system, and more particularly the hypothalamus, plays a crucial role in the regulation of food intake and energy balance. The alteration of this hypothalamic control, following the consumption of a high-fat diet (HFD), leads to major metabolic disorders contributing to the development of obesity: hypothalamic inflammation and insulin resistance. However, it has been shown that hypothalamic inflammation appears as early as a few days after the consumption of an HFD and therefore well before the onset of obesity. This suggests its causal role in the development of this pathology and the associated metabolic disorders. However, the hormonal and metabolic factors involved in these alterations remain unknown to this day. In this context, we are interested in FGF21 (Fibroblast growth factor 21). This hepatokine, involved in the regulation of carbohydrate and lipid metabolism, is known for its anti-inflammatory and peripheral insulin-sensitizing properties in obesogenic situations. In addition to its hepatic expression, it has recently been reported that FGF21 is also produced in the hypothalamus. However, the role of hypothalamic FGF21, its action mode and its nutritional regulation remain poorly understood.

In this context, the aims of this thesis were to: 1/ to characterize the hypothalamic nuclei and cell populations of the medio-basal hypothalamus (MBH) expressing FGF21 and its receptors (FGFR1/KLB) 2/ to study the impact of the consumption of the short term HFD (for 3 and 8 days) on the expression of both FGF21 and its receptors in the MBH 3/ to study the effects of specific FGF21 blockade in the MBH on the early development of reactive gliosis and glucose intolerance induced by 3 days HFD consumption.

For aim 1, by combining in situ hybridization and immunohistochemistry techniques, we demonstrated a marked expression of FGF21 in neurons and tanycytes of the MBH (C57Bl/6J mice). In contrast, no expression was detected in either astrocytes or microglial cells. In addition we reveal the presence of the FGF21 receptor (FGFR1) and its coreceptor (KLB) in neurons, tanycytes, microglia and astrocytes.

For aim 2, our results show that short exposure to the HFD, for 3 and 8 days, significantly increases FGF21 gene expression, particularly in tanycytes and in MBH neurons. Remarkably, the increase in this FGF21 expression correlates positively with the reactive gliosis and glucose intolerance induced by the HFD.

Finally, based on these results, we sought to determine the role of hypothalamic FGF21. To this end, we studied the impact of its specific invalidation, in the MBH of C57Bl/6J mice subjected to 3 days of HFD, via an interfering RNA approach based on stereotactic injection of adeno-associated viral particles (AAV-ShRNA-FGF21). We show that the decrease in FGF21 expression in ARC exacerbates the deleterious effects of the short-term HFD, with earlier reactive gliosis associated with an accentuation of glucose intolerance. These results thus suggest, for the first time, a protective role of hypothalamic FGF21. In agreement with these results, we show in vitro, in neuronal and microglial cell cultures and in primary tanycyte and astrocyte cultures, that FGF21 treatment prevents the inflammatory response induced by overexposure to palmitate (mimicking an HFD).

To conclude, this thesis work highlights a potential protective role of FGF21 expressed by tanycytes and MBH neurons in the early regulation of hypothalamic inflammation and glucose intolerance induced by HFD consumption. This work constitutes an important step in the understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in the development of obesity and type 2 diabetes. In the long run, it could open new therapeutic perspectives to fight these pathologies.

## Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres du jury qui ont accepté de consacrer du temps, afin de juger ce travail. Je remercie et suis honorée que le DR Michael SCHUMACHER préside ce jury de thèse. Je remercie également le DR Ralph JOCKERS et le Pr Luc PELLERIN pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail en acceptant d'être rapporteurs et pour l'attention qu'ils ont accordé à ce manuscrit. Je remercie enfin la DR Catherine POSTIC et le Pr Christophe MAGNAN de me faire bénéficier de leurs compétences en acceptant d'examiner ce travail.

Je remercie le Pr Christophe MAGNAN ainsi que le Dr Abdel GOUHMARI pour m'avoir guidée et soutenue ainsi que pour leur bienveillance lors des évaluations de mi-parcours.

Ensuite, je tiens à remercier mon équipe de recherche. Pendant ma thèse, j'ai eu la chance d'être supervisée par le Dr Yacir BENOMAR, qui malgré des périodes difficiles, a été présent pour me guider, m'aider et m'encourager dans mes travaux. Grâce à son encadrement, ses idées et ses nombreuses compétences scientifiques, j'ai acquis une grande autonomie et appris énormément. Je lui suis extrêmement reconnaissante et le remercie pour l'investissement dont il a fait preuve tout au long de ma thèse, cela a été indispensable à ma réussite et à l'élaboration de ce travail.

Un grand merci également au Pr Mohammed TAOUIS de m'avoir fait bénéficier de ses connaissances et de ses conseils. Je lui suis reconnaissante de m'avoir accueillie dans son laboratoire, dès la licence, et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse sur un sujet qui m'a passionné.

Je remercie particulièrement les doctorantes de mon laboratoire avec lesquelles j'ai eu la joie de travailler, Jeanne GUITTON et Sarah AL-RIFAÏ. Elles m'ont été d'une aide précieuse et d'un grand soutien. Je leur souhaite un brillant avenir professionnel et personnel.

Je tiens également à remercier les autres membres présents et passés de mon équipe pour nos échanges divers, notamment Ghislaine POIZAT pour m'avoir formée et pour avoir été un soutien pendant la quasi-totalité de ma thèse. De plus, je remercie Dr Hervé Le STUNFF pour ses précieux conseils et sa bienveillance à mon égard.

Enfin, je souhaite remercier ma famille et mes proches d'avoir été présent pendant toute cette période :

A mes amis du club « les copines d'abord » (Marion, Marie, Marine, Morgane et Doriane), de doctorat (Juliette, Ruy, Bérénice, Lyne, Manuella, Emilia, Sophie), de la danse (Martine, Marion, Marie) pour m'avoir fait rire et relativiser quand j'en avais besoin. Un merci tout particulier à la personne extraordinaire qu'est Marion DESSAINT, pour sa générosité, son écoute, ses encouragements, ses conseils et sa présence. Un petit clin d'œil à mon amie de master Juliette ROYER pour sa relecture et ses conseils avisés. Je lui souhaite une brillante carrière et une vie formidable.

A mes belles-familles pour leurs soutiens. Paul notamment qui a eu la patience et la gentillesse de relire l'intégralité de ma thèse. Cela m'a beaucoup touché.

A mes parents qui sont toujours les premiers à me dire que je vais y arriver. Je suis très chanceuse d'avoir leur soutien et leur confiance au quotidien. Je les remercie pour tout l'amour qu'ils me donnent et qui me permet de m'épanouir avec mes convictions et mes valeurs. Je remercie aussi mon petit frère, dont je suis particulièrement fière et auprès duquel je trouve le calme et la sérénité. Je remercie également ma grand-mère pour tout ce qu'elle m'a donné, j'espère le lui rendre au

centuple.

Enfin, je remercie infiniment mon conjoint pour son soutien quotidien et inconditionnel. Je le remercie également pour ses conseils avisés, son impartialité, son honnêteté, mais surtout pour son amour que je ressens au quotidien. Nous partons maintenant pour une autre aventure, qui je l'espère sera hors du commun.

J'aurai une dernière pensée pour les personnes qui ne sont plus là et qui ont cru en moi, je les en remercie et leur en serais toujours reconnaissante.

Table des matières	
Table des illustrations .....	11
Liste des abréviations.....	13
INTRODUCTION .....	17
L'obésité une maladie métabolique multifactorielle.....	17
Chapitre I : L'inflammation hypothalamique associée à l'obésité.....	18
1. L'homéostasie énergétique.....	18
2. La neuroinflammation hypothalamique associée à l'obésité.....	19
2.1. L'hypothalamus, principal centre régulateur de la prise alimentaire.....	19
2.1.1. L'éminence médiane (EM), un intermédiaire entre le système nerveux central et le système périphérique.....	21
2.1.2. Les noyaux arqués (ARC), premiers centres intégrateurs des informations circulantes périphériques.....	23
2.2. Conséquences de la neuroinflammation induite par l'obésité sur la régulation hypothalamique de l'homéostasie énergétique.....	26
3. La gliose réactionnelle .....	28
3.1. Les astrocytes et les cellules microgliales.....	28
3.2. La gliose réactionnelle associée à un régime enrichi en lipide .....	31
4. Les tancytes, des intermédiaires indispensables entre la périphérie et l'hypothalamus	36
4.1. Détection de métabolite (glucose).....	40
4.2. Transport et sécrétion de neuropeptides.....	41
4.3. Conséquences de l'obésité sur le fonctionnement tancytaire .....	43
Chapitre II : FGF21, une hormone aux actions insulino-sensibilisatrices et anti-inflammatoires en situation d'obésité.....	45
1. Obésité et FGF21.....	45
1.1. L'hépatokine FGF21 .....	47
1.2. Les récepteurs de FGF21 : FGFR1 et KLB.....	49
1.3. La signalisation PPAR .....	52
2. Propriétés insulino-sensibilisatrices de FGF21 en situation d'obésité.....	54
2.1. Impact de FGF21 sur les paramètres physiologiques .....	55
2.2. Implication de FGF21 dans la production de l'adiponectine .....	60
3. Inflammation et FGF21 .....	64
3.1. Lien entre obésité et inflammation chronique .....	65



3.1.1.	Mécanismes d'infiltration du TA par les macrophages.....	66
3.1.2.	Activation du phénotype pro-inflammatoire des ATM.....	68
3.2.	Actions anti-inflammatoires périphériques de FGF21 .....	72
Chapitre III : Action centrale de FGF21 .....		74
1.	Expression centrale de FGF21 et de ses récepteurs.....	74
2.	FGF21 et la barrière hémato-encéphalique.....	76
2.1.	Description de la BHE en condition physiologique .....	76
2.2.	Perturbation de la BHE – Action de FGF21 sur les cellules endothéliales microvasculaires de la BHE .....	77
3.	Effets neuroprotecteurs de FGF21.....	82
3.1.	Action antioxydante et anti-apoptotique.....	82
3.1.1.	Le stress oxydant.....	82
3.1.2.	Action antioxydante et anti-apoptotique de FGF21 en situation pathologique 83	
3.2.	Action anti-inflammatoire .....	86
3.3.	Relation entre le rôle neuroprotecteur de FGF21 et les fonctions cognitives.....	88
3.4.	Rôle neuroprotecteur indirect de FGF21 .....	89
4.	Action centrale de FGF21, répercussions périphériques.....	90
4.1.	Action de FGF21 sur la thermogénèse .....	90
4.2.	FGF21 et la réponse adaptative aux excès en macronutriments (glucides et protéines).....	95
4.3.	FGF21 et la réponse adaptative au jeûne.....	100
CONTEXTE et OBJECTIFS de la thèse .....		105
RESULTATS .....		107
DISCUSSION et PERSPECTIVES.....		132
CONCLUSION GENERALE.....		146
MATERIELS et METHODES .....		148
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		166
ANNEXES .....		178

## Table des illustrations

TABLEAU 1 : SUGGESTION D'UNE NOUVELLE CLASSIFICATION FONCTIONNELLE DES TANYCYTES PAR PREVOT & AL 2018. ....	39
TABLEAU 2 : LES ANALOGUES EXISTANTS DU FGF21. ....	49
TABLEAU 3 : DISCUSSION DE LA DEPENDANCE A L'ADIPONECTINE DES EFFETS BENEFIQUES DE FGF21. ....	63
TABLEAU 4 : CARACTERISATION DU PROFIL D'EXPRESSION DE L'ARNM FGFR1 DANS LE CERVEAU. ....	75
FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES NOYAUX ET AIRES HYPOTHALAMIQUES .21	
FIGURE 2 : SCHEMA RECAPITULATIF ILLUSTRANT LES CIRCUITS NEURONAUX AGRP.....	25
FIGURE 3 : DIFFERENTS STADES D'ACTIVATION DES CELLULES MICROGLIALES ET DES ASTROCYTES. ....	30
FIGURE 4 : ROLE DES ASTROCYTES DANS LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE. ....	30
FIGURE 5 : INDUCTION DE LA GLIOSE REACTIONNELLE HYPOTHALAMIQUE EN SITUATION D'OBESEITE.....	35
FIGURE 6 : SCHEMA DE L'ORGANISATION DES TANYCYTES ET DES EPENDYMOCYTES AINSI QUE DE LEUR PROFIL D'EXPRESSION DES PROTEINES DE JONCTION, DANS LA REGION TUBERALE DE L'HYPOTHALAMUS.....	37
FIGURE 7 : HYPOTHESES DU MECANISME DE DETECTION DU GLUCOSE PAR LES TANYCYTES HYPOTHALAMIQUES.....	41
FIGURE 8 : LA PLASTICITE DES PROLONGEMENTS DES TANYCYTES MODULE LA SECRETION DE GNRH.....	42
FIGURE 9 : SCHEMA RECAPITULATIF DES PRINCIPALES CONCLUSIONS DE DIFFERENTES ETUDES SUR LES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES ET SUR LE POTENTIEL THERAPEUTIQUE DE FGF21.....	46
FIGURE 10 : ORGANISATION DES RECEPTEURS FGFR.....	50
FIGURE 11 : MODELE DE MECANISME DE SIGNALISATION CELLULAIRE DE FGF21.....	52
FIGURE 12 : SCHEMA REPRESENTANT LES ACTIONS DE FGF21, DEPENDANTES ET INDEPENDANTES, DE L'ACTION DE L'INSULINE HEPATIQUE POUR REGULER LES METABOLISMES GLUCIDIQUE ET LIPIDIQUE. ....	57
FIGURE 13 : LE FGF21, UN SECRETAGOGUE POST-PRANDIAL DU PANCREAS EXOCRINE. ....	59
FIGURE 14 : LE FGF21 FAVORISE L'EXPRESSION ET LA SECRETION DE L'ADIPONECTINE DANS LES ADIPOCYTES, GRACE A PPAR $\gamma$ . ....	62
FIGURE 15 : MECANISMES REGULANT LA POLARITE DES MACROPHAGES ET LA RESISTANCE A L'INSULINE DANS LE TA. ....	67
FIGURE 16 : LES VOIES DE SIGNALISATION PRO-INFLAMMATOIRES CONDUISANT A L'ACTIVATION DES MACROPHAGES M1 ET A L'INSULINO-RESISTANCE.....	69
FIGURE 17 : COMPLEXE DE COREPRESSEURS QUI REGULE NEGATIVEMENT L'ACTIVATION DES MACROPHAGES M1.....	71
FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UNITES NEUROVASCULAIRES DE LA BHE... 78	

FIGURE 19 : DESCRIPTION DE LA COMPOSITION DES JONCTIONS SERREES DES CELLULES ENDOTHELIALES DE LA BHE.....	79
FIGURE 20 : FGF21 LIMITE POTENTIELLEMENT LA PERMEABILITE DE LA BHE LORS D'UN DT2 EN INDUISANT LA VOIE DE SIGNALISATION KEAP1/NRF2.....	81
FIGURE 21 : ACTION POTENTIELLE DU FGF21 POUR LUTTER CONTRE LE VIEILLISSEMENT CEREBROVASCULAIRE INDUIT PAR L'ANGIOTENSINE II.....	82
FIGURE 22 : MODELE DE REGULATION DE L'EXPRESSION D'UCP1 PAR LE SYSTEME ADRENERGIQUE DANS LES ADIPOCYTES BRUNS.....	92
FIGURE 23 : ACTION CENTRALE DE FGF21 POUR FAVORISER LES DEPENSES ENERGETIQUES ET LA PERTE DE POIDS.....	93
FIGURE 24 : SCHEMA RECAPITULATIF DE L'ACTION CENTRALE DE FGF21 EN SITUATION DE RESTRICTION CALORIQUE.....	96
FIGURE 25 : MODELE DE REGULATION DE LA PREFERENCE AUX SUCRES SIMPLES.....	98
FIGURE 26 : SCHEMA RECAPITULATIF DE L'ACTION DE FGF21 SUR LES NEURONES GLUTAMATERGIQUES POUR SUPPRIMER LA PRISE DE CARBOHYDRATES.....	100
FIGURE 27 : SCHEMA ILLUSTRANT L'ACTION DE FGF21 SUR L'AXE GONADOTROPE.....	102
FIGURE 28 : SCHEMA ILLUSTRANT L'IMPLICATION DU FGF21 TANYCYTAIRE DANS LE MAINTIEN DE L'HOMEOSTASIE LIPIDIQUE PENDANT LE JEUNE.....	104
FIGURE 29 : RESUME GRAPHIQUE DES RESULTATS PRINCIPAUX DE LA THESE.....	146

## Liste des abréviations

Acronyme	Forme développée
3V	troisième ventricule
Acaca	<i>acetyl-CoA carboxylase a</i>
ACTH	<i>adrénocorticotropine</i>
AGE	<i>advanced glycation end</i>
AgRP	<i>agouti-related peptide</i>
AKT	<i>protein kinase B</i>
amp	ampicilline
AMPK	<i>5'-AMP-activated protein kinase</i>
Ang II	angiotensine II
AP-1	<i>activator protein 1</i>
ARC	noyau arqué ou arcuate nucleus
Atgl	<i>adipose triglyceride lipase</i>
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
AVC	accident vasculaire cérébral
AVP	<i>arginine vasopressin</i>
A $\beta$	amyloïde bêta
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BHE	barrière hémato-encéphalique
BLBP	<i>brain lipid binding protein</i>
Bmal1	<i>brain and muscle arnt-like protein-1</i>
CA	<i>hippocampus proper</i>
CART	<i>cocaine and amphetamine regulated transcript</i>
CAT	<i>catalase</i>
CCL2	<i>chemokine C-C motif ligand 2</i>
CD	chow diet ou régime standard
CD11b	<i>cluster of differentiation 1b</i>
CD11c	<i>cluster of differentiation 1c</i>
CD36	<i>cluster of differentiation 36</i>
CD68	<i>cluster of differentiation 68</i>
ChREBP	<i>carbohydrate response element binding protein</i>
ChREBP	<i>carbohydrate-responsive element-binding protein</i>
clock	<i>circadian locomotor output cycles kaput</i>
Cox7a	<i>cytochrome c oxidase subunit 7a</i>
Cox8b	<i>cytochrome c oxidase subunit 8b</i>
CRF	<i>corticotropin-releasing factor</i>
CRH	<i>corticotropin-releasing hormone</i>
CXCL1	<i>chemokine C-X-C motif ligand 1</i>
DA	<i>dopamine</i>
DG	<i>dentate gyrus</i>

Dio2	<i>deiodinase 2</i>
DMH	<i>dorsomedial hypothalamus</i>
DT2	<i>diabète de type 2</i>
DVC	<i>dorsal-vagal complex</i>
Elovl3	<i>elongation of very long chain fatty acids like 3</i>
EM ou ME	<i>éminence médiane ou median eminence</i>
ENA	<i>extrait non azotée</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
erbB1	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
F4/80	<i>EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1</i>
FABP4	<i>fatty acid-binding protein 4</i>
FFA	<i>free fatty acid</i>
FGF	<i>fibroblast growth factors</i>
FGF21	<i>fibroblast growth factors 21</i>
FGFR1	<i>fibroblast growth factor receptor 1</i>
FRS2	<i>FGFR substrate-2</i>
FSH	<i>follicle-stimulating hormone</i>
FXR	<i>farnesoid X receptor</i>
G6Pase	<i>glucose 6-phosphatase</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GHRH	<i>growth hormone-releasing hormone</i>
GLUT1	<i>glucose transporter 1</i>
GLUT2	<i>glucose transporter 2</i>
GnRH	<i>gonadotropin-releasing hormone</i>
GPx	<i>glutathion peroxydase</i>
GSK3	<i>glycogen synthase kinase 3</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>peroxyde d'hydrogène</i>
HBMEC	<i>human brain microvascular endothelial cells</i>
hBVSMC	<i>human brain vascular smooth muscle cells</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HFD ou régime HF	<i>high fat diet ou régime high fat</i>
HO <sup>•</sup>	<i>radical hydroxyle</i>
HSL	<i>hormone-sensitive lipase</i>
HSP72	<i>heat shock protein 72</i>
IBA1	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
IFN-β	<i>interferon beta</i>
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL-10	<i>interleukin-10</i>
IL-1β	<i>interleukine-1β</i>
IL-34	<i>interleukin-34</i>
IL-4	<i>interleukin-4</i>
IL-6	<i>interleukin-6</i>
IR	<i>insulin receptor</i>
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>

IRF8	<i>interferon regulatory factor 8</i>
IRS2	<i>insulin receptor substrate 2</i>
ISRE	<i>interferon-stimulated response element</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Keap1	<i>kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KLB	<i>β-Klotho</i>
Lct	<i>lactase-like protein</i>
LCR	liquide céphalo-rachidien
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LepRb ou ob	<i>leptin receptor b</i>
LH	<i>luteinizing hormone</i>
LHA	<i>lateral hypothalamus</i>
LPS	<i>bactériale lipopolysaccharide</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MBH	hypothalamus médio-basal
MC4R	<i>melanocortin 4 receptor</i>
MCH	<i>melanin-concentrating hormone</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein 1</i>
MHCII	<i>major histocompatibility complex class II molecules</i>
mHYPO	<i>embryonic mouse hypothalamic cell line</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinases</i>
MSH	<i>melanocyte-stimulating hormone</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mTORC1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response 88</i>
NAF1	<i>nuclear assembly factor 1</i>
Nampt	<i>nicotinamide phosphoribosyltransférase</i>
NASH	stéatohépatite non alcoolique
NCoR	<i>nuclear receptor corepressor</i>
Nesf-1	<i>nesfatin-1</i>
NeuN	<i>hexaribonucleotide binding protein-3</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NG	<i>nodose ganglion</i>
NG	<i>nodose ganglion</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
NO	<i>nitric oxide</i>
NPY	<i>neuropeptide Y</i>
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NTS	<i>nucleus tractus solitarii</i>
NTS	<i>nucleus tractus solitarii</i>
NUCB2	<i>nucleobindin 2</i>
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	anion superoxyde
OLIGO2	<i>oligodendrocyte transcription factor</i>
OMS	organisation mondiale de la santé
Pepck	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>
Per2	<i>period circadian regulator 2</i>

PGC-1 $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math> coactivator-1<math>\alpha</math></i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinases</i>
POMC	<i>pro-opiomélanocortine</i>
PPAR $\alpha$	<i>peroxisome proliferator-activated receptors <math>\alpha</math></i>
PPAR $\gamma$	<i>peroxisome proliferator-activated receptors <math>\gamma</math></i>
PRR	<i>pattern-recognition receptors</i>
PSD95	<i>postsynaptic density protein 95</i>
PVN	<i>paraventricular nucleus</i>
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RTqPCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>
S6k	<i>S6 kinase</i>
Scd1	<i>stearoyl-coenzyme A desaturase 1</i>
SCN	<i>suprachiasmatic nucleus</i>
SHP2	<i>src-homology domain-2-containing phosphatase 2</i>
SHSY5Y	<i>human neuroblastoma cell line</i>
Siah-1	<i>siah E3 ubiquitin protein ligase 1</i>
Sim1	<i>single-minded 1 transcription factor</i>
SIRT1	<i>déacétylase sirtuin1</i>
SNC	<i>noyaux suprachiasmatic</i>
SNC	<i>système nerveux central</i>
SNcp	<i>substantia nigra pars compacta</i>
SOCS3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
SOD	<i>superoxide dismutase</i>
SOX2	<i>sex determining region Y-box 2</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STAT6	<i>signal transducer and activator of transcription 6</i>
SVZ	<i>subventricular zone</i>
T4	<i>thyroxine</i>
TA	<i>tissue adipeux</i>
T-AOC	<i>total anti-oxidation capability</i>
TBL1	<i>transducin <math>\beta</math>-like protein 1</i>
TBLR1	<i>transducin <math>\beta</math>-like protein 1-related protein</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
TLR	<i>toll-like receptors</i>
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRF2	<i>telomeric repeat binding factor 2</i>
TRH	<i>thyrotropin-releasing hormone</i>
Trx2	<i>thioredoxin 2</i>
Ubch5	<i>ubiquitin conjugating enzyme 5</i>
UCP-1	<i>uncoupling protein 1</i>
VMH	<i>ventromedial hypothalamus</i>
VMH	<i>ventromedial hypothalamus</i>
ZO	<i>zonula occludens</i>

# INTRODUCTION

## L'obésité une maladie métabolique multifactorielle

L'obésité représente un des problèmes majeurs de santé publique à travers le monde. Elle est considérée, par la fédération mondiale de l'obésité, comme une maladie évolutive chronique récurrente, diminuant la qualité de vie et l'espérance de vie des individus atteints. Cette maladie est souvent associée à des facteurs de comorbidité tels que le diabète de type 2 (DT2), les maladies cardio-vasculaires (hypertension et AVC *accident vasculaire cérébral*) et les cancers (de l'endomètre, du sein, de l'ovaire, de la prostate, du foie, de la vésicule biliaire, des reins et du côlon). L'obésité ainsi que le surpoids sont définis par l'OMS (*Organisation mondiale de la santé*), comme une accumulation anormale ou excessive de graisse pouvant nuire à la santé. De plus, il est actuellement reconnu par l'OMS que l'obésité est généralement associée à une inflammation chronique et à une insulino-résistance, constituant des facteurs de risque importants du DT2.

Le diagnostic de l'obésité se base sur l'analyse de l'indice de masse corporelle (IMC), calculé selon le rapport : poids (kg) / taille<sup>2</sup> (m) de l'individu. Cet indicateur est indépendant du sexe et de l'âge de la personne. Une personne adulte est estimée obèse lorsque son IMC est supérieur ou égal 30 et en surpoids quand son IMC est supérieur ou égal 25. En 2016, d'après l'OMS, 13% de la population adulte mondiale étaient obèse et 39% en surpoids. En 2019 les estimations de l'OMS montrent une évolution dramatique des chiffres de l'obésité chez les enfants de moins de 5 ans, dont 38 millions étaient considérés en surpoids ou obèses.

Les causes de cette maladie sont multifactorielles. Elles incluent les prédispositions génétiques et épigénétiques, des apports énergétiques déséquilibrés, un manque d'activité physique, une perturbation du microbiote intestinal ainsi que des expositions à des facteurs environnementaux néfastes (comme le stress, les polluants, les problèmes de sommeil, la prise de médicaments).



# Chapitre I : L'inflammation hypothalamique associée à l'obésité

## 1. L'homéostasie énergétique

L'obésité résulte principalement de la perturbation de la balance énergétique. L'homéostasie énergétique est un équilibre entre les apports et les dépenses énergétiques permettant de stabiliser le poids corporel. Les apports proviennent principalement de la nourriture, tandis que les dépenses journalières sont réalisées à 10% par la digestion, à 15-30% par l'activité physique et à 60-75% par le métabolisme basal. Il est connu que les apports en nutriments sont détectés par le système nerveux. Celui-ci est donc sensible au statut énergétique de l'organisme, ce qui permet d'adapter les apports et les dépenses énergétiques. Deux structures sont impliquées dans la régulation de la prise alimentaire, du métabolisme énergétique et glucidique. Il s'agit de l'hypothalamus (cf. : I.2.1) et du tronc cérébral. Ce dernier intègre et relaye les informations nerveuses afférentes périphériques au système nerveux central, particulièrement au niveau hypothalamique, *via* le nerf glosso-pharyngien, le nerf crânien IX et le nerf vagal. Parallèlement à l'intégration des afférences transmises par le tronc cérébral, l'hypothalamus est lui-même capable de détecter des variations en nutriments et ainsi de participer directement au contrôle de l'homéostasie énergétique. Par exemple, grâce à des neurones sensibles au glucose, il peut détecter la glycémie et adapter la prise alimentaire en conséquence. De plus, il est aussi capable de répondre à certains signaux endocriniens, telle que la leptine, une hormone anorexigène. En revanche, ces capacités de détection et de réponse aux signaux circulants sont fortement perturbées en situation d'obésité, lorsque les apports énergétiques sont largement supérieurs aux dépenses. En effet, l'augmentation de la masse adipeuse au cours de l'obésité s'accompagne d'une infiltration des macrophages dans les tissus adipeux (TA), promouvant ainsi le développement d'une inflammation chronique de bas grade qui affecte les tissus périphériques, mais aussi le système nerveux central et en particulier l'hypothalamus. Cette inflammation chronique pourrait être impliquée non seulement dans l'installation des perturbations métaboliques associées à l'obésité, mais aussi dans le développement de cette pathologie. En effet, l'accumulation de preuves montrant que la consommation d'un régime obésogène favorise le développement précoce à la fois de l'inflammation (marquée par une neuroinflammation et une gliose réactionnelle) et des résistances à l'insuline et à la leptine au niveau hypothalamique, conduisant à l'altération du contrôle hypothalamique de l'homéostasie énergétique et au développement de l'obésité.

Dans la suite de ce chapitre, consacré à la description du rôle de l'hypothalamus dans la régulation de l'homéostasie énergétique, je débiterai par la description de la neuroinflammation puis de la gliose réactionnelle hypothalamique en situation d'obésité. Je terminerai par la description des tanycytes, qui sont des cellules jouant des rôles fondamentaux dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Enfin, j'étudierai les perturbations hormonales ultérieurement dans le second chapitre.

## **2. La neuroinflammation hypothalamique associée à l'obésité**

Actuellement, il est reconnu que l'obésité est associée à une inflammation de bas grade périphérique dans les tissus métaboliques (cf. : II.3). De manière similaire, au niveau central, des études décrivent une relation entre inflammation et obésité, notamment dans l'hypothalamus. Cette inflammation spécifique du système nerveux central (SNC) est appelée neuroinflammation<sup>1</sup>. Contrairement à l'inflammation périphérique, elle n'implique pas les lymphocytes qui en condition physiologique passent difficilement la barrière hémato-encéphalique (BHE)<sup>2</sup>. Cependant, elle nécessite l'intervention de cellules spécifiques au SNC constituant le parenchyme hypothalamique : les cellules microgliales, les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones. En effet, la neuroinflammation hypothalamique est un dysfonctionnement neuronal (résistance hormonale) associé à une gliose réactionnelle ; lorsque ces phénomènes deviennent chroniques, ils causent une altération de la régulation centrale du comportement alimentaire, favorisant le développement de l'obésité<sup>1,3</sup>.

Pour expliquer l'impact de l'inflammation centrale en condition obésogène, je vais tout d'abord décrire la structure de l'hypothalamus et énumérer quelques-unes de ses fonctions métaboliques physiologiques. Ensuite, je définirai indépendamment deux structures hypothalamiques cruciales pour la régulation de l'homéostasie énergétique, l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARC). Puis je conclurai cette partie en décrivant les mécanismes sous-tendant le développement de l'inflammation hypothalamique dans un contexte d'obésité.

### **2.1. L'hypothalamus, principal centre régulateur de la prise alimentaire**

L'hypothalamus est une structure du SNC à la base du cerveau, formant la partie ventrale du diencephale. Il se situe sous le thalamus et au-dessus de l'hypophyse avec laquelle il est relié par la tige pituitaire<sup>4</sup>. L'hypothalamus est compartimenté en trois régions parasagittales

adjacentes : périventriculaire, médiale et latérale, qui sont elles-mêmes subdivisées suivant l'axe antéro-postérieur en région pré-optique, antérieure, tubérale et mamillaire. Cette structure hypothalamique, hautement conservée chez les vertébrés, s'organise en noyaux et aires dispersés de façon symétrique, pour la plupart, de part et d'autre du troisième ventricule (3V)<sup>4</sup>. Ces régions se distinguent par leurs populations neuronales distinctes impliquées dans des fonctions métaboliques variées<sup>4,5</sup>. Par exemple, le comportement sexuel fait intervenir des régions de la zone médiale pré-optique et périventriculaire tubérale/mamillaire, le système veille/sommeil dépend lui de la zone latérale pré-optique alors que les comportements défensifs et agressifs sièges respectivement dans la zone médiale tubérale et mamillaire<sup>4</sup>. D'autres fonctions sont conférées à l'hypothalamus, telles que la thermorégulation corporelle (zone médiale pré-optique et périventriculaire) et le contrôle de l'homéostasie énergétique (zone périventriculaire).

En effet, l'hypothalamus est connu pour être le principal centre régulateur de l'homéostasie énergétique depuis les années 1940. Six structures sont impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique : le VMH (*ventromedial hypothalamus*), la LHA (*lateral hypothalamus*), le PVN (*paraventricular nucleus*), le DMH (*dorsomedial hypothalamus*), l'ARC et l'EM<sup>4</sup> (*Figure 1 : Représentation schématique des noyaux et aires hypothalamiques*). L'implication de ces structures a été démontrée sur de nombreux modèles mammifères par des expériences de stimulation électrique ou lésionnelles induisant des anomalies de la prise alimentaire et de régulation du poids corporel<sup>6,7</sup>. Par exemple, la lésion de la LHA, appelée « centre de la faim », entraîne une perte de poids tandis que la lésion du VMH, identifié comme « centre de satiété », engendre une hyperphagie et une obésité<sup>6</sup>. De plus, ces divers noyaux sont interconnectés *via* le réseau neuronal très développé afin de maintenir l'homéostasie<sup>8</sup>.

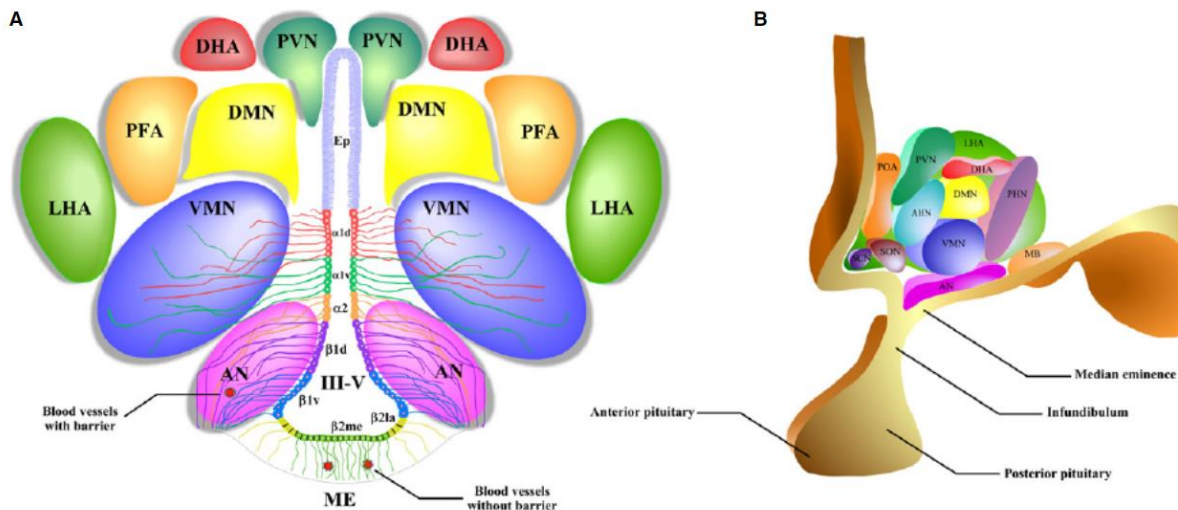


Figure 1 : Représentation schématique des noyaux et aires hypothalamiques

(A) Vue coronale des localisations approximatives d'aires et des noyaux hypothalamiques disposés de façon symétrique de part et d'autre du troisième ventricule, lui-même bordé par les tanocytes ( $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ) et les épendymocytes. (B) Vue sagittale de la distribution des aires et des noyaux hypothalamiques. Figures issues de l'article de Elizondo-Vega & al. de 2015<sup>9</sup>. ep (ciliated ependymocytes), ME (median eminence), AN (arcuate nucleus), VMN (ventromedial nucleus), DMN (dorsomedial nucleus), PVN (periventricular nucleus), DHA (dorsal hypothalamic area), PFA (perifornical area), LHA (lateral hypothalamic area), SCN (suprachiasmatic nucleus), POA (preoptic area), MB (mammillary bodies), III-V (third ventricle).

Dans ce travail de thèse, nous avons focalisé nos investigations sur l'hypothalamus médio-basal (MBH). Il regroupe l'EM et les deux noyaux ARC situés de part et d'autre de celle-ci et du 3V. Ces structures sont les premières au contact de la circulation sanguine et les premiers centres intégrateurs hypothalamiques des informations périphériques.

### 2.1.1. L'éminence médiane (EM), un intermédiaire entre le système nerveux central et le système périphérique

L'hypothalamus joue un rôle déterminant dans le maintien de l'homéostasie énergétique, en servant d'intermédiaire entre le système nerveux central et endocrinien. En effet, il intègre et transmet à des structures cérébrales plus profondes les informations périphériques relatant l'état physiologique de l'organisme. Ces informations véhiculées par des hormones et des métabolites (comme le glucose ou les lipides<sup>10</sup>) influent sur le comportement alimentaire et *in fine* sur le poids corporel. Un des accès vers l'hypothalamus pour ces molécules (hormones et métabolites) sont les organes circumventriculaires situés à proximité du 3V ou du quatrième

ventricule<sup>11,12</sup>. Ces régions sont caractérisées comme étant des interfaces entre le sang et le cerveau, du fait de leur rôle de barrière établis par la présence de jonctions serrées<sup>13</sup>. Leur rôle étant de limiter et de contrôler les échanges de particules entre la circulation sanguine et le cerveau. Six sont répertoriés et répartis en trois groupes : celui de l'organe subcommissural ; celui des sensoriels comprenant l'organe vasculaire de la lame terminale, l'organe subfornical, l'area postrema et celui des sécréteurs dont font partie l'EM et la glande pinéale. Ce dernier groupe est distinguable des autres notamment par la capacité des structures à libérer des molécules dans la circulation sanguine.

L'EM se trouve à la base de l'hypothalamus et du 3V dans le cerveau des mammifères. Elle forme un renflement sur le tuber cinereum postérieur à l'infundibulum au sommet de la tige pituitaire. Elle est délimitée par les pédoncules cérébraux dans la région postérolatérale, latéralement par les noyaux ARC, et par le chiasma optique dans la région antérolatérale<sup>11</sup>. L'EM, ainsi que les autres organes circumventriculaires, s'organise en trois zones : épendymaire au contact du liquide céphalo-rachidien (LCR), subépendymale et vasculaire<sup>11</sup>. Pour l'EM, la zone épendymaire est composée par les corps cellulaires des tancytes brochant le 3V (cf. : I.4). Ces cellules créent une barrière *via* l'expression de protéines de jonction serrées limitant ainsi la diffusion des particules circulantes vers le LCR<sup>14</sup>. La deuxième zone, juste en dessous, est composée du parenchyme subépendymal comportant les prolongements émis par les tancytes mais aussi des cellules gliales [des astrocytes, des cellules microgliales (cf. : I.3.1) et des terminaisons axonales (de neurones à GnRH, *gonadotropin-releasing hormone*)]<sup>12,15,16</sup>. La zone vasculaire, quant à elle, se compose d'un réseau vasculaire hypothalamo-tubéro-antéhypophysaire riche et complexe qui draine un volume important de sang à faible débit dans l'EM. Ce réseau a la particularité d'être constitué de capillaires fenêtrés, très perméables, ce qui implique que cette zone est dépourvue de barrière hémato-encéphalique<sup>11</sup>. Par conséquent les molécules sanguines circulantes diffusent facilement dans le parenchyme cérébral et les hormones hypothalamiques telles que la GnRH, TRH (*thyrotropin-releasing hormone*), CRF (*corticotropin-releasing factor*), GHRH (*growth hormone-releasing hormone*) et DA (*dopamine*) peuvent être libérées facilement dans le système porte hypothalamo-hypophysaire afin de réguler l'action de l'anté-hypophyse.

### 2.1.2. Les noyaux arqués (ARC), premiers centres intégrateurs des informations circulantes périphériques

Du fait de son organisation, l'EM est un passage privilégié pour les hormones et métabolites circulants vers les premiers centres intégrateurs hypothalamiques adjacents, les noyaux ARC. Ils sont tous deux symétriquement disposés de part et d'autre du 3V, sous le VMH et au contact du LCR<sup>4</sup>. La partie de l'ARC en contact avec le LCR est bordée, comme pour l'EM, de tanocytes (cf. : I.4). Ces cellules ne forment pas une barrière hémato-encéphalique stricte, ce qui facilite l'accès des molécules contenues dans le LCR, aux neurones des noyaux ARC (cf : I.2.1.2)<sup>11</sup>. Ces populations neuronales sont dites de premier ordre car ce sont les premières à intégrer et relayer les informations périphériques contenues dans le LCR vers des structures hypothalamiques plus internes. Certaines sont impliquées dans la régulation de l'axe gonadotrope (les neurones à GnRH et les neurones kisspeptine), somatotrope (les neurones à GHRH), ou dopaminergique.

Néanmoins, les deux populations les plus connues sont celles du système à mélanocortine qui relaie rapidement les informations sur le statut énergétique afin d'adapter le comportement alimentaire. La première est celle des neurones anorexigènes co-exprimant la *proopiomelanocortin* (POMC) et le *cocaine and amphetamine regulated transcript* (CART)<sup>17</sup>. La seconde est celle des neurones orexigènes co-exprimant le *neuropeptide Y* (NPY) et l'*agouti-related peptide* (AgRP)<sup>18</sup>. Elles ont été identifiées dans un premier temps par leur réponse à l'action centrale de la leptine. En effet, toutes deux expriment le récepteur à la leptine (*LepRb*) ce qui permet à l'hormone anorexigène de stimuler l'action des neurones POMC et d'inhiber celle des neurones NPY et AgRP<sup>17,18</sup>. Ultérieurement, des techniques pharmacogénétiques et optogénétiques ont démontré que les premiers réduisent effectivement la prise alimentaire et augmentent la dépense énergétique tandis que les seconds ont une action totalement opposée<sup>18-20</sup>. Leurs rôles antagonistes sont exercés sur les neurones exprimant le récepteur MC4R (*melanocortin 4 receptor*) dans des zones cérébrales distinctes.

D'une part, les neurones dit POMC de l'ARC<sup>17</sup> expriment le transcrit du même nom en réponse à la leptine, l'insuline et le glucose mais pas en réponse à la ghréline. Une fois synthétisé, le transcrit POMC code pour un précurseur d'hormone polypeptidique qui, à la suite d'une protéolyse tissu-spécifique et de modifications post-traductionnelles, génère l'adrénocorticotropine (ACTH), l' $\alpha/\beta/\gamma$ -*melanocyte-stimulating hormone* (MSH) et la  $\beta$ -

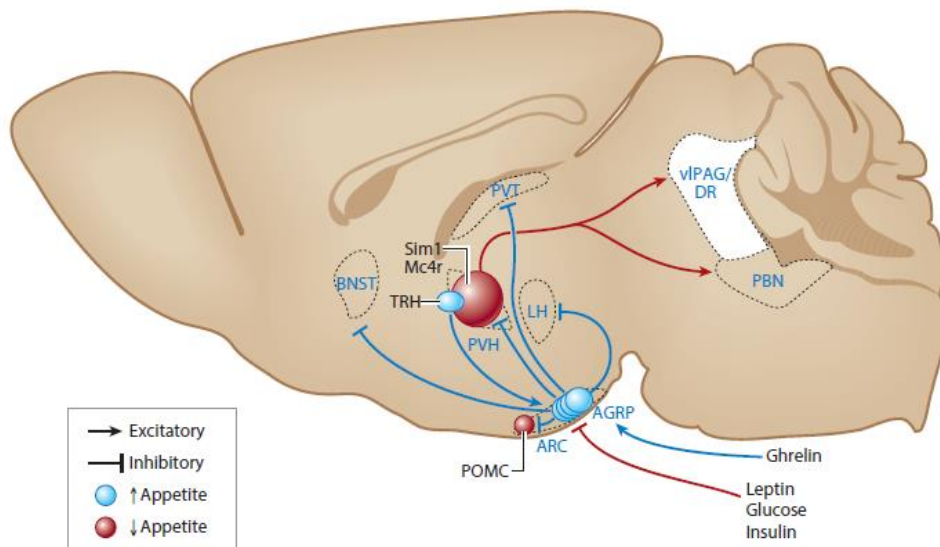
endorphine. Or tous ces produits modulent la prise alimentaire et les dépenses énergétiques. Une perturbation des modifications post-traductionnelles du transcrit POMC favorisera donc le développement de l'obésité que ce soit chez l'homme ou l'animal<sup>17,21</sup>.

D'autre part, l'altération du réseau neuronal POMC peut elle aussi favoriser un déséquilibre de l'homéostasie énergétique, notamment, parce que ces neurones glutamatergiques émettent des projections dans des structures cérébrales cruciales pour la régulation de la prise alimentaire et du métabolisme énergétique : le PVN, la LHA, le DMH, le VMH et le tronc cérébral. Par exemple, à la naissance ces projections axonales sont incomplètes et deviennent matures seulement après la lactation. Celles vers le DMH le sont à P6 (6 jours post-natales) alors que celles vers le PVN le sont à P8-10<sup>22</sup> chez la souris. Pour devenir matures, elles nécessitent l'action de la leptine présente dans le lait maternel, qui lors des premiers stades de développement post-natal a davantage une fonction neurotrophique qu'anorexigène. En effet, la leptine favorise la croissance axonale post-natale des neurones POMC ainsi que l'autophagie, afin de former un réseau neuronal fonctionnel et optimal<sup>23,24</sup>. L'implication de cette hormone est démontrée *via* l'altération généralisée de sa signalisation (chez des souris ob/ob), car les animaux n'exprimant pas son récepteur fonctionnel possèdent moins de projections dans le PVN comparé aux animaux contrôles<sup>17,23,24</sup>. De plus, des troubles similaires sont constatés chez la descendance si le taux de leptine maternelle est lui aussi altéré. Ce dernier peut l'être si l'état physiologique de la mère pendant la gestation et / ou l'allaitement est anormal (obésité ou maigreur)<sup>23,24</sup>. Si la mère est maigre, la leptine est faiblement produite en raison de réserves en graisse amoindries<sup>17,25,26</sup>. Par conséquent, elle est peu retrouvée dans le lait, limitant ainsi le développement du réseau anorexigène POMC chez la descendance, la prédisposant ainsi à développer une obésité. Dans la situation opposée, lorsque la mère est obèse (chez les souris DIO nourries avec un régime HF), la descendance développe une couverture gliale sur les neurones POMC entraînant une diminution des entrées inhibitrices et une amélioration de la détection du glucose<sup>27</sup>. Cela affecte le développement des neurocircuits POMC, prédisposant aussi la descendance à développer ultérieurement une obésité et des troubles métaboliques<sup>28</sup>. C'est ce qu'on appelle un phénomène d'empreinte maternelle.

Outre la leptine, d'autres hormones (l'insuline) et nutriments (le glucose, certains lipides, les acides aminés) régulent positivement l'activité des neurones POMC adultes, leur plasticité synaptique, leurs projections axonales tandis que certaines hormones les régulent

négativement (la ghréline)<sup>19</sup>. A ces différents signaux, les neurones POMC ne répondent pas de façon identique. Ils peuvent ainsi affecter l'apport alimentaire, la dépense énergétique ou le métabolisme du glucose. En effet, la population neuronale POMC est complexe et hétérogène du fait de la diversité de ses projections, des récepteurs hormonaux exprimés mais aussi par ses réponses aux variations de la concentration en glucose (émission du courant postsynaptique exciteur spontané)<sup>29</sup>.

Deuxièmement, les neurones AgRP constituant la population à mélanocortine orexigène émettent des projections inhibitrices dans l'ARC, le PVN, la LHA, mais aussi dans le BNST (*bed nucleus of the stria terminalis*) et, dans une moindre mesure, dans le PVT (*paraventricular thalamic nucleus*)<sup>18</sup>. Les projections dans le noyau ARC établissent des synapses avec les neurones POMC, afin d'inhiber leur activité *via* la libération de neurotransmetteur GABA<sup>18</sup>, tandis que celle des neurones du PVN exprimant MC4R et Sim1 (*single-minded 1 transcription factor*) sont elles aussi fortement inhibées par les neurones AgRP<sup>18</sup>. L'absence d'activité de ces neurones MC4R+ et Sim1+ est transmise à des structures internes (VIPAG/DR (*ventrolateral periaqueductal gray / dorsal raphe nucleus*) et PBN (*parabrachial nucleus*)), ce qui traduit un apport alimentaire pauvre et engendre une augmentation de l'appétit et de la prise alimentaire chez les animaux (*Figure 2 : Schéma récapitulatif illustrant les circuits neuronaux AgRP*).



*Figure 2 : Schéma récapitulatif illustrant les circuits neuronaux AgRP*

L'activation, par la ghréline, des projections inhibitrices des neurones AgRP est suffisante pour favoriser la prise alimentaire. En effet, certaines projettent dans le BNST, la LH et dans une moindre mesure dans le PVT. D'autres projettent dans les noyaux ARC, pour inhiber l'activité



des neurones POMC. Tandis que celles projetant dans le PVH, inhibent l'activité des neurones exprimant Sim1 et Mc4r, induisant une activation des neurones TRH du PVH stimulant ainsi d'autant plus l'activité des neurones AgRP de l'ARC. Or, lorsque les neurones AgRP sont inhibés par des signaux circulants, tels que la leptine, l'insuline et le glucose, cela stimule l'activité des neurones POMC et des neurones Sim1/Mc4r (projetant dans les régions VIPAG/DR et le PBN), afin d'inhiber la prise alimentaire. Figure issue de la revue de Sternson & Eiselt. de 2016<sup>18</sup>.

AgRP (*agouti-related protein*), ARC (*arcuate nucleus*), BNST (*bed nucleus of the stria terminalis*), DR (*dorsal raphe nucleus*), LH (*lateral hypothalamus*), Mc4r (*melanocortin receptor 4*), PBN (*parabrachial nucleus*), POMC (*pro-opiomelanocortin*), PVH (*paraventricular hypothalamic nucleus*), PVT (*paraventricular thalamus*), Sim1 (*single-minded 1 transcription factor*), TRH (*thyrotropin-releasing hormone*), vIPAG (*ventrolateral periaqueductal gray*).

Les neurones AgRP sont activés directement à la fois de manière synaptique et par des molécules circulantes. En effet, les neurones thyroïdiques du PVN contribuent à augmenter la prise alimentaire en stimulant l'activité des neurones AgRP de l'ARC<sup>18,30</sup>. Parallèlement, la détection par les neurones AgRP d'un taux élevé de ghréline circulante associée à des taux de leptine, glucose et insuline faibles aboutit aussi à leur stimulation<sup>31</sup>. Une fois activés, les neurones AgRP sécrètent conjointement le GABA et des neuromodulateurs, AgRP et NPY. Ces derniers stimulent la prise alimentaire lorsqu'ils sont injectés indépendamment dans le cerveau<sup>32,33</sup>. Cependant, l'importance de la réponse comportementale induite est modulée par le niveau d'engagement des neurones AgRP. En effet, des expériences d'optogénétique montrent qu'un comportement alimentaire vorace survient quelques minutes après une stimulation neuronale aiguë engendrant la co-sécrétion du NPY et du GABA uniquement<sup>18,34,35</sup>. La sécrétion d'AgRP sert quant à elle à stimuler l'appétit et à motiver la recherche de nourriture au goût moins appétant, pendant plusieurs heures en cas de déficit énergétique<sup>34</sup>. Une fois que les animaux ont accès à la nourriture, ces activités neuronales sont immédiatement réduites<sup>34</sup>.

## **2.2. Conséquences de la neuroinflammation induite par l'obésité sur la régulation hypothalamique de l'homéostasie énergétique**

Dans ce contexte d'obésité, le fonctionnement hypothalamique est fortement altéré. Il est observé une inflammation survenant dès les premiers jours de consommation de régime enrichi en lipides (HF), avant même une prise de poids significative<sup>36,37</sup>. De plus, cette inflammation se maintient sur le long terme et est généralement associée à une résistance

hormonale ainsi qu'à une prise de poids<sup>37</sup>. Ces résultats obtenus à partir de modèle animaux (des rongeurs, des primates) sont reproductibles et transposables à l'humain<sup>3</sup>.

La première étude relatant le lien entre inflammation hypothalamique et obésité a été réalisée chez des rats rendus obèses par la consommation durant 16 semaines d'un régime HF (45% de l'énergie apportée par le régime provient des lipides)<sup>38</sup>. Dans l'hypothalamus médio-basal de ces rats, les voies pro-inflammatoires étaient fortement activées. Les résultats d'expérience de *macroarray analysis* montrent que les expressions de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) and Ikk $\beta$ /NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)<sup>39</sup> sont alors augmentées, par rapport aux animaux contrôles. Ce résultat apparaît de plus corrélé à l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*), IL-1 $\beta$  (*interleukine-1 $\beta$* ) et IL-6 (*interleukin-6*)) et à une résistance hormonale (à l'insuline et à la leptine) chez les animaux obèses. En effet l'injection intracérébroventriculaire d'un inhibiteur de JNK chez les rats obèses restaurait la signalisation de l'insuline, en limitant la phosphorylation inhibitrice sur sérine d'IRS2 (*insulin receptor substrate 2*) et d'IR (*insulin receptor*). Cela conduisait à une réduction de la prise alimentaire et du poids corporel<sup>38</sup>. De plus, la suppression spécifique d'Ikk $\beta$  dans l'hypothalamus médio-basal et spécifiquement dans les neurones AgRP (souris AgRP/Ikk $\beta^{\text{lox/lox}}$ ), de souris nourries pendant trois semaines avec un régime HF, protégeait contre l'obésité, l'intolérance au glucose et la résistance à la leptine et à l'insuline. En effet, la surnutrition chronique génère dans les neurones hypothalamique un stress élevé du réticulum endoplasmique dû à l'accumulation ectopique d'acides gras. Le stress engendré favorise alors l'activation de la voie Ikk $\beta$ /NF- $\kappa$ B<sup>39</sup>. Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires ainsi que celle d'un régulateur négatif de la voie de l'insuline et de la leptine, SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*). Ce dernier, par encombrement stérique empêche alors le recrutement et l'activation des intermédiaires de signalisation de ces hormones. Les neurones orexigènes AgRP ne sont donc plus inhibés ni par l'insuline ni par la leptine, ce qui engendre une hyperphagie perturbant l'homéostasie énergétique et prédisposant au DT2 et à l'obésité.

Parallèlement, la consommation prolongée du régime HF entraîne une altération et l'apoptose des neurones POMC de l'ARC<sup>37</sup>. En effet, après 8 mois d'un tel régime, la quantification des cellules immunopositives POMC de souris révélait une réduction de 25% du nombre de neurones POMC par rapport aux souris témoins. Cette réduction pourrait s'expliquer par

l'augmentation de l'autophagie et des altérations mitochondriales dans ces neurones du fait de la surexposition lipidique. En effet, il a été constaté qu'après 20 semaines de régime HF, les souris possédaient 10 fois plus de neurones POMC présentant des autophagosomes. L'augmentation de ce marqueur d'autophagie est observée dans 81,2% de cette population neuronale contre 6,4% chez les souris témoins. De plus, chez des rats nourris avec un régime HF des mitochondries très hétérogènes ont été observées, avec un lumen peu dense aux électrons et des crêtes non parallèles discontinues pour la majorité. Or chez les rats contrôles, les mitochondries étaient homogènes, avec un lumen compact dense aux électrons et des crêtes parallèles bien organisées. La surexposition lipidique hypothalamique est donc néfaste pour les neurones anorexigènes POMC.

Ces études montrent une altération importante de la morphologie, de l'organisation et du fonctionnement des neurones AgRP et POMC de l'ARC à la suite de la surconsommation de lipides. Le circuit orexigène ne répond plus aux inhibitions hormonales tandis que le circuit anorexigène devient, lui, dysfonctionnel. L'homéostasie énergétique en est perturbée et il en résulte une hyperphagie favorisant une prise de poids. De plus, ces populations neuronales sont sensibles aux cytokines pro-inflammatoires et participent à l'entretien de la neuroinflammation hypothalamique chez les animaux rendus obèses par leur régime alimentaire. Or, l'inflammation hypothalamique n'est pas la seule à contribuer à l'obésité induite par un régime riche en lipide. La gliose réactionnelle joue elle aussi un rôle déterminant.

### **3. La gliose réactionnelle**

Dans cette partie, j'exposerai l'importance des cellules gliales dans la gliose réactionnelle, un processus participant activement à l'inflammation hypothalamique chronique en situation obésogène. Après avoir présenté les astrocytes et les cellules microgliales, j'expliquerai leurs implications dans la gliose réactionnelle.

#### **3.1. Les astrocytes et les cellules microgliales**

La glie a été décrite comme étant une population non neuronale pour la première fois en 1856 par Rudolf Virchow. Ensuite, Pio del Rio Hortega a distingué en 1919 les astrocytes, les cellules microgliales et les oligodendrocytes, qui ensemble représentent environ 90% des cellules du SNC. Ces trois types de cellules gliales sont capables de se diviser. On les retrouve dans l'ensemble des structures cérébrales et à proximité des capillaires sanguins. Ces cellules

maintiennent un microenvironnement cérébrale sain et soutiennent la communication entre le système central et périphérique<sup>40,41</sup>.

Les astrocytes, d'origine neuroectodermique, sont les cellules les plus abondantes du SNC, représentant 50% du volume cérébral et jusqu'à 70% de la névroglie<sup>1,41</sup>. Leurs extensions cytoplasmiques leur confèrent une forme étoilée et leur permettent d'aller au contact de divers types cellulaires. Via ces prolongements, ils possèdent des morphologies diverses et assurent des fonctions extrêmement variées<sup>42</sup> (*Figure 3 : Différents stades d'activation des cellules microgliales et des astrocytes*). Par exemple, les astrocytes périvasculaires de l'ARC émettent des prolongements autour des capillaires sanguins<sup>1,41,43</sup>. Ils participent ainsi à la BHE (cf. : III.2), en limitant l'exposition du microenvironnement neuronal aux molécules circulantes (des hormones, des nutriments ou des cytokines). Ces extensions astrocytaires entourent aussi les synapses afin de concentrer ou non la libération de neurotransmetteur pour moduler la transmission synaptique<sup>43,44</sup> (*Figure 4 : Rôle des astrocytes dans la transmission synaptique*). Par ailleurs, les astrocytes approvisionnent les neurones en convertissant le glucose en lactate et les lipides en corps cétoniques *via* des transporteurs de monocarboxylate<sup>41</sup>. De plus, au niveau neuronal, des études montrent qu'ils soutiennent la prolifération et la différenciation<sup>44</sup>. Ils participent également à l'homéostasie ionique et hydrique en contribuant au drainage du liquide interstitiel parenchymateux vers le liquide céphalo-rachidien<sup>43</sup>. Finalement, la population astrocytaire est très hétérogène et forme un réseau communiquant, leur permettant d'interagir non seulement avec les neurones mais aussi avec les microglies<sup>1,41,43</sup>. En effet, les astrocytes expriment constitutivement des TLR (*toll-like receptors*) et d'autres PRR (*pattern-recognition receptors*) leur permettant d'assister la microglie lors de perturbations de l'homéostasie cérébrale<sup>1</sup>.

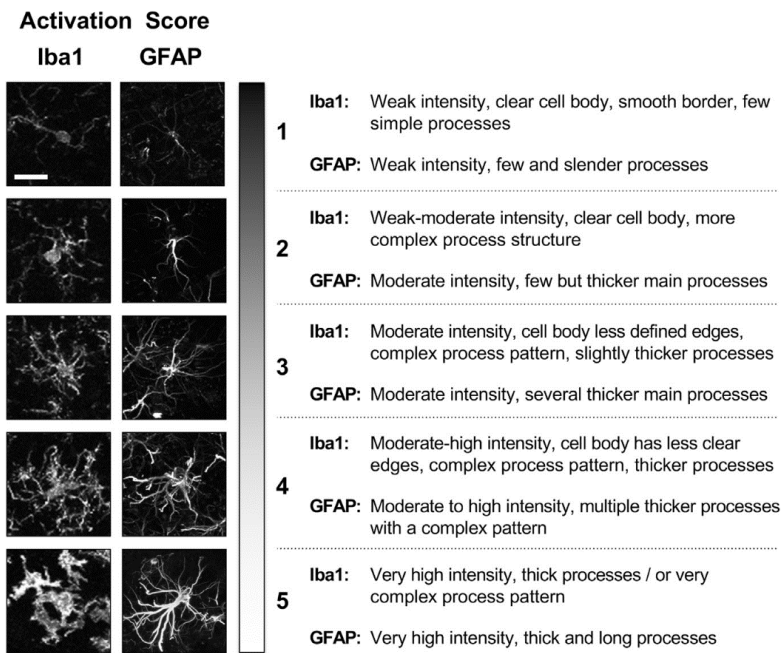


Figure 3 : Différents stades d'activation des cellules microgliales et des astrocytes.

Les cellules microgliales sont révélées avec le marqueur IBA1, tandis que les astrocytes le sont avec GFAP. L'activation de ces types cellulaires est déterminée par des scores, cinq au total. Le numéro 1 étant le moins activé. Pour les cellules microgliales, les scores d'activation sont déterminés en fonction de l'intensité de fluorescence du marquage IBA1, l'intensité de fluorescence du corps cellulaire, la définition du pourtour du corps cellulaire ainsi que par la complexité (nombre de ramification) et

l'épaisseur des processus filamenteux. Pour les astrocytes, les scores d'activation sont définis par l'intensité de fluorescence du marquage GFAP, ainsi que par l'épaisseur, la complexité et la longueur des filaments. Figure issue de l'étude de Harrison & al. de 2019<sup>42</sup>.

IBA1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*)

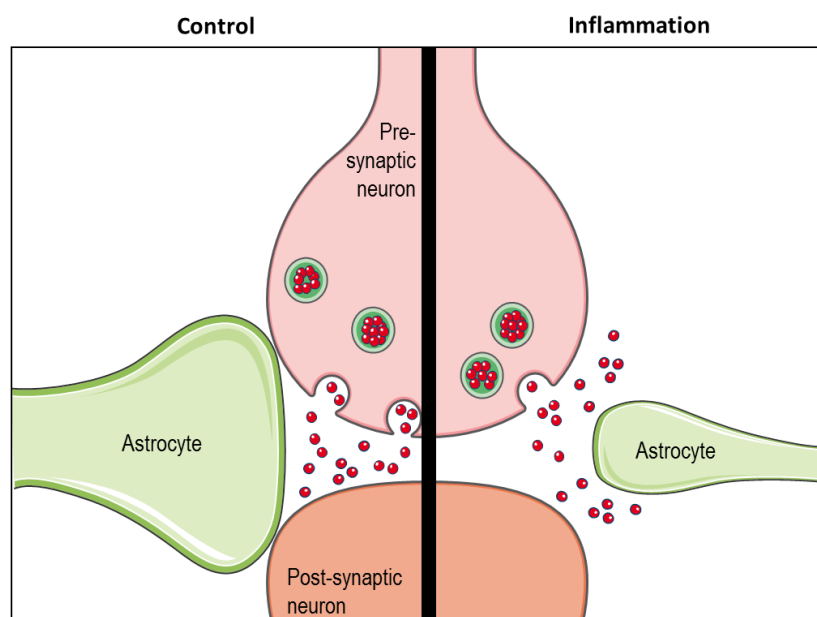


Figure 4 : Rôle des astrocytes dans la transmission synaptique.

Les astrocytes optimisent les transmissions synaptiques, grâce à leurs processus (vert) qui entourent les synapses pour concentrer la libération de neurotransmetteurs (rouge). En situation inflammatoire, la communication synaptique est moins efficace, car les pieds astrocytaires se rétractent, entraînant ainsi la diffusion des neurotransmetteurs dans le parenchyme cérébral. Figure fortement inspirée de la publication de Poskanzer & Molofsky. de 2018<sup>43</sup>.

Les cellules microgliales, représentant 10% des cellules gliales, sont des macrophages résidents du SNC<sup>1</sup>. Au début du développement embryonnaire, une population de macrophages primitifs du sac vitellin (E 8,5 : 8,5<sup>ème</sup> jour embryonnaire) colonise précocement le neuroépithélium, pour achever sa différenciation dans le SNC (E13)<sup>45</sup>. Le développement microglial nécessite la signalisation CSF-1 (récepteur fonctionnel et la protéine adaptatrice DAP12), IL-34 (*interleukin-34*) et IRF8 (*interferon regulatory factor 8*). Si une carence de l'un de ces facteurs survient, alors la densité microgliale est significativement réduite chez les animaux carencés par rapport aux animaux contrôles<sup>42,45,46</sup>. Différenciées, ces cellules ont un phénotype hautement ramifié avec un petit corps cellulaires circulaire et constituent une lignée indépendante des cellules hématopoïétiques. Elles ont la faculté de se régénérer afin de maintenir leur population constante<sup>47</sup>. Ces cellules étoilées sont capables de répondre à des demandes ponctuelles détectées par tous les types de récepteurs PRR (TLR, RAGE, LFA-1, MAC-1) qu'elles expriment à leur membrane plasmique<sup>1</sup>. De plus, leurs extensions cytoplasmiques sont en mouvement constant afin de sonder, de détecter et d'adapter rapidement l'activité microgliale à l'environnement<sup>47</sup>. Elles sont donc amenées à contacter des neurones, des astrocytes ainsi que des vaisseaux sanguins. Par conséquent, cette diversité d'interactions implique l'expression adaptée de récepteurs aux neurotransmetteurs variés (GABA, dopamine, vasopressine, sérotonine ...), la libération de MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), mais aussi du récepteur TLR4 qui n'est pas ubiquitaire dans la population microgliale<sup>45</sup>.

### **3.2. La gliose réactionnelle associée à un régime enrichi en lipide**

Les astrocytes et les microglies sont hautement réactifs aux signaux qui pourraient nuire à l'homéostasie cérébrale (les infections, la surexposition lipidique, la libération de toxines par un tissu lésé). En effet, des études ont mis en évidence que les astrocytes et microglies hypothalamiques détectent directement, *via* les PRR, les acides gras libres dont les concentrations sont fortement augmentées en situation d'obésité<sup>43,48</sup>. Lorsqu'ils en détectent, ils adoptent un phénotype hypertrophique dit activé et prolifèrent, indépendamment d'une prise de poids corporel<sup>36</sup>. Cette réaction gliale de défense est qualifiée de gliose réactionnelle et génère une réponse inflammatoire centrale.

Lors d'une surexposition lipidique (cultures primaires d'astrocytes traitées pendant 48h avec 200µm palmitate), les astrocytes hypothalamiques accumulent en leur sein des gouttelettes lipidiques. Ces cellules, gorgées de lipides, changent de morphologie et expriment davantage

des marqueurs d'activation (GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), vimentine) et des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1)<sup>49,50</sup>. De plus, les astrocytes hypothalamiques sécrètent alors des facteurs pro-inflammatoires et des chimiokines, afin d'activer et de recruter les microglies et potentiellement des cellules immunitaires périphériques. Ces dernières peuvent pénétrer dans le parenchyme cérébral, car la BHE est souvent altérée au cours de l'obésité<sup>49</sup>. Dans ces circonstances mimant un milieu obésogène, les astrocytes sont dits « activés » et participent à l'inflammation hypothalamique. On parle alors d'astroglie. L'induction de ce phénomène survient généralement après un apport alimentaire enrichi en lipides *in vivo* ou à la suite d'une surexposition au palmitate *in vitro*<sup>3,36,37,41</sup>. L'astroglie se caractérise par une sécrétion accrue, par les astrocytes, de cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) néfastes pour le fonctionnement neuronal et le leur<sup>1,41</sup>. Une autre caractéristique est que les astrocytes prolifèrent et deviennent hypertrophiques, notamment au niveau des extrémités de leurs filaments situés autour des capillaires sanguins<sup>51</sup>. Cela altère l'accès des métabolites circulants, telles que la leptine, qui ne peut plus agir sur les neurones. De plus, les astrocytes exposés à de fortes concentrations lipidiques alimentent d'avantage les neurones en corps cétoniques qu'en lactate, ce qui est néfaste à leur fonctionnement<sup>41</sup>. Bien qu'ils contribuent activement au phénomène pro-inflammatoire lorsqu'ils sont activés, les astrocytes sécrètent parallèlement des cytokines anti-inflammatoires (IL-4 (*interleukin-4*), IL-10 (*interleukin-10*), IFN- $\beta$  (*interferon beta*) et TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*)) afin de rendre transitoire cette réponse<sup>1</sup>. Par ailleurs, ils favorisent la survie neuronale ainsi que la prolifération des cellules souches neuronales en rétablissant un environnement cérébral sain<sup>1,52</sup>. Bien que cet environnement soit amélioré par les astrocytes à travers le remodelage de la matrice extracellulaire, la restauration de la BHE et la sécrétion de facteurs neurotrophiques (BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) et FGF (*fibroblast growth factors*)) des séquelles perdurent, notamment la « cicatrice gliale », résultant de l'accumulation d'astrocytes disposés autour du site lésé afin de contenir la propagation de l'inflammation. En effet, cette accumulation entrave le recrutement des cellules souches neuronales et constitue un frein à la repousse axonale ainsi qu'au rétablissement des fonctions nerveuses altérées<sup>52</sup>.

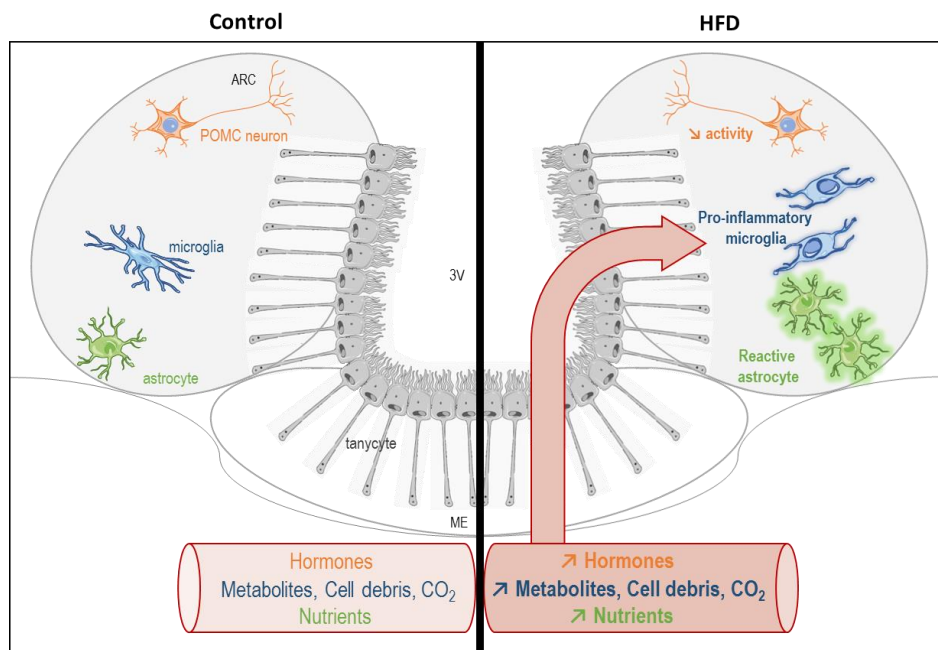
Outre l'astroglie, la gliose réactionnelle implique également les cellules microgliales. Le processus d'activation microgliale, appelé microglie, a été décrit initialement par le groupe de Georg Kreutzberg dans l'étude de la réponse résultante dans le noyau facial après la lésion

du nerf correspondant<sup>45</sup>. Ce processus est déclenché, comme l'astroglie, par toute modification de l'homéostasie cérébrale par des facteurs de stress ou pathologiques. Une fois activée, la microglie présente dans l'environnement perturbé sécrète des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) et des chimiokines (CXCL1 (*chemokine C-X-C motif ligand 1*), CCL2 (*chemokine C-C motif ligand 2*)) afin de recruter d'autres microglies et astrocytes. L'activation engendre donc une réponse inflammatoire vouée à être transitoire<sup>1,45</sup>. Par exemple, il est montré que le régime HF induisant une obésité stimule l'inflammation dans le SNC<sup>3,37</sup>, notamment à cause de l'accumulation d'acides gras saturés dans l'hypothalamus lorsque ceux-ci sont consommés en excès<sup>48</sup>. En effet, chez des rongeurs, après seulement 24h de régime HF (60%), la gliose réactionnelle hypothalamique est observée en réponse à des lésions neuronales<sup>37,48</sup>. Quelques jours après, elle est associée à une inflammation de bas grade pouvant modifier l'activité des neurones POMC et NPY<sup>3,53</sup>. L'étude de Valdearcos & al de 2014<sup>48</sup> confirme la présence d'un stress neuronal, perturbant l'activité de ces neurones régulant la prise alimentaire. De plus, l'étude montre que ce sont les microglies qui génèrent ce stress et ce proportionnellement à l'exposition aux acides gras saturés. Cela réduit alors la sensibilité à la leptine de ces populations neuronales et augmente la prise alimentaire des animaux. Ainsi, grâce à cette étude, les cellules microgliales ont été identifiées comme des senseurs spécifiques d'acides gras saturés. Elles les détectent directement pour ensuite orchestrer une réponse inflammatoire hypothalamique en augmentant son intensité à la suite d'apport important en graisses saturées. Ces résultats sont obtenus à partir de l'étude *ex vivo* de l'épuisement de la microglie dans le MBH de souris. Cet épuisement a pour conséquence d'abolir l'inflammation, le stress neuronal induits par les acides gras saturés, de restaurer la sensibilité neuronale à la leptine et de diminuer la prise alimentaire.

Au cours du développement et à l'âge adulte, les cellules microgliales éliminent par phagocytose les cellules en apoptose et les débris cellulaires, notamment les connexions synaptiques, afin d'optimiser le réseau neuronal et la plasticité cérébrale<sup>54</sup>. Dans le même objectif, elles stimulent conjointement la survie et la prolifération des cellules précurseurs neuronales<sup>45</sup>. Lorsqu'elles sont activées, les microglies changent leur profil d'expression et leur morphologie. Elles peuvent adopter différents « stades d'activation » transitoires et réversibles en fonction de l'environnement auquel elles sont exposées. Alors que cette activation avait longtemps été considérée comme binaire (stades M1/M2), elle est désormais considérée



comme progressive ; dans des cas chroniques, elle aboutit à la forme dite amiboïde<sup>42,45,55,56</sup>. Cette forme pro-inflammatoire hautement activée est caractérisée par un corps cellulaire large et déformé, avec des petits prolongements épais avec peu de ramifications. Cette forme avec très peu de prolongements facilite leur déplacement et leur division (*Figure 3 : Différents stades d'activation des cellules microgliales et des astrocytes*). De plus, les microglies concernées sécrètent davantage de facteurs pro-inflammatoires, permettant de recruter d'autres microglies et d'amplifier cette réponse : des cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ), des chimiokines (CXCL1, CCL2) et d'iNOS (*inducible nitric oxide synthase*)<sup>1,41</sup>. Ces effets sont observés très rapidement après quelques jours de régime HF, et ils sont maintenus sur de longues périodes si l'apport en acide gras reste important<sup>36,37</sup>. Lorsqu'elles se trouvent sous forme amiboïde, la capacité de phagocytose des microglies est décuplée (avec une augmentation du marqueur phagocytaire CD68 (*cluster of differentiation 68*)) et peut engendrer des lésions de la BHE. Ainsi, les microglies permettent aux cellules immunitaires périphériques (tels que les lymphocytes et les monocytes) d'entrer dans le SNC et facilitent leur migration dans le parenchyme *via* la sécrétion de MMP (*matrix metalloproteinases*) dégradant la matrice extracellulaire<sup>41,57</sup>. Donc, lorsque leur activation perdure, cela engendre une inflammation de bas grade, des perturbations de l'homéostasie énergétique et des dommages irréversibles du SNC (*Figure 5 : Induction de la gliose réactionnelle hypothalamique en situation d'obésité*). En revanche, la gliose réactionnelle est corrigée à la suite d'un changement alimentaire drastique (régime HF 60% kcal provenant des lipides à un régime Chow 12%), ce qui participe à l'amélioration des paramètres physiologiques des animaux<sup>58</sup>.



*Figure 5 : Induction de la gliose réactionnelle hypothalamique en situation d'obésité*

En situation physiologique, dans le l'hypothalamus médio-basal, les neurones POMC anorexigènes ont leur activité modulée par les signaux hormonaux (les taux circulants de leptine, d'insuline, d'adiponectine, de ghréline et de PYY), tandis que les astrocytes sont sensibles aux niveaux circulants de nutriments (glucose, acides gras, protéines, O<sub>2</sub>) et les microglies à ceux de métabolites, des débris cellulaires et de CO<sub>2</sub>. Or, en situation d'obésité induite par la surexposition à un régime HF (souris obèse DIO), une hypervascularisation de l'hypothalamus médio-basal associée à une perturbation de la BHE sont constatées, augmentant ainsi l'apport en hormones, nutriments et métabolites. De plus, ce qui induit une diminution de l'action anorexigène des neurones POMC et une gliose réactionnelle, caractérisée par des astrocytes dits réactifs et une microglie activée dite pro-inflammatoire. Figure fortement inspirée de celle de la revue de Jastroch & al. de 2014<sup>41</sup>.

PYY (*peptide tyrosine tyrosine*), POMC (*pro-opiomelanocortin*)

Par ailleurs, les effets néfastes de la gliose réactionnelle sont tempérés par les propriétés immunosuppressives du milieu. Par exemple, dans des modèles d'activation légers, les microglies jouent un rôle neuroprotecteur et anti-inflammatoire<sup>1</sup>. Elles entourent les corps neuronaux et remanient le réseau synaptique, tout en supprimant la neuroinflammation à laquelle elles ont participé *via* la sécrétion des facteurs anti-inflammatoires IL-10, IL-4, TGF- $\beta$ , IFN- $\beta$ <sup>41,59</sup>. Les microglies participent également à cette inhibition en diminuant la production de NO (*nitric oxide*) par le détournement de l'arginine. Parallèlement, elles favorisent la sécrétion de facteurs neurotrophiques (BDNF), l'inhibition des MMPs ainsi qu'en induisant

l'apoptose des cellules immunitaires périphériques infiltrées. Ainsi, dans un état de faible activation, la microglie favorise la réparation des lésions tissulaires et le rétablissement de l'homéostasie cérébrale et énergétique.

Tous ces travaux ont grandement amélioré la compréhension des processus inflammatoires hypothalamiques survenant en situation d'obésité. Pour autant, des zones d'ombres subsistent et nécessitent d'être éclaircies. Par exemple, la meilleure compréhension du rôle des tanocytes hypothalamiques, des cellules gliales bordant le 3V, a permis d'améliorer les connaissances sur les résistances hormonales hypothalamiques observées en situation d'obésité.

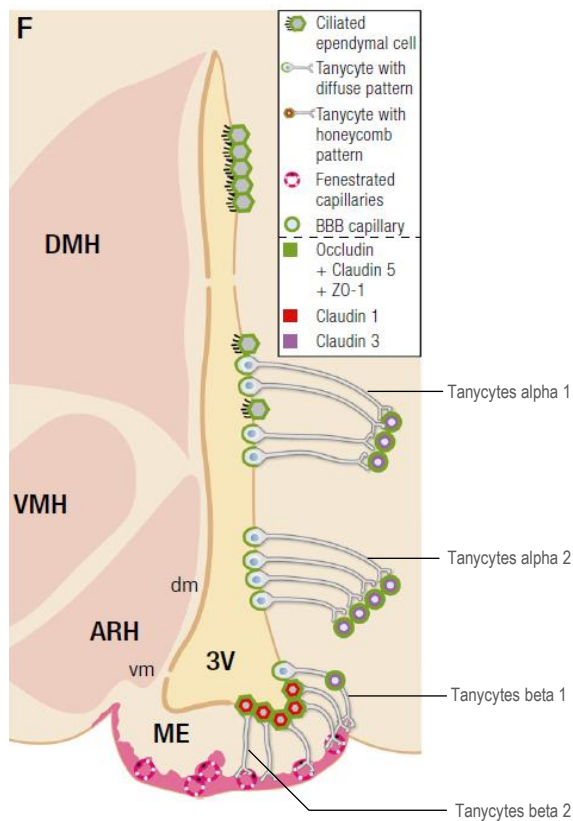
#### **4. Les tanocytes, des intermédiaires indispensables entre la périphérie et l'hypothalamus**

Le 3V, dans sa partie dorsale, est bordé par les cellules épendymaires cubiques ciliées, tandis que sa partie ventrale est bordée par des tanocytes<sup>11,13</sup>. Décrit pour la première fois en 1954 par Ernst Horstmann, les tanocytes sont des cellules épendymogliales bipolaires allongées ; si elles sont qualifiées de bipolaires, c'est du fait de leur profil d'expression des protéines de jonction serrée. De plus, elles possèdent deux extrémités en contact avec des éléments différents. L'extrémité apicale du corps cellulaire des tanocytes est au contact du LCR, tandis que la partie distale de leur prolongement, appelée pied tanocytaire, rentre en contact avec des neurones ou le réseau vasculaire. Le plancher du 3V est donc bordé par le corps cellulaire allongé des tanocytes, dont la région apicale est recouverte de microvillosités, afin d'accroître les surfaces d'échanges avec le LCR. Le prolongement émit, quant à lui, projette dans des structures hypothalamiques plus internes, afin d'aller au contact de capillaires sanguins ou de populations neuronales spécifiques.

Les tanocytes appartiennent aux cellules gliales, car elles expriment des protéines caractéristiques de ce type de cellule, telles que la GFAP<sup>60</sup> ou la vimentine<sup>61</sup>. De plus, elles possèdent des activités de cellules souches neurales et sont notamment capables de se diviser à l'âge adulte<sup>62</sup>. Cependant, ce sont des cellules gliales particulières du fait de leur différenciation tardive au cours du développement, de leur localisation, de leur fonction et de leur profil protéique spécifique.

La population tanocytaire est hétérogène. On distingue les  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$  en fonction de leur localisation dorso-ventrale le long du 3V, des projections hypothalamiques réalisées et des

données histochimiques. Je donne ici une description succincte des familles de tanycytes des plus dorsales aux plus ventrales (*Figure 6 : Schéma de l'organisation des tanycytes et des épendymocytes ainsi que de leur profil d'expression des protéines de jonction, dans la région tubérale de l'hypothalamus*).



*Figure 6 : Schéma de l'organisation des tanycytes et des épendymocytes ainsi que de leur profil d'expression des protéines de jonction, dans la région tubérale de l'hypothalamus.*

Le 3V, dans sa partie dorsale, est bordé par les épendymocytes cubiques ciliés, tandis que sa partie ventrale est bordée par les tanycytes, classés en quatre sous familles ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ). Les capillaires de la BHE sont contactés par les tanycytes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  et  $\beta 1$ , tandis que les capillaires fenêtrés sont au contact des tanycytes  $\beta 2$  qui sont les seuls à exprimer la claudine 1 au niveau de leur corps cellulaire. Figure issue de la revue de Prevot & al. de 2018<sup>11</sup>.

3V (*third ventricle*), dm (*dorsomedial*), vm (*ventromedial*), DMH (*dorsomedial nucleus*), VMH (*ventromedial nucleus*), ARH (*arcuate nucleus*), ME (*median eminence*), BBB (*blood-brain barrier*), ZO-1 (*zonula occludens 1*)

Premièrement, les  $\alpha 1$ . Ces cellules biciliées tapissent la paroi latérale du 3V au niveau du VMH et d'une partie du DMH. A eux seuls, les  $\alpha 1$  ne sont pas capables d'assurer une barrière du fait de l'expression éparse des protéines de jonction (ZO-1 (*zonula occludens 1*), occludine et claudine 5) à l'apex de leur corps cellulaire<sup>63</sup>. Par conséquent, dans cette région, ils sont mélangés aux épendymocytes cuboïdes multiciliés munis de jonctions serrées organisées (ZO-1, occludine, claudine 5), ce qui permet de limiter la diffusion de métabolites du LCR vers les structures hypothalamiques (VMH, DMH)<sup>13</sup>. Les prolongements émis par les  $\alpha 1$  sont projetés dans le DMH selon une trajectoire latérale et dans le VMH selon une trajectoire dorsolatérale. Au contact des vaisseaux sanguins de la BHE, les pieds tanycytaires expriment les protéines de

jonction ZO-1, occludine, claudine 5 et claudine 3. Ces prolongements entourent un ou plusieurs vaisseaux sanguins de la BHE et finissent dans le parenchyme hypothalamique.

Deuxièmement, les  $\alpha 2$ . Ces cellules sont également biciliées et se situent en face de l'ARC<sup>63</sup>. Les  $\alpha 2$  envoient leurs prolongements dans ce même noyau selon une trajectoire latéro-ventrale et vers le sillon tubéroinfundibulaire. Leur pied tancytaire se termine par une ou plusieurs dilatations qui contactent un ou plusieurs capillaires sanguins de la BHE de l'hypothalamus médio-basal ou des neurones NPY/AgRP de l'ARC<sup>64</sup>. Ils possèdent les mêmes profils d'expression des protéines de jonction au niveau de leur corps cellulaire ou de leur pied tancytaires que les  $\alpha 1$ . Cependant, comme ils ne sont pas mélangés avec les cellules épendymaires cuboïdes multiciliées, les tancytes  $\alpha 2$  n'assurent pas une barrière physique efficace contre la diffusion paracellulaire des métabolites du LCR dans l'ARC<sup>11</sup>.

Troisièmement, les  $\beta 1$ . Ce type de tancyte unicillié borde le 3V entre l'ARC et l'EM<sup>63</sup>. Les  $\beta 1$  expriment les mêmes protéines de jonction que les alphas, excepté au niveau de leur pied, qui est en contact avec les vaisseaux fenêtrés<sup>13</sup>. La projection de leur prolongement se fait selon une trajectoire courbe latéro-ventrale dans la région externe latérale de l'EM. Ainsi, certains prolongements entrent d'abord au contact des capillaires de la BHE puis des vaisseaux fenêtrés du système porte. D'autres arrivent directement à proximité des vaisseaux fenêtrés ; ce sont les seuls  $\beta 1$  à exprimer la claudine 1. De plus, les  $\beta 1$  exprimant la claudine 1 possèdent une certaine plasticité structurelle en cas de jeun. En effet, au niveau de leurs corps cellulaires, comme les  $\beta 2$ , les  $\beta 1$  créent une ceinture de jonction. Cela permet d'empêcher l'afflux de molécules circulantes dans le LCR à la suite de l'augmentation de la fenestration des vaisseaux (pas dans ceux de la BHE).

Enfin, les  $\beta 2$  unicilliés recouvrent quant à eux le plancher du 3V<sup>63</sup>. Ils envoient leur prolongement, de manière rectiligne, pour rejoindre les capillaires fenêtrés du système porte pituitaire situés dans la zone vasculaire de l'EM. De plus, les corps cellulaires des tancytes  $\beta 2$  sont ceinturés par des complexes de jonctions serrées (ZO-1, occludines, claudine 5 et 1) afin de créer une barrière étanche<sup>13</sup>. Ainsi ils empêchent la diffusion de molécules circulantes extravasées des capillaires fenêtrés vers le reste du cerveau *via* le LCR. Ils forment donc une barrière sang-LCR en apposant directement leurs pieds à la zone péricapillaire des vaisseaux fenêtrés<sup>65</sup>.

Ces dernières années, cette classification  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$  a été remise en question. Afin de mieux caractériser les différents types de tanocytes existants, des chercheurs ont avancé des propositions de classification fonctionnelle fondées sur les profils d'expression des marqueurs protéiques, la nature des vaisseaux contactés (BHE ou fenestrés) mais aussi sur la nature des neurones avec qui les prolongements tanocytaires sont associés<sup>11</sup> (*Tableau 1 : Suggestion d'une nouvelle classification fonctionnelle des tanocytes par Prevot & al 2018*). Néanmoins, dans cette étude réalisée pendant ma thèse, je conserverais la classification  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$ , car le marqueur immunohistochimique utilisé (vimentine) ne me permet pas de déterminer le type précis des tanocytes observés.

Classification		Characteristics				
New	Old	Shh Expression During Development	Number of Cilia	Nature of the Contacted Blood Vessels	Markers	Nature of the Associated Neuroendocrine Axons
ME tanocytes	$\beta 2$	No	Unciliated	Fenestrated vessel, endfeet brushlike	DARPP-32, vimentin, GPR50, Claudin-1, GLAST GLUT1(+/-)	TRH, CRH, SOM, GHRH, TIDA
vmARH tanocytes	$\beta 1$	Yes	Unciliated	Fenestrated vessel, endfeet brushlike, medially located  BBB vessels (proximal part of their processes) and fenestrated vessels (distal part of their processes), endfeet clublike, laterally located	SPRR1A, DARPP-32, vimentin, GPR50, Claudin-1, GLAST, GLUT1(+)  SPRR1A (?) DARPP-32, vimentin, GPR50, GLUT1(+)	GnRH, TIDA
dmARH tanocytes	$\alpha 2$	Yes	Biciliated	BBB vessels	DARPP-32, Vimentin, GPR50, Connexin-43, GFAP (+/-), GLT-1, GLUT1(+)	NA
VMH and DMH tanocytes	$\alpha 1$	Yes	Biciliated	BBB vessels	DARPP-32, GPR50, Vimentin, Connexin 43, GFAP (+/-), GLT-1, GLUT1(+)	NA

For details and references, please refer to sections, "Tanocytes and the Blood-CSF Barrier" and "A New Classification of Tanocytes?".

Includes data from references 31, 32, 40, 48, 115, 158, 167, 217, 240, 241, 276, 279, 285, 287, 288, 395–400, 402.

Abbreviations: CRH, corticotropin-releasing hormone; GHRH, growth hormone-releasing hormone; GLT-1, glial glutamate transporter; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; SOM, somatostatin; SPRR1A, small proline-rich protein; TIDA, tuberoinfundibular dopaminergic axons.

### *Tableau 1 : Suggestion d'une nouvelle classification fonctionnelle des tanocytes par Prevot & al 2018.*

La classification fonctionnelle proposée vise à homogénéiser les sous populations tanocytaires. Les critères sur lesquels elle s'appuie sont les régions hypothalamiques dans lesquelles les tanocytes se trouvent, les régions où ils projettent, le type de vaisseau contacté (capillaires fenêtrés ou ceux de la BHE), les marqueurs moléculaires et la nature des réseaux neuronaux avec lesquels ils interagissent (endocrinien ou non). Cependant, les tanocytes peuvent présenter un degré supplémentaire de diversité en fonction des types cellulaires avec lesquels ils interagissent (les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules microgliales, les neurones) et de l'état physiologique de l'individu. Tableau issue de la revue Prevot & al. de 2018<sup>11</sup>.

ME (*median eminence*), vmARH (*ventro-medial arcuate nucleus*), dmARH (*dorso-medial arcuate nucleus*), VMH (*ventromedial hypothalamus*), DMH (*dorsomedial hypothalamus*), BBB (*blood-brain-barrier*), DARPP-32 (*dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa*), GPR50 (*G protein-coupled receptor 50*), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), GLT-1 (*glial glutamate transporter-1*), GLUT1 (*glucose transporter 1*), SPRR1A (*small proline rich protein 1A*), GLAST (*glutamate aspartate transporter 1*), TRH (*thyrotropin-releasing hormone*), CRH (*corticotropin-releasing hormone*), GHRH (*growth hormone-releasing hormone*), TIDA (*tuberoinfundibular dopaminergic*), GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*)

#### 4.1. Détection de métabolite (glucose)

L'impact du jeun a été étudié sur les différents types de tanocytes  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  et  $\beta 2$  décrits dans la partie précédente. En condition de jeun, le taux de glucose circulant est fortement abaissé, ce qui est détecté par les neurones « senseur de glucose » du noyau ARC. Les neurones orexigènes NPY/AgRP sont activés, alors que les neurones anorexigènes POMc/CART sont inhibés afin de favoriser la prise alimentaire (cf. : I.2.1.2). Or, ces neurones « senseur de glucose » s'appuient en partie sur les informations véhiculées par les tanocytes, eux-mêmes capables de détecter directement le taux de glucose dans le LCR. En effet, au niveau de leur corps cellulaire, les tanocytes expriment le transporteur de glucose GLUT2<sup>66</sup>, ainsi que la glucokinase GK<sup>67</sup> et les canaux potassiques ATP (*adenosine triphosphate*) dépendant<sup>68</sup>. Ce profil d'expression, similaire à celui des cellules  $\beta$ -pancréatiques, supporte l'hypothèse que les tanocytes sont directement capables de détecter le taux de glucose dans le LCR. En outre, comme la concentration de glucose dans le LCR est corrélée positivement à celle circulante, les tanocytes seraient donc capables de détecter le taux de glucose circulant.

Afin de transmettre ces informations aux neurones senseurs de glucose, deux mécanismes complémentaires sont proposés<sup>69</sup>. A partir de tranche de cerveau, le premier mécanisme implique tout d'abord le transporteur de glucose, des corps cellulaires, qui permet l'influx simultané du LCR de glucose et de Na<sup>+</sup>. L'accumulation de Na<sup>+</sup> induit une dépolarisation, inversant ainsi l'échangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. Par conséquent, le Na<sup>+</sup> sort et le Ca<sup>2+</sup> rentre, augmentant la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> qui, par un mécanisme inconnu à ce jour, libère de l'ATP. L'ATP libéré dans l'espace extracellulaire active alors les récepteurs purinergiques P2Y1 des tanocytes voisins, propageant ainsi une onde calcique intracellulaire par mobilisation des réserves. Le deuxième mécanisme conduit aussi à la libération d'ATP et à l'activation des récepteurs P2Y1. Cela suggère que le



glucose utilise des récepteurs sensibles au goût sucré, couplés aux protéines G (Tas1r2), afin de mobiliser directement les réserves de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (Figure 7 : Hypothèses du mécanisme de détection du glucose par les tanocytes hypothalamiques).

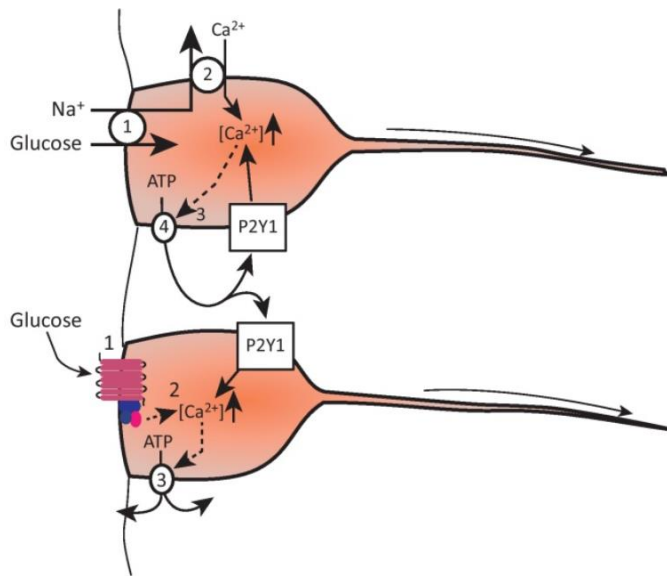


Figure 7 : Hypothèses du mécanisme de détection du glucose par les tanocytes hypothalamiques.

Dans le modèle supérieur, le glucose est co-transporté avec le  $\text{Na}^+$ , du LCR dans les tanocytes (1). Cela provoque l'accumulation intracellulaire de  $\text{Na}^+$ , induisant une dépolarisation qui inverse l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (2). Par conséquent, le  $\text{Na}^+$  sort et le  $\text{Ca}^{2+}$  rentre, augmentant la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire qui, par un mécanisme inconnu à ce jour (3), libère de l'ATP. L'ATP libéré dans l'espace extracellulaire active alors les récepteurs purinergiques P2Y1 des

tanocytes voisins, propageant ainsi une onde calcique intracellulaire par mobilisation des réserves (4). Le modèle inférieur est similaire excepté pour la première étape. En effet dans ce modèle, le glucose interagit avec des récepteurs couplés aux protéines G (1), afin de mobiliser directement le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire (2), ce qui conduit à nouveau à la libération d'ATP (3) et à l'activation des récepteurs P2Y1. Figure issue de la revue de Bolborea & Dale de 2013<sup>69</sup>.

$\text{Na}^+$  (ion sodium),  $\text{Ca}^{2+}$  (ion calcium),  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (concentration intracellulaire d'ion calcium), ATP (adenosine triphosphate), P2Y1 (purinergic receptor)

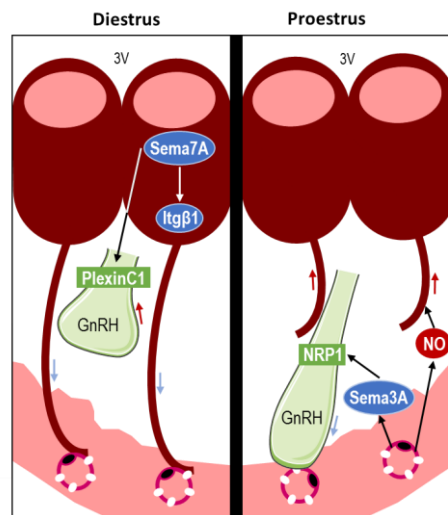
## 4.2. Transport et sécrétion de neuropeptides

Bien qu'il existe différents types de tanocyte, tous possèdent un noyau occupant quasiment la totalité du cytoplasme, un réticulum endoplasmique très développé, de nombreuses mitochondries et microtubules. De plus, la machinerie d'endocytose, composée de vésicules recouvertes de clathrines, d'endosomes précoces et tardifs et de lysosomes, est présente. Au vu de leur localisation ainsi que de leur composition, on peut supposer que ces cellules forment une interface de communication entre le LCR, l'hypothalamus et la circulation sanguine.

En effet, des études montrent que les tanocytes contrôlent de manière dynamique la sécrétion de neurohormones (GnRH, T4 (thyroxine)<sup>70</sup>) produites par les neurones hypothalamiques dans



le système vasculaire porte. Par exemple, dans l'EM de beaucoup d'espèces animales (rongeurs, primates et humains), les axones des neurones à GnRH sont enveloppés par les prolongements des tanocytes. Or cette proximité avec les tanocytes impacte la sécrétion de GnRH. En effet, lors du diestrus, les extrémités très développées des tanocytes enfouissent les axones, et génèrent une barrière de diffusion empêchant la libération de GnRH dans le système porte pituitaire<sup>71</sup>. A l'inverse, lors du proestrus, ces extrémités se rétractent et les axones génèrent des excroissances créant un contact neurohémal direct, leur permettant de sécréter la GnRH dans les vaisseaux portes pituitaires<sup>16</sup>. La GnRH va alors pouvoir induire la synthèse et la sécrétion de FSH (*follicle-stimulating hormone*) et de LH (*luteinizing hormone*) par l'anté-hypophyse (*Figure 8 : La plasticité des prolongements des tanocytes module la sécrétion de GnRH*).



*Figure 8 : La plasticité des prolongements des tanocytes module la sécrétion de GnRH.*

(a) Le jour du diestrus est caractérisé par un niveau de progestérone circulant élevé et un niveau d'œstrogène circulant faible. Ce contexte hormonal entraîne l'expression de TGFβ1 qui favorise l'expression et la sécrétion de Sema7A, par les β-tanocytes de l'EM. Sema7A active Itgβ1 sur ces mêmes tanocytes, afin de stimuler la croissance de leurs prolongements (flèches bleues). Les terminaisons axonales des neurones à GnRH sont alors englouties par les prolongements des tanocytes, formant alors une barrière, afin d'empêcher la libération de GnRH dans l'espace pericapillaire de l'EM. Simultanément, Sema7A agit sur le récepteur PlexinC1 exprimé par les terminaisons des neurones à GnRH, afin de stimuler leur enfouissement dans l'EM (flèche rouge). Donc le facteur Sema7A, sécrété par les tanocytes pour moduler la plasticité de l'EM, établit un dialogue entre les neurones et la glie indispensable à la fertilité. (b) Lors du proestrus, caractérisé par des taux élevés d'œstrogènes circulants, les cellules endothéliales fenêtrées de l'EM libèrent du NO et de la Sema3A. Le NO induit la rétraction des extrémités des tanocytes (flèches rouges), tandis que Sema3A *via* NRP1 favorise la formation d'excroissances des axones à GnRH vers l'espace péricapillaire (flèche bleue). Ainsi la barrière formée par les tanocytes est levée et la sécrétion de GnRH est possible dans le système porte hypophysaire. Figure issue de la revue de Prévot et al. de 2018<sup>11</sup>.

Sema7A (*Semaphorin 7A*), Itg $\beta$ 1 (*integrin  $\beta$ 1*), GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*), NO (*oxyde nitrique*), Sema3A (*Semaphorin-3A*), NRP1 (*neuropilin 1*)

D'autres études, quant à elles, démontrent la capacité des tanycytes à servir de « porte d'entrée » dans le SNC à certaines molécules circulantes, telle que la leptine<sup>14</sup>. La leptine est une adipokine anorexigène capable d'agir au niveau des noyaux ARC, afin d'inhiber la prise alimentaire et de limiter *in fine* la prise de poids corporel. L'étude de Balland & al de 2014<sup>14</sup>, démontre ainsi que les  $\beta$ -tanycytes de l'EM permettent le transit polarisé de la leptine du sang vers le LCR. En effet, elle montre que la leptine injectée en intrapéritonéal est retrouvée d'abord dans l'EM et ensuite dans l'ARC. Les tanycytes sont les premières cellules de ces régions à montrer la phosphorylation de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), un marqueur d'activation du récepteur LepRb. Cela signifie qu'au sein de l'hypothalamus, les tanycytes sont les premiers à détecter et à répondre à la leptine circulante. De plus, l'utilisation d'une leptine fluorescente, toujours injectée en périphérie (par injection intrapéritonéale) à des souris, montre son extravasation à la base de l'EM. Ensuite, la leptine se fixe sur LepRb exprimé par les prolongements des tanycytes pour y être internalisée dans des vésicules recouvertes de clathrines. Elle transite alors au pôle apical de ces cellules afin d'être relarguée sous le contrôle de la voie ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases 1/2*) dans le LCR du 3V. Une fois dans le LCR, la leptine peut atteindre diverses zones cérébrales, dont l'hypothalamus médio-basal.

### **4.3. Conséquences de l'obésité sur le fonctionnement tanycytaire**

Il existe une relation de causalité directe entre l'obésité et la leptine. En effet, un défaut de sa production, de son transport hypothalamique<sup>72,73</sup> ou l'absence de son récepteur<sup>74</sup> (souris db/db) engendre une obésité chez les individus atteints. De plus, son action anorexigène hypothalamique proportionnelle à la masse adipeuse est inefficace lors de l'obésité et un phénomène de résistance hormonale est observé dans ce cas<sup>75</sup>. La suite de l'étude de Balland & al 2014<sup>14</sup>, montre que les tanycytes des souris obèses DIO (après 8 semaines de régime HF) et db/db capturent la leptine fluorescente normalement mais ne la libèrent pas dans le LCR, car l'hormone n'active plus la voie ERK1/2. Ainsi, la résistance hypothalamique à la leptine lors de l'obésité est liée à un défaut du passage de la leptine périphérique vers le LCR puisque celle-ci reste séquestrée dans les tanycytes de l'EM. Ce problème est pallié lorsque les souris obèses reçoivent de l'EGF (*epidermal growth factor*), 15 minutes avant la fin des 45 minutes du

traitement par la leptine périphérique exogène. Cela est expliqué par le fait que l'EGF est lui-même capable d'activer la voie ERK1/2 *via* erbB1 (*epidermal growth factor receptor*) dans les tanocytes, indépendamment de la leptine, restaurant ainsi la libération de leptine dans le LCR. De plus, L'EGF restaure la capacité de la leptine exogène à activer STAT3 dans les neurones hypothalamiques qui y sont sensibles et induit une forte perte de poids chez les souris DIO (après 8 semaines de régime HF). Ces résultats suggèrent que les tanocytes sont peut-être les premières cellules cérébrales à devenir résistantes à la leptine lors de l'obésité. Dans la continuité de cette étude, une autre étude sur la surnutrition de souris montre elle aussi une résistance hormonale centrale à la ghréline, développée dès la deuxième semaine de vie du fait potentiellement d'un défaut de transport hormonal par les tanocytes<sup>76</sup>. Cette altération précoce de la fonction tanocytaire pourrait prédisposer les individus à développer à l'âge adulte des maladies métaboliques, telle que l'obésité.

Ainsi, à travers les différentes populations neuronales, les astrocytes, les cellules microgliales et les tanocytes, l'hypothalamus est capable de détecter des variations en nutriments. Grâce à des neurones sensibles au glucose, il peut détecter la glycémie et adapter la prise alimentaire en conséquence. Comme montré précédemment, il est aussi capable de répondre à certains signaux endocriniens, tels que la leptine et l'insuline.

En situation d'obésité, où l'hyperglycémie est souvent constatée, les niveaux circulants de nombreuses hormones sont bouleversés : le taux circulant d'adiponectine devient très faible alors que ceux de l'insuline, de la résistine et du *fibroblast Growth factor 21* (FGF21) deviennent beaucoup plus importants, par rapport à une situation non pathologique. Or il a été montré que toutes ces hormones jouent un rôle métabolique clé durant l'obésité. Dans les chapitres suivants, je focaliserai particulièrement sur les actions périphériques et centrales de l'hormone FGF21, qui a fait l'objet de mon étude de thèse.

## Chapitre II : FGF21, une hormone aux actions insulino-sensibilisatrices et anti-inflammatoires en situation d'obésité

Dans ce chapitre, je vais tout d'abord décrire la découverte des premières actions métaboliques du FGF21 en situation obésogène. Je décrirai ensuite cette hormone ainsi que ses récepteurs. Enfin, je détaillerai ses actions insulino-sensibilisatrices puis celles anti-inflammatoires périphériques.

### 1. Obésité et FGF21

FGF21 est une hormone dont les taux circulants sont augmentés en situation d'obésité et de DT<sup>27</sup>. Les rôles métaboliques de cette hormone n'ont été identifiés que récemment. Son premier rôle a été reconnu en 2005 sur des cultures primaires d'adipocytes humains 3T3-L1 différenciés et chez des animaux (des souris, des rats, des singes) obèses (ob/ob) ou diabétiques (db/db)<sup>77-79</sup>. Ce rôle consiste à favoriser l'entrée de glucose *via* GLUT1 (*glucose transporter 1*) dans les adipocytes, de manière indépendante et additionnelle à l'activité de l'insuline<sup>77</sup> (*Figure 9 : Schéma récapitulatif des principales conclusions de différentes études sur les fonctions physiologiques et sur le potentiel thérapeutique de FGF21*). Ainsi, lors d'une hyperglycémie chronique, l'entrée de glucose est d'abord induite par l'insuline. FGF21 agit secondairement, quatre heures après, à la suite d'une activation transcriptionnelle. Il interagit avec FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor 1*) et FGFR2 pour activer FRS2 (*FGFR substrate-2*), une protéine d'amarrage reliant les FGFR à la voie Ras/MAPK (*mitogen-activated protein kinases*). FRS2 active transitoirement ERK1/2 pour induire l'expression de GLUT1<sup>80</sup>. L'expression de ce transporteur de glucose à la surface des adipocytes blancs permet *in fine* de diminuer le taux de glucose plasmatique lors de l'obésité. Ainsi, un niveau élevé de FGF21 améliore le métabolisme glucidique chez les animaux obèses<sup>80</sup>. De plus, la surexpression de FGF21, qu'elle soit due à une modification génétique (souris Tg-FGF21) ou à l'administration de cette hormone (rhFGF21), rend les animaux résistants à l'obésité<sup>77,78</sup>. En effet, les animaux obèses surexprimant FGF21 ont leur poids corporel diminué d'environ 20% par rapport aux animaux obèses contrôles. De plus, leur sensibilité à l'insuline est accrue et maintenue. Cela se manifeste par une glycémie à jeun faible et par une meilleure clairance au glucose par rapport aux animaux obèses contrôles<sup>80</sup> (*Figure 9 : Schéma récapitulatif des principales conclusions de différentes études sur les fonctions physiologiques et sur le potentiel thérapeutique de FGF21*). L'administration de FGF21 améliore aussi le métabolisme lipidique, en rétablissant un niveau

normal de triglycérides circulants chez les souris ob/ob et db/db. Cette hormone à l'action insulino-sensibilisatrice se révèle très intéressante car elle n'induit pas d'hypoglycémie après injection<sup>77,78</sup>. De plus, FGF21 montre une absence de toxicité systémique (sur les murins et les singes) ou de capacité mitogénique et proliférative<sup>77,78</sup>. Elle peut donc être envisagée comme une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'obésité. Au vu de l'importance du rôle de FGF21 pendant l'obésité, je décrirai dans les sous-parties suivantes cette hormone, puis ses récepteurs et enfin les voies de signalisation PPAR qui lui sont associées.

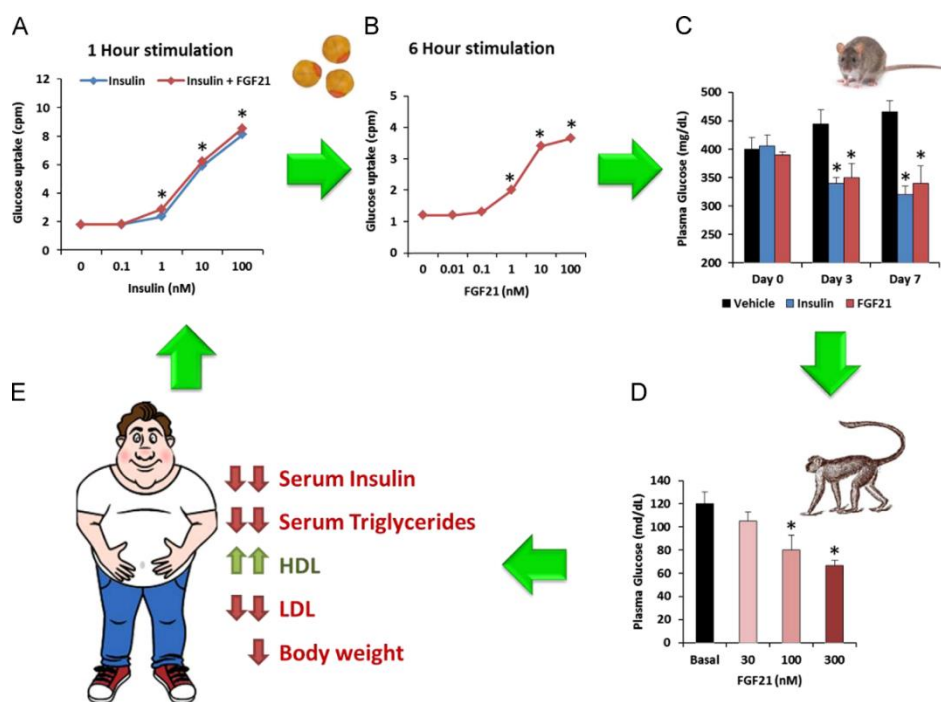


Figure 9 : Schéma récapitulatif des principales conclusions de différentes études sur les fonctions physiologiques et sur le potentiel thérapeutique de FGF21.

(A) *In vitro*, FGF21 favorise l'entrée de glucose dans les adipocytes murins, en ayant un effet additif à celui de l'insuline et en potentialisant la réponse à celle-ci. (B) FGF21 favorise aussi l'entrée de glucose dans les adipocytes indépendamment de l'insuline. (C-D) Transposition des effets *in vitro*, chez la souris ob/ob (C) et le singe (D) où le traitement par le FGF21 diminue le taux de glucose plasmatique à long terme et de manière comparable à l'insuline. (E) Effets physiologiques bénéfiques d'un analogue à FGF21, LY2405319, chez l'homme. Schéma tiré de la revue de Kharitonov & Adams de 2014<sup>80</sup>.

HDL (*high density lipoprotein*), LDL (*low density lipoprotein*)

### 1.1. L'hépatokine FGF21

FGF21 est une protéine pléiotrope, impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique *via* ses actions sur les métabolismes glucidique et lipidique<sup>81</sup>. Cette protéine de 181 acides aminés appartient à la famille des FGF souris/humain qui compte vingt-deux membres, répartis en sept sous-familles<sup>82,83</sup>. Le FGF21 humain (19,5kDa) possède une très forte homologie structurale, d'environ 75-80%, avec le FGF21 souris<sup>84</sup>.

Dans l'ensemble, les FGF sont des polypeptides trouvés chez les métazoaires. Ils participent à de nombreux processus biologiques, notamment au cours du développement embryonnaire et à l'âge adulte<sup>85,86</sup>. Par exemple, ils interviennent dans la régulation de l'angiogenèse, du développement embryonnaire, de la croissance, de la prolifération et de la différenciation cellulaire ainsi que dans la cicatrisation. Ces molécules sont sécrétées et possèdent une forte affinité pour les glycosaminoglycanes d'héparane sulfate<sup>85,86</sup>. Les glycosaminoglycanes, qui sont ancrés dans la membrane plasmique et sont présents dans la matrice extracellulaire, limitent la diffusion des FGF et restreignent leur action à un rôle autocrine ou paracrine. Cependant, il existe trois exceptions : FGF15/19, FGF21 et FGF23, composant à eux trois une sous-famille<sup>85,86</sup>. Le FGF15 souris est orthologue avec le FGF19 humain. Tous deux sont produits par l'épithélium intestinal en réponse à la recapture des acides biliaires en phase post-prandiale<sup>87</sup>. Ils répriment la synthèse d'acide biliaire ainsi que la néoglucogénèse, mais favorise la synthèse de glycogène et de protéines<sup>87</sup>. FGF23 est quant à lui produit principalement par les os ; il agit dans ceux-ci, ainsi que sur les reins pour réguler l'absorption du phosphate et la biosynthèse de la vitamine D<sup>85</sup>. Les trois membres de cette famille ont en commun une très faible affinité pour l'héparane sulfate, ce qui leur confère une activité endocrine. Ils ne sont pas séquestrés dans la matrice extracellulaire et peuvent donc rejoindre la circulation sanguine, afin de remplir leurs fonctions hormonales. Il est remarquable que seul FGF21 exerce une action métabolique endocrine sans avoir un effet sur la prolifération cellulaire ou mitogénique<sup>77</sup>.

Les FGF21 souris et humain ont été clonés pour la première fois en 2000 par le groupe du Dr. Nobuyuki Itoh, grâce à une approche PCR utilisant des amorces dégénératives dérivées des FGF. Les résultats montrent une forte expression du transcrit FGF21 dans le foie et le thymus<sup>88,89</sup>. Par la suite, ces résultats ont été confortés et complétés par d'autres études qui montrent que les TA (blancs (viscéral, sous-cutané, épendymal) et brun)<sup>89,90</sup>, les muscles squelettiques<sup>91</sup>, le pancréas et le cerveau (cf. : III.1) sont des sites de production. L'ensemble de

ces organes constituent également des cibles pour FGF21. Il est toutefois reconnu que la protéine FGF21 est principalement exprimée et sécrétée par le foie, c'est pour cela qu'elle est qualifiée d'hépatokine<sup>92</sup>. Cette sécrétion hépatique constitue la majeure partie du FGF21 circulant en situation non pathologique. Actuellement, aucune fourchette restreinte du taux circulant de FGF21 n'a été établie, ni chez l'animal (chez des souris, des rats, des primates non-humains) ni chez l'humain, car les résultats sont très hétérogènes à cause des techniques de dosages utilisées et des conditions physiologiques des sujets. Par exemple, chez l'homme adulte sain, les concentrations basales de FGF21 circulant oscillent entre 0.05 ng/mL et 2 ng/mL<sup>93-95</sup>.

Une explication de la multiplication des sites de production de FGF21 peut s'attribuer à son temps de demi-vie très court, allant de trente minutes à deux heures<sup>96</sup>. De plus, cette molécule est de conformation instable. Cela constitue un inconvénient thérapeutique majeur, car sa capacité d'action en est fortement restreinte. De plus, elle s'agrège rapidement une fois en solution, ce qui l'empêche d'être biologiquement active<sup>96</sup>. L'expansion du temps de demi-vie, la stabilisation structurale ainsi que l'inhibition de l'agrégation du FGF21 constituent des axes de recherche pour son application thérapeutique. Des analogues ont été élaborés, dont les plus prometteurs, le LY2405319 et le PF-05231023 sont allés jusqu'en phase de développement clinique (Phase I) (*Tableau 2 : Les analogues existants du FGF21*).

Name	Company	Description	Features	Development status	Refs
FGF21	Not applicable	Native FGF21	Glucose-, weight-, and lipid-lowering in mouse and monkey models of diabetes and obesity. $T_{1/2} = 0.5-2$ h	Not suitable for clinical development	[1,6,8,58,68]
LY2405319	Lilly	FGF21 $\Delta$ HPIP, L118C, A134C, S167A	Aggregation-resistant FGF21 analog with improved physical stability. <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> properties similar to native FGF21 in mice and monkeys. $T_{1/2} = 1.5-3$ h	Phase I, discontinued	[68,69]
Fc-FGF21	Amgen	Fc (IgG1)-FGF21 (L98R,P171G)	Aggregation- and degradation-resistant FGF21 analog with long duration of action. <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> properties similar to native FGF21 in mice and monkeys. $T_{1/2} = 12-30$ h	Not disclosed	[5,6,58]
PEG-FGF21	Amgen	PEG20 mono- and dual-modified FGF21 analogs	Pegylated FGF21 analogs with <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> properties similar to native FGF21 in mice. Predicted to be long-acting	Not disclosed	[70]
ARX-618 related molecules	Ambrx/Merck	PEG30-FGF21 (Q108pAcF)	FGF21 analog with long time of action. <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> properties similar to native FGF21 in mice. $T_{1/2}$ (rats) = 22 h	Alliance discontinued	[36,82]
ARX-618	Ambrx/BMS <sup>a</sup>	Not disclosed	Not disclosed	Phase I	
FGF21-PKE Adnectin	BMS	FGF21-adnectin fusion protein	FGF21 analog with glucose-lowering similar to native FGF21 in mice and long time-action. $T_{1/2}$ (monkeys) = 96 h	Dropped from pipeline	[71]
CVX-343	Pfizer	FGF21 ( $\Delta$ H1, A129C) covalently linked to an IgG1 $\kappa$ antibody (CVX200)	FGF21 analog with glucose-lowering similar to native FGF21 in mice and long time-action. $T_{1/2}$ (mice, rats, monkeys) = 28-65 h	Not disclosed	[37]
mimAb1	Amgen	Fully human antibody with high affinity for KLB	FGF21 mimetic which specifically activates the FGFR1 $\alpha$ /KLB complex. Efficacy similar to Fc-FGF21 in monkeys, but extended time-action. $T_{1/2}$ (monkeys) = 11 days	Not disclosed	[27]
C3201-HSA	Amgen	HSA-coupled avimer combining subunits with high affinity for FGFR1c and KLB	FGF21 mimetic which specifically activates the FGFR1 $\alpha$ /KLB complex. Efficacy similar to Fc-FGF21 in monkeys, but shorter time-action due to antibody formation. $T_{1/2}$ (monkeys) = 50 h	Not disclosed	[73]
R1Mab	Genzyme	Fully human antibody with high affinity for FGFR1c/b	FGF21 mimetic which activates FGFR1c/b in the absence of KLB. Activities consistent with FGF21 and FGF23 in mice and monkeys	Not disclosed	[72]

Tableau 2 : Les analogues existants du FGF21.

Tableau récapitulatif des analogues du FGF21 conçus et produits à ce jour, en précisant les compagnies qui les produisent, leurs natures ou leurs structures biochimiques, leurs effets physiologiques majeurs, le stade de développement pour une application thérapeutique et les références des études utilisant ces analogues. Tableau tiré de la revue de Gimero & Moller de 2014<sup>96</sup>.

## 1.2. Les récepteurs de FGF21 : FGFR1 et KLB

Pour exercer ses actions métaboliques au niveau de ses organes cibles, le FGF21 requiert la présence de récepteurs membranaires, le corécepteur  $\beta$ -Klotho (KLB) de 119kDa et le récepteur FGFR1<sup>77,97</sup>. Ce dernier ainsi que les autres FGFR (R2, R3 et R4) sont des récepteurs tyrosines kinases codés par quatre gènes différents<sup>98</sup>. Ils se composent d'un domaine extracellulaire, d'un passage transmembranaire en hélice et d'un domaine intracellulaire comprenant un domaine tyrosine kinase. Le domaine extracellulaire permet de lier le ligand et se compose de trois domaines immunoglobulines appelés D1, D2 et D3. D2 ainsi que D3 sont responsables de l'affinité et de la spécificité de liaison aux FGF<sup>98</sup> (Figure 10 : Organisation des récepteurs FGFR). La seconde moitié de D3 des FGFR1, R2 et R3 est codée par deux exons alternatifs. L'épissage alternatif de D3 génère deux isoformes « b et c »<sup>99</sup>. Il existe donc sept FGFR différents (R1b,



R1c, R2b, R2c, R3b, R3c, R4) avec des affinités propres pour chaque FGF. De plus, les profils d'expression de ces récepteurs sont variés en fonction des tissus, ce qui spécifie l'action des FGF. Par exemple, FGFR1c a une expression ubiquitaire, notamment dans le cerveau, contrairement à R4<sup>85</sup>.

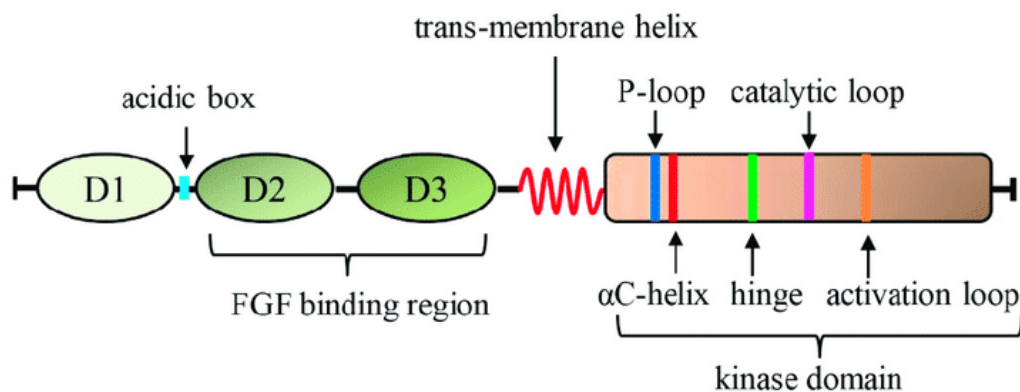


Figure 10 : Organisation des récepteurs FGFR.

L'extrémité N-terminale des FGFR se trouve au bout du domaine extracellulaire qui comprend les trois domaines D1, D2 et D3. Entre D1 et D2 est situé un motif hautement conservé, appelé *acid box*, riche en acide aspartique, et qui participerait à l'auto-inhibition de la liaison ligand-récepteur avec D1. D2 et D3 lient, quant à eux, les ligands potentiels, et précèdent la partie transmembranaire hélicoïdale. Le domaine kinase intracellulaire est constitué d'un lobe N-ter relié *via* un *hinge* au lobe C-ter. Le lobe N-ter, de cent acides aminés, est constitué d'une hélice alpha ( $\alpha$ C-helix) et de cinq feuillets beta antiparallèles incluant une *P-loop*. Le lobe C-ter, d'environ deux cents acides aminés, est constitué de sept hélices alpha, comportant une *catalytic loop* et une *activation loop*. Le lobe C-ter est essentiel pour l'auto-inhibition et l'activité kinase du récepteur. Figure tirée de l'article de Dai & al. de 2019<sup>98</sup>.

Alors qu'il est établi que FGFR1 est le principal récepteur de FGF21, aucune étude n'a montré d'interaction directe entre l'hormone et ce récepteur, car FGF21, tout comme les autres FGF endocrines, a une faible affinité pour les FGFR et les glycosaminoglycanes d'héparane sulfate. Par conséquent, ces interactions nécessitent l'intervention d'un corécepteur Klotho pour les stabiliser<sup>77</sup>. Les corécepteurs Klotho sont des protéines à un domaine transmembranaire avec une région extracellulaire contenant deux domaines glycoside hydrolase en tandem<sup>83</sup>. Ils se retrouvent sur les membranes plasmiques de divers types cellulaires, notamment des adipocytes. Leur domaine intracellulaire est extrêmement restreint et ne permet pas de transduire un signal intracellulaire<sup>83</sup>. Il en existe trois, tout d'abord Klotho, aussi appelé  $\alpha$ -

Klotho<sup>83</sup>. Il lie uniquement FGF23 avec FGFR1c, R3c ou R4 et est principalement exprimé dans les reins, le plexus choroïde et le pancréas. Ensuite,  $\gamma$ -Klotho, aussi appelé *lactase-like protein* (Lctl), qui forme le complexe FGF15/19 avec R1b, R1c, R2c ou R4. Lctl est principalement exprimé dans les yeux mais aussi dans le TA brun et les reins. Quant à KLB ( $\beta$ -Klotho), il est capable d'interagir avec FGF15/19 et FGF21 puis avec tous les FGFR<sup>78,97,100</sup>. KLB forme le complexe FGF15/19-FGFR4 et facilite d'avantage l'interaction de FGF21 avec FGFR1c ou FGFR4<sup>97,100,101</sup>. Or comme FGFR4 a un profil d'expression restreint, l'action métabolique de FGF21 dépend donc majoritairement de FGFR1c et nécessite KLB<sup>97</sup>. Cette action n'est pourtant pas ubiquitaire. Elle est restreinte et spécifique grâce à l'expression de KLB seulement par les organes entérohépatiques (foie, la vésicule biliaire, le côlon et le pancréas), les TAs (blancs et bruns), le pancréas et le cerveau (cf. : III.1)<sup>102</sup>.

En 2018, la structure cristallographique des régions extracellulaires de KLB (libres ou liées au ligand) a été établie et confirme ces résultats<sup>103</sup>. Dans ce modèle expérimental, les monomères FGFR1 et KLB existent en équilibre avec les hétérodimères FGFR1 et KLB dans la membrane cellulaire. Il est montré que FGF21 se lie avec une affinité élevée,  $KD = 43,5$  nM, soit à des monomères KLB, soit à des hétérodimères préexistants KLB/FGFR1c. La queue C-terminale de FGF21 interagit alors avec les deux domaines glycoside hydrolase de la partie extracellulaires de KLB. Une légère torsion du linker entre les domaines glycoside hydrolase s'effectue pour permettre à l'extrémité N-terminale de FGF21 d'interagir avec une affinité suffisante avec les domaines D2-D3 de FGFR1. FGFR1 facilite alors la dimérisation des complexes formés de FGF21, KLB et FGFR1, afin d'activer ses domaines tyrosines kinases intracellulaires par transphosphorylation<sup>103</sup>. Cette activation intracellulaire de FGFR1 déclenche des signalisations intracellulaires propres à FGF21 (FRS2, ERK1/2, GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), AKT (*protein kinase B*), RAF, SHP2 (*src-homology domain-2-containing phosphatase 2*) et STAT3)<sup>77,100,104</sup> (*Figure 11 : Modèle de mécanisme de signalisation cellulaire de FGF21*). Ce modèle propose donc un ratio stœchiométrique symétrique 2 :2 :2, dans lequel KLB est le récepteur principal de haute affinité pour FGF21, alors que FGFR1 fonctionne davantage comme une sous-unité catalytique activée de manière dépendante de KLB<sup>103</sup>. L'importance de l'implication de KLB a été montrée par les KO-spé (*knock-out*) de KLB<sup>105</sup> dans divers organes, notamment le foie, le TA, le pancréas et le cerveau.

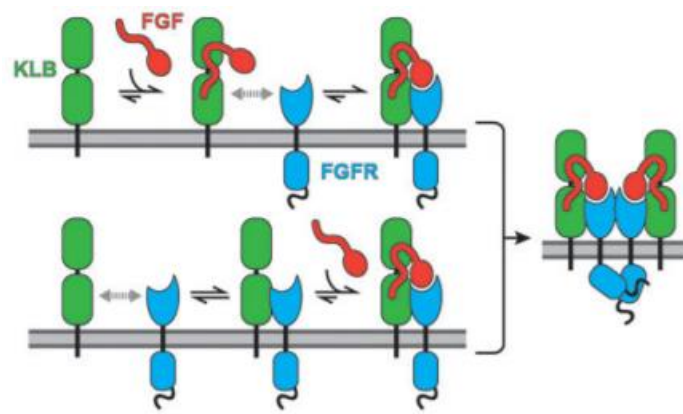


Figure 11 : Modèle de mécanisme de signalisation cellulaire de FGF21.

Ce schéma présente un modèle d'interaction de type 2 :2 :2. Dans la membrane plasmique de cellules non stimulées, les monomères KLB et FGFR1c sont en équilibre avec les hétérodimères FGFR1c/KLB. Tout d'abord, la queue C-terminale de FGF21 va interagir avec une forte affinité avec KLB, monomérique ou hétérodimérique. Ensuite, l'extrémité N-terminale de FGF21 interagit avec FGFR1c ce qui déplace l'équilibre vers la formation d'un complexe FGF21/FGFR1c/KLB. Ce complexe va se dimériser et les parties intracellulaires de chaque FGFR1c vont activer leur activité tyrosine kinase par transphosphorylation. Ainsi, FGFR1c fonctionne comme une sous-unité catalytique, qui favorise la dimérisation du récepteur et la signalisation intracellulaire. Figure issue de l'article de Lee & al. de 2018<sup>103</sup>.

### 1.3. La signalisation PPAR

Les premières actions autocrines et paracrines de FGF21 ont été démontrées dans le foie et le TA. En effet, le régime alimentaire cétogène ou le jeun prolongé, provoquent une libération d'acides gras libres par les adipocytes dans la circulation, afin de fournir un substrat énergétique à l'ensemble de l'organisme. Les acides gras dans le foie peuvent traverser la membrane plasmique des hépatocytes. Dans le cytoplasme, ils agissent comme ligand endogène du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$* ), afin d'induire la transcription de FGF21<sup>93,106,107</sup>. Ensuite, le FGF21 hépatique produit est libéré pour agir de manière endocrine, mais aussi de manière paracrine et autocrine. En effet, les hépatocytes expriment les récepteurs KLB et FGFR1 (cf. : II.1.2). Par conséquent, FGF21 peut s'y fixer afin de favoriser la cétogenèse, la néoglucogénèse, l'oxydation des acides gras et supprimer la lipogenèse. Ainsi, le FGF21 est un moyen pour PPAR $\alpha$  d'induire une réponse métabolique adaptative au jeun.

Dans la situation inverse c'est-à-dire après un repas, il existe dans les adipocytes un mécanisme équivalent. Dans ce contexte, le niveau d'acides gras libres circulants est élevé chez les souris. Ces derniers vont traverser la membrane plasmique des adipocytes, afin d'agir comme ligand endogène de PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptors  $\gamma$* )<sup>104</sup>. PPAR $\gamma$  passe du cytoplasme au noyau, afin d'induire la transcription de FGF21. Le FGF21 produit peut alors exercer des actions autocrines et paracrines *via* le complexe KLB/FGFR1. Il crée une boucle de régulation positive, en augmentant l'expression et en potentialisant l'activité de PPAR $\gamma$  afin d'augmenter sa propre expression. Cependant, l'intermédiaire cytoplasmique par lequel FGF21 agit sur PPAR $\gamma$  reste inconnu à ce jour<sup>108</sup>. Parallèlement, FGF21 augmente l'entrée de glucose dans les adipocytes conduisant à la baisse de la glycémie comme décrit précédemment (cf. : II.1). De plus, il diminue la lipolyse, afin de limiter la libération d'acide gras et favorise la thermogénèse pour brûler l'excès de réserve énergétique. Ce mécanisme, quand il est poussé à l'extrême, en situation d'obésité, tend à perdre toute efficacité.

En effet, comme les souris obèses DIO présentent des taux d'acides gras circulants élevés, ces mécanismes de production de FGF21 s'emballent<sup>109</sup>. Le niveau de FGF21 sérique peut atteindre 2315 pg/mL chez les souris obèses DIO contre 604,2 pg/mL pour les souris *wild type*<sup>109-111</sup>. De plus, l'expression adipeuse de FGF21 double, tandis que celle hépatique est vingt fois plus importante que chez les souris contrôles. Pour autant, l'expression de KLB hépatique n'est pas affectée par l'obésité alors que celle de FGFR1 diminue (chez les souris maigres 0.021 vs chez les souris obèses 0.0069)<sup>109,110</sup>. Dans le TA blanc, les expressions de KLB et FGFR1 sont diminuées respectivement de 44% et 50%<sup>111</sup>. L'ensemble de ces paramètres suggère une résistance hormonale au FGF21 périphérique en cas d'obésité<sup>109</sup>.

Ce statut est cependant fortement débattu à ce jour. Ainsi, d'un côté, l'étude de Fisher & al. de 2010<sup>109</sup> soutient une résistance hormonale globale au FGF21, car l'administration de rhFGF21 exogène dans la veine cave inférieure de souris C57BL/6 obèses DIO (nourries pendant vingt-deux semaines avec un régime *HF-high sucrose*) n'induit plus les effets métaboliques bénéfiques induits par FGF21<sup>109</sup>. FGF21 active moins la voie ERK1/2 dans le TA blanc et le foie. Par conséquent, dans le TA blanc, l'expression en ARNm des gènes impliqués dans la lipolyse (HSL (*hormone-sensitive lipase*) et périlipine) n'est pas affectée, tandis que celle de GLUT1 est régulée à la baisse. Ainsi, dans ce cas de figure, FGF21 n'est plus capable de diminuer la lipolyse

et de faciliter l'entrée de glucose dans les adipocytes. Ce dernier point est conforté lorsque 200 ng/g de FGF21 sont injectés et qu'une faible diminution du glucose est constatée (chez les souris minces injectées avec du FGF21 à 135.8mg/dl la diminution est de 17,4% ; chez les souris obèses injectées avec du FGF21 à 153.7mg/dL elle est de -8.3%). D'un autre côté, ces résultats sont cependant remis en question par l'étude de Hale & al. 2012<sup>111</sup>. Celle-ci montre aussi une altération de la signalisation FGF21-KLB/FGFR1-ERK1/2 dans les adipocytes du modèle DIO (douze semaines de régime HF dont 60% de l'énergie fournie provient des lipides). En revanche, cinquante minutes après une injection intrapéritonéale de rhFGF21 (à une dose de 1mg/kg), la réponse métabolique au rhFGF21 est préservée, avec une diminution de 31% du glucose circulant, une diminution de 59% de l'insuline circulante et une perte de poids par rapport aux témoins. Dans cette étude, les souris DIO conservent donc une sensibilité à FGF21 malgré une altération de sa signalisation dans le TA. La même conclusion a été tirée à partir des souris ob/ob. Une étude de 2017<sup>110</sup> soutient quant à elle que la régulation négative de l'expression de KLB dans le TA blanc n'est pas le facteur principal contribuant à l'altération de la signalisation FGF21. Cet argument est soutenu par le fait que les souris obèses DIO (soumise pendant seize semaines à un régime HF dont 60% de l'énergie fournie provient des lipides) surexprimant KLB dans le TA blanc ne montrent pas un maintien de la sensibilité au FGF21 exogène et une diminution de l'altération de la signalisation FGF21 dans le TA. Il n'est pas non plus constaté une perte de poids, une meilleure sensibilité à l'insuline ou une meilleure tolérance au glucose.

La controverse sur la résistance à FGF21 s'explique non seulement par des temps et des compositions de régime HF différents, mais aussi par des différences dans l'âge des souris et le traitement auxquelles elles sont exposées. En effet, il a été suggéré que si un traitement aigu de FGF21 (une injection intrapéritonéale) montre une résistance, cela ne reflète pas nécessairement l'effet d'un traitement chronique qui pourrait maintenir une sensibilité à FGF21 dans les mêmes modèles d'obésité<sup>110</sup>.

## **2. Propriétés insulino-sensibilisatrices de FGF21 en situation d'obésité**

Dans cette sous partie seront détaillées brièvement les actions métaboliques et insulino-sensibilisatrices périphériques de FGF21 en situation d'obésité. Ensuite, je décrirai l'action insulino-sensibilisatrice indirecte de FGF21 *via* l'induction de l'adiponectine dans les adipocytes.

## 2.1. Impact de FGF21 sur les paramètres physiologiques

FGF21 fait l'objet de nombreuses études, grâce à ses effets bénéfiques sur le métabolisme du glucose et des lipides. En effet, l'injection de FGF21 à des souris obèses DIO entraîne une perte de poids, une réduction des niveaux circulants de glucose, d'insuline, de triglycérides et de cholestérol<sup>112-114</sup>. Ces améliorations résultent partiellement de son action sur les TA blancs, considérés comme les principaux organes cibles de FGF21. En effet, les souris lipodystrophiques sont réfractaires aux actions aiguës et chroniques de FGF21, mais lorsqu'elles reçoivent une transplantation de TA blanc, elles retrouvent une réactivité à cette hormone<sup>115</sup>. De plus, l'importance des TA blancs, dans l'action anti-diabétogène de FGF21, a été confirmée par la perturbation de ses voies de signalisation. Effectivement, la délétion spécifique de FGFR1 ou KLB (KO-FGFR1 ou KO-KLB) dans les adipocytes empêche FGF21 d'induire une diminution de la glycémie, de l'insulinémie et du taux de triglycérides circulants ainsi que de sa propre expression<sup>116,117</sup>. Ce dernier résultat identifie le TA comme un site d'expression et de sécrétion de FGF21. Cette expression endogène est régulée positivement par PPAR $\gamma$ . Le FGF21 produit peut alors agir de manière autocrine sur les adipocytes afin de stimuler l'activité de PPAR $\gamma$  qui va à son tour amplifier l'expression de FGF21<sup>118</sup>.

Au niveau du TA blanc, FGF21 participe à la régulation de la lipolyse. Maintenant, d'après les études *in vitro* sur des cultures cellulaires d'adipocytes 3T3-L1, il n'est pas clair si ce rôle favorise ou inhibe la lipolyse<sup>119-121</sup>. Ces divergences peuvent s'expliquer par un effet chronique ou aigu indirect du FGF21 sur la lipolyse. Par exemple, une administration de rhFGF21 diminue de manière aiguë les concentrations plasmatiques de FFA et l'expression de la HSL, dans le TA blanc de souris contrôle ou ob/ob, démontrant une régulation négative de la lipolyse par le FGF21<sup>109,121</sup>. En revanche, le FGF21 stimule la lipolyse chez les modèles murins exprimant des niveaux altérés de cette hormone de façon chronique (surexpression, administration chronique de FGF21). En effet, ces animaux présentent des concentrations élevées de FFA, une expression accrue de la HSL et une réduction de la taille des adipocytes<sup>106,122,123</sup>. Parallèlement, l'administration chronique de FGF21, à des souris obèses DIO ou ob/ob, stimule la thermogénèse dans le TA brun et le *browning* dans le TA blanc, afin de réduire le poids corporel et l'adiposité des animaux<sup>79</sup>. Cela est caractérisé par une augmentation de l'expression de gène thermogénique, comme UCP-1 (*uncoupling protein 1*), dans les différents types d'adipocytes<sup>79</sup>. Il est donc montré que le *browning* est induit de façon directe par le FGF21. Cependant, des

études montrent que cela pourrait aussi résulter de son action hypothalamique stimulant l'activité nerveuse sympathique (cf. : III.4.1)<sup>124,125</sup>. La majorité des études (sauf deux d'entre elles<sup>126,127</sup>) s'accordent donc à dire que les effets pharmacologiques du FGF21, sur le métabolisme du glucose et des lipides, résultent partiellement de la mise en place du *browning* dans le TA blanc.

D'autre part, une étude sur des souris KO-FGF21 total nourries avec un régime cétogène montre que ces effets sur le TA sont indépendants de l'action directe de FGF21 sur le foie. Il y a rapporté que les souris KO-FGF21 présentent une insulino-résistance hépatique et une forte production de glucose hépatique<sup>128</sup>. Cependant, le foie est lui aussi une cible du FGF21, car son administration à des souris obèses DIO améliore la sensibilité hépatique et périphérique à l'insuline. Elle stimule également la voie Akt, réduit l'accumulation de DAG (*diacylglycerol*) et diminue l'expression de la PKC (*protein kinase C*) dans le foie et les muscles<sup>128,129</sup>. De plus, ce traitement réverse la stéatose hépatique, diminue les taux plasmatiques de triglycéride, d'acides gras non estérifiés et de cholestérol<sup>79,130</sup>. Par conséquent, chez les animaux DIO, le traitement FGF21 améliore le métabolisme des lipides et la sensibilité à l'insuline. Afin, d'étudier davantage l'action insulino-sensibilisatrice périphérique de FGF21, en situation d'obésité associée à une hyperglycémie chronique, du FGF21 est administré pendant trois semaines à des souris contrôles ou DIO (quinze semaines de régime HF)<sup>130</sup>. La sensibilité à l'insuline des animaux est améliorée *via* la réduction de la production basale de glucose hépatique et à une augmentation de la synthèse de glycogène<sup>129-131</sup>. De plus, il améliore l'inhibition de la lipolyse et de la néoglucogénèse induites par l'insuline<sup>119,130</sup>. Ces effets insulino-sensibilisateurs sont indépendants de la réduction du poids corporel ou de l'adiposité. Parallèlement, il induit une réduction importante du taux de triglycérides hépatiques en réduisant la quantité de SREBP-1 (*sterol regulatory element binding protein-1*) nucléaire. Cela entraîne une inhibition de l'expression des gènes cibles de SREBP-1 impliqués dans glycolyse, la biosynthèse *de novo* d'acides gras et de triglycérides<sup>130</sup>. De plus, dans le TA brun d'animaux obèses, FGF21 favorise davantage l'entrée de glucose que dans les adipocytes blancs, ainsi que la  $\beta$ -oxydation des acides gras<sup>79,132,133</sup>. L'entrée de glucose est aussi améliorée dans les muscles squelettiques et cardiaques, mais à moindre mesure.



Il est remarquable que des effets insulino-sensibilisateurs similaires ont été observés chez des souris diabétiques, KO-IR hépatique (LIRKO), recevant un traitement avec du FGF21<sup>134</sup>. En effet, leur poids corporel a été diminué et leur hyperglycémie normalisée. D'une part, en facilitant l'entrée de glucose dans les adipocytes brun. D'autre part, en augmentant le *browning* dans le TA blanc et en augmentant globalement les dépenses énergétiques de l'organisme. Cependant, FGF21 n'est plus capable d'induire ses effets sur le métabolisme lipidique en absence de l'action de l'insuline au niveau hépatique. Ces résultats montrent donc que chez les souris diabétiques, FGF21 régule indépendamment à l'action de l'insuline hépatique, l'augmentation des dépenses énergétiques et l'homéostasie du glucose. En revanche, il n'est plus capable de réguler le métabolisme lipidique, notamment la réduction du cholestérol circulant, l'accumulation de triglycérides dans le foie et la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et du cholestérol. L'étude montre donc que le dialogue entre le FGF21 et l'insuline hépatique est nécessaire à la régulation du métabolisme lipidique dans le foie, mais pas dans les TA<sup>134</sup> (Figure 12 : Schéma représentant les actions de FGF21, dépendantes et indépendantes, de l'action de l'insuline hépatique pour réguler les métabolismes glucidique et lipidique).

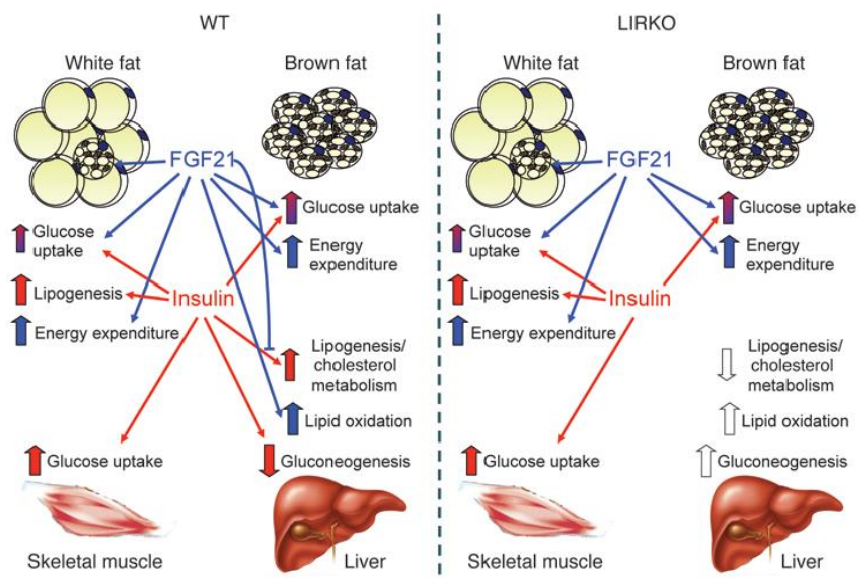


Figure 12 : Schéma représentant les actions de FGF21, dépendantes et indépendantes, de l'action de l'insuline hépatique pour réguler les métabolismes glucidique et lipidique.

Chez les souris *wild type*, le FGF21 et l'insuline participent tous deux à la régulation des métabolismes glucidique et lipidique, en agissant sur le foie, les muscles et sur les TA blanc et brun. Les actions métaboliques propres à FGF21 sont représentées par les flèches bleues, tandis que celles spécifiques à l'insuline sont représentées par les flèches rouges. Afin, de savoir si



l'action périphérique de FGF21 est dépendante de la signalisation hépatique de l'insuline, un modèle de souris diabétique n'exprimant plus le récepteur à l'insuline est généré (les souris LIRKO). Dans ce modèle d'étude, l'insuline ne régule plus le métabolisme du glucose et lipidique dans le foie. Le FGF21 lui ne régule plus le métabolisme lipidique hépatique grâce à l'oxydation des acides gras. Cependant, l'absence de signalisation hépatique de l'insuline n'a pas de répercussion sur les actions de FGF21 sur les muscles, et les TA, et donc sur le métabolisme du glucose. Figure issue de l'article d'Emanuelli & al. de 2014<sup>134</sup>.

Malgré toutes ces découvertes, l'effet direct *in vivo* du FGF21 sur le métabolisme hépatique est remis en cause. Premièrement, parce que FGFR1 est peu exprimé par les hépatocytes, contrairement à FGFR4, l'isoforme hépatique majoritaire, qui même associé à KLB n'est pas activé par FGF21<sup>85,135</sup>. Par conséquent, il est émis l'hypothèse que FGF21 aurait une action antagoniste à celle de FGF15/19 sur le complexe FGFR4/KLB dans le foie, en augmentant le pool d'acide biliaires<sup>136</sup>. Deuxièmement, d'autres études montrent que FGF21 peut avoir des effets indirects sur le foie *via* son action hypothalamique (cf. : III.4.1)<sup>137,138</sup>.

Outre ses actions sur le foie et les TA, FGF21 est aussi capable d'agir sur le pancréas, afin de réguler le métabolisme glucidique et lipidique, car ses récepteurs sont exprimés par les acini et les îlots de Langerhans<sup>139,140</sup>. Or, une exposition à une forte concentration de glucose, réduit l'expression de KLB et de PPAR $\gamma$  dans les îlots pancréatiques provenant de souris db/db<sup>140</sup>. Ces résultats suggèrent donc que dans le cas du DT2, l'hyperglycémie conduit à une résistance à FGF21, ce qui aggrave le dysfonctionnement des îlots de Langerhans pour réguler le métabolisme du glucose.

D'autre part, il a été mis en évidence que le pancréas exocrine exprime et sécrète du FGF21. Celui-ci n'agit pas de manière endocrine, mais de manière autocrine et paracrine. Il est d'ailleurs considéré comme un sécrétagogue post-prandial du pancréas exocrine, bien qu'il n'induisse pas la synthèse protéique comme la CCK (*cholecystokinine*)<sup>141</sup>. En effet, FGF21 va interagir avec FGFR1 et KLB, afin d'activer PLC $\gamma$  puis IP<sub>3</sub>R, ce qui induit une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup>, et permet la sécrétion des enzymes digestives contenues dans les granules de zymogène<sup>141</sup>. Il limite ainsi l'accumulation des granules, comme le ferait la CCK, pour éviter un stress protéotoxique (*Figure 13 : le FGF21, un sécrétagogue post-prandial du pancréas exocrine*).

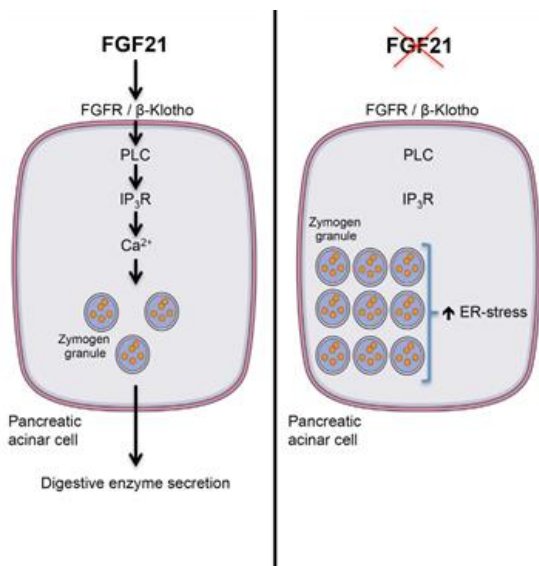


Figure 13 : le FGF21, un sécrétagogue post-prandial du pancréas exocrine.

Le FGF21 produit par le pancréas exocrine agit de manière autocrine et paracrine sur les acini, en interagissant avec FGFR1 et KLB, afin d'activer PLCγ puis IP<sub>3</sub>R. Ce qui induit une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup>, et permet la sécrétion des enzymes digestives contenues dans les granules de zymogène. Il limite ainsi l'accumulation des granules, comme le ferait la cholécystokinine, pour éviter un stress protéotoxique. Figure issue de l'article de Coate & al de 2017<sup>141</sup>.

PLC (*phospholipase C*), IP<sub>3</sub>R (*inositol triphosphate receptor*), Ca<sup>2+</sup> (ion calcium), ER stress (stress du réticulum endoplasmique)

Par ailleurs, le pancréas endocrine sécrète lui aussi du FGF21, mais en moindre mesure comparé au pancréas exocrine (vingt fois moins)<sup>139</sup>. L'action de FGF21 sur le pancréas endocrine est peu documentée actuellement. Cependant, il a été montré, sur des îlots de Langerhans isolés provenant de souris db/db, que son injection chronique pendant huit semaines favorise la production ainsi que la sécrétion d'insuline, et augmente le nombre d'îlot pancréatique<sup>142</sup>. En revanche, sur des îlots de Langerhans provenant de souris contrôles saines ou obèses diabétiques db/db, il n'induit ni la sécrétion d'insuline ni celle de glucagon<sup>140,143</sup>.

De manière générale, l'expression du FGF21 pancréatique (majoritairement exocrine) est réduite en condition de jeûne et augmentée en situation d'obésité<sup>139</sup>. Son action autocrine et paracrine, sur les acini et les îlots de Langerhans, conduit à la phosphorylation de ERK1/2 et Akt<sup>139,142</sup>. Les souris KO-FGF21 nourries avec un régime HF (pendant seize semaines) ont des îlots de Langerhans hyperplasiques et développent une inflammation lymphocytaire périductale<sup>139</sup>. Au contraire, quand des îlots de rat ou des cellules INS-1E sont traités avec du FGF21, cela protège de la glucolipotoxicité. De plus, l'activation de la voie Akt diminue l'apoptose induite par les cytokines pro-inflammatoires. Collectivement, ces résultats indiquent des fonctions protectrices du FGF21 *via* la préservation des fonctions pancréatiques et la survie des cellules bêta. Ces fonctions sembleraient contribuer aux effets bénéfiques de cette hormone sur le métabolisme du glucose observés chez les animaux diabétiques et obèses.

L'ensemble de ces découvertes chez la souris ont incité les sociétés pharmaceutiques à développer chez l'Homme de nouvelles thérapies basées sur l'élaboration d'analogues à FGF21. Je citerai deux exemples : LY2405319 et PF-05231023. Le premier est une molécule de FGF21 humaine stabilisée par la création d'un pont-disulfure, la délétion de quatre acides aminés en N-terminale et par l'élimination d'un site de O-glycosylation. PF-05231023 résulte de la combinaison de deux molécules de FGF21 humaines avec un fragment Fab d'anticorps monoclonal.

LY2405319 a été testé chez des patients DT2, lors d'un essai clinique réalisé en double aveugle<sup>144</sup>. Au bout de quatre semaines de traitement, les concentrations plasmatiques de triglycérides, de LDL-cholestérol sont réduites, tandis que celles de HDL-cholestérol et d'adiponectine sont augmentées. Cependant, il n'y a pas d'effets sur la glycémie.

PF-05231023 a lui aussi été testé chez des patients diabétiques, lors d'un essai clinique de phase 1b<sup>145</sup>. Après quatre semaines, les patients présentent une amélioration des taux de lipides plasmatiques, une augmentation de la concentration d'adiponectine et une diminution du poids corporel. Cependant, des effets indésirables ont été observés au niveau osseux et la glycémie n'a pas été abaissée. De plus, les diarrhées et les nausées relevées chez les patients expliquent probablement la perte de poids et justifient que cet effet n'a pas été retrouvé dans une autre étude<sup>146</sup>.

Ces deux études sur des cohortes humaines diabétiques reflètent les effets bénéfiques du FGF21 sur le métabolisme des lipides observés chez la souris. En revanche, ce n'est pas le cas pour le métabolisme du glucose. Cela peut être justifié par le fait que contrairement aux études chez les rongeurs ce n'est pas la molécule biologique qui a été délivrée. Par conséquent, le doute subsiste si les effets des analogues reproduisent ceux de la protéine sauvage. Cependant, au vu des nombreux effets bénéfiques des analogues à FGF21 chez l'Homme, notamment sur l'augmentation des concentrations plasmatiques de l'adiponectine une hormone insulino-sensibilisatrice, les recherches se poursuivent.

## **2.2. Implication de FGF21 dans la production de l'adiponectine**

Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  régule une multitude de gènes notamment celui de l'adiponectine<sup>147</sup>. Par conséquent, des études ont été menées, afin d'identifier l'impact de FGF21 sur l'expression de l'adiponectine. Cette dernière est une hormone insulino-sensibilisatrice et anti-diabétogène produite par le TA de manière inversement proportionnelle

à la masse de ce tissu. Elle peut être sécrétée conjointement sous trois formes : trimérique (*low molecular weight* (LMW)), hexamérique (*medium-molecular weight* (MMW)) et oligomérique (*high molecular weight* (HMW)). La forme HMW est considérée comme biologiquement active. Une fois sécrétée elle agit, *via* ses récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 (*adiponectin receptor 1* et *adiponectin receptor 2*), sur les organes impliqués dans le métabolisme énergétique, afin d'augmenter leur sensibilité à l'insuline. Ainsi, lorsqu'elle est surexprimée, elle diminue l'intolérance au glucose, la résistance à l'insuline, l'hypertriglycéridémie et l'inflammation chronique, ce qui se manifeste par une suppression de la synthèse de TNF $\alpha$ , la stimulation de celle d'IL-10, et par la polarisation des macrophages vers le phénotype anti-inflammatoire M2 dans le TA blanc<sup>148,149</sup>. Il est remarquable que l'adiponectine a des actions similaires à celles de FGF21<sup>150</sup>. Mais en situation d'obésité, chez des souris obèses DIO ou ob/ob ou même chez l'homme, FGF21 est retrouvé à des taux plasmatiques très élevés tandis que l'adiponectine est retrouvée à des taux extrêmement bas<sup>108,112,113,151,152</sup>.

Cette discordance suggère que le FGF21 pourrait moduler l'expression de l'adiponectine. Cette hypothèse a été vérifiée *in vitro* sur des cultures d'adipocytes (des cellules 3T3-L1 ou des cultures primaires d'adipocytes murins), où le traitement par FGF21 induit une augmentation de l'expression génique de l'adiponectine ainsi que de sa sécrétion dans le milieu de culture<sup>112,113,153</sup>. Cela a été confirmé *in vivo*, en condition physiologique, après quatre semaines de traitement avec du rFGF21, les taux sériques d'adiponectine des souris passent de 15 à 30  $\mu\text{g/mL}$ , avec des concentrations sériques accentuées des formes HMW et MMW<sup>112,154</sup> (*Figure 14 : Le FGF21 favorise l'expression et la sécrétion de l'adiponectine dans les adipocytes, grâce à PPAR $\gamma$* ). Cette augmentation est discutée dans l'étude de BonDurant & al.<sup>114</sup> qui ne montre pas chez les souris *wild type* cette induction d'adiponectine par FGF21. Cela peut s'expliquer par des conditions expérimentales différentes (*Tableau 3 : Discussion de la dépendance à l'adiponectine des effets bénéfiques de FGF21*).

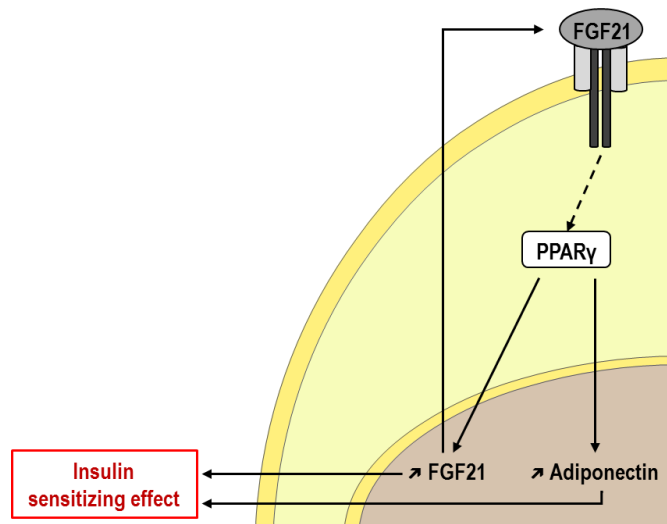


Figure 14 : Le FGF21 favorise l'expression et la sécrétion de l'adiponectine dans les adipocytes, grâce à PPAR $\gamma$ .

Dans les adipocytes, FGF21 (hépatique) interagit avec ses récepteurs FGFR1 et  $\beta$ Klotho, afin d'activer PPAR $\gamma$ , grâce à un intermédiaire encore inconnu à ce jour. Le PPAR $\gamma$  passe dans le noyau, afin d'induire la transcription des gènes *Fgf21* et de l'adiponectine en se fixant sur les régions PPRE, ce qui augmente *in fine* la production de FGF21 et d'adiponectine par les adipocytes. Le FGF21 agit alors de manière paracrine, afin d'entretenir cette boucle de régulation positive, tandis que l'adiponectine sécrétée exerce, de manière endocrine et paracrine, ses actions insulino-sensibilisatrices sur le foie, les muscles et le TA. Figure fortement inspirée de celle de l'article de Hui & al. de 2016<sup>108</sup>.

PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), PPRE (*peroxisome proliferator response element*)

Etude	Lin & al., 2013	Holland & al., 2013	BonDurant & al., 2017
Âge des souris DIO au moment du traitement avec le FGF21	Souris <i>wild type</i> ou ADNKO 8 semaines	Souris <i>wild type</i> ou ADNKO 14-16 semaines	Souris <i>wild type</i> ou ADNKO 16-18 semaines
Apport énergétique provenant des lipides (%) et le temps du régime HF avant le traitement FGF21	45% 4 semaines	60% 6 semaines	60% 12 semaines
Traitement FGF21	<i>mouse</i> rFGF21 ; pompe sous-cutanée 0.5 mg/kg/day	<i>mouse</i> rFGF21 ; pompe sous-cutanée 0.3 mg/kg/day	<i>human</i> rFGF21 ; injection i.p. 1 mg/kg/day pour 3 semaines

	pour 4 semaines	pour 2 semaines	
Amélioration de l'hypertriglycéridémie	Effet adiponectine dépendant	Effet adiponectine indépendant	Effet adiponectine indépendant
Amélioration de la sensibilité à l'insuline	Effet adiponectine dépendant	Effet adiponectine dépendant	Effet adiponectine indépendant

*Tableau 3 : Discussion de la dépendance à l'adiponectine des effets bénéfiques de FGF21.*

Ces trois études divergent concernant le rôle de l'adiponectine, dans l'amélioration du taux de triglycérides circulants et de la sensibilité à l'insuline, à la suite d'un traitement avec du FGF21. Différents facteurs peuvent expliquer ces divergences : l'âge des groupes de souris, le pourcentage de l'apport énergétique fourni par les lipides du régime HF, la durée du régime HF, la durée et la dose du traitement FGF21. En comparant les conclusions de ces études et en les rapportant aux conditions expérimentales, il est remarquable que l'amélioration de l'hypertriglycéridémie et de la sensibilité à l'insuline sont dépendantes de l'adiponectine, quand les perturbations métaboliques sont induites par un régime HF de courte durée, peu enrichi en lipides et avec une dose de FGF21 importante et longue. Cependant, elles ne le sont plus avec un régime long et fortement enrichi en lipides, malgré l'augmentation de la dose de FGF21. Ainsi, nous supposons que l'action de FGF21 est dépendante de l'adiponectine lors de l'initiation des perturbations métaboliques. En revanche, lorsque ces perturbations sont prolongées dans le temps, les actions bénéfiques de FGF21 deviennent indépendantes de l'adiponectine.

ADNKO (KO-adiponectine dans les adipocytes), DIO (*diet induced obesity*)

En revanche, une autre étude montre que FGF21 stimule de manière autocrine l'expression, la synthèse et la sécrétion d'adiponectine par les adipocytes et ce *via* PPAR $\gamma$  et mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*)<sup>153</sup>. L'implication de ces médiateurs a été mise en évidence sur des cultures d'adipocytes 3T3-L1 traitées par des antagonistes, GW9662 pour PPAR $\gamma$ <sup>112</sup> et la rapamycine pour mTORC1<sup>153</sup>. Pour activer mTORC1, FGF21 interagit avec FGFR1/KLB déclenchant la voie MAPK. A son tour, mTORC1 active S6k (*S6 kinase*), afin de stimuler la sécrétion d'adiponectine, celle de FGF21, mais aussi pour favoriser le *browning* et l'absorption de glucose par les adipocytes<sup>153</sup>. L'implication de mTORC1 par FGF21 sans aucun effet indésirable sur la signalisation de l'insuline est surprenante car habituellement elle est plutôt associée à des phénomènes de résistance hormonale.

Comme l'ont donc établi les études de 2013 de Holland & al<sup>113</sup> et Lin & al<sup>112</sup>, l'adiponectine est un effecteur en aval du FGF21. Toutefois, tous les effets de FGF21 ne passent pas

obligatoirement par l'adiponectine. Par exemple, lorsque l'adiponectine n'est plus exprimée spécifiquement dans le TA de souris obèses DIO KO-adiponectine (ADNKO)<sup>112-114</sup>. Le traitement chronique par rFGF21 est toujours capable de réduire le taux de cholestérol total circulant ainsi que le poids corporel, la masse grasse et d'augmenter partiellement les dépenses énergétiques et le taux circulant de FGF21. Cependant, l'adiponectine est nécessaire à l'atténuation de l'hyperglycémie, de l'hypertriglycéridémie, de l'accumulation de céramides (circulants et hépatiques), de l'inflammation et de la résistance à l'insuline. Or, la nécessité de l'adiponectine dans l'amélioration de l'hypertriglycéridémie et de la sensibilité à l'insuline est remise en cause en fonction du pourcentage lipidique des régimes HF et du type de traitement rFGF21<sup>114</sup> (*Tableau 3 : Discussion de la dépendance à l'adiponectine des effets bénéfiques de FGF21*).

Malgré ces divergences, les effets métaboliques bénéfiques du FGF21, dépendants ou indépendants, de l'adiponectine contribuent à limiter le développement de l'athérosclérose et de la stéatohépatite non alcoolique (NASH). Par exemple, l'étude sur des souris déficientes en apolipoprotéine E (les souris ApoE<sup>-/-</sup>) montre que la carence en FGF21 accélère la formation de plaques d'athérosclérose et provoque la mort prématurée des animaux<sup>152</sup>. Cela s'accompagne d'une hypo-adiponectinémie, d'une hyperlipidémie, d'une inflammation chronique, d'une prolifération des muscles lisses et d'une augmentation de la biosynthèse hépatique du cholestérol. En revanche, le traitement avec rFGF21 des souris KO-FGF21 ApoE<sup>-/-</sup>, corrige l'ensemble de ces effets délétères alors que l'adiponectine ne les corrige que partiellement. En effet, l'adiponectine diminue plus faiblement la formation des plaques et n'a aucun effet sur la biosynthèse hépatique et les niveaux circulants de cholestérol (niveau de cholestérol total circulant après traitement avec l'adiponectine 1500mg/dL, après le traitement avec le FGF21 800mg/dL). Cette étude<sup>152</sup> corrobore celles précédemment menées sur les souris obèses, et confirme que les effets insulino-sensibilisateurs de FGF21 dépendent de l'adiponectine à l'exception du métabolisme du cholestérol<sup>112-114</sup>. En effet, pour combattre l'athérosclérose, FGF21 interagit dans le foie avec FGFR2/KLB pour inhiber la Srebp-2 (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2*) et par conséquent la biosynthèse du cholestérol.

### **3. Inflammation et FGF21**

Diverses maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète, la NASH et l'athérosclérose s'accompagnent d'une inflammation chronique généralisée. Cette inflammation n'est pas

déclenchée à la suite d'une infection par un agent pathogène et elle n'est pas accompagnée de fièvre. Les études actuelles s'accordent à dire que l'inflammation est initialement aiguë à la suite à d'une perturbation transitoire<sup>155-157</sup>. Mais lorsqu'elle s'installe de façon chronique l'inflammation devient délétère pour l'organisme. Elle est alors qualifiée d'inflammation de bas grade. Dans cette sous-partie, je décris tout d'abord ce type d'inflammation en situation d'obésité ; j'explique ensuite le rôle anti-inflammatoire périphérique de FGF21.

### **3.1. Lien entre obésité et inflammation chronique**

L'inflammation survient naturellement dans les tissus vivants vascularisés à la suite d'une exposition à des stimuli nocifs (des agents pathogènes, la surexposition à des produits chimiques ...). Elle vise à éliminer l'agent nocif et à réparer les lésions tissulaires causées<sup>156</sup>.

La réaction inflammatoire peut être de deux types : aiguë ou chronique. L'inflammation aiguë est physiologique, elle fait partie intégrante de notre système immunitaire inné. C'est une réponse immédiate après l'intrusion d'un stimulus nocif. De plus, elle est courte (elle dure 48 heures maximum), transitoire et guérit spontanément ou avec un traitement. Or, lorsqu'elle persiste dans le temps elle devient délétère pour l'organisme, dans ce cas il s'agit d'une inflammation chronique. Ce deuxième type d'inflammation est pathologique car il n'est pas voué à guérir spontanément<sup>155,156</sup>, au contraire, il persiste et s'aggrave au fil du temps (pendant des mois, voire des années). Lorsque ce processus est sous-jacent, c'est-à-dire quand aucunes douleurs, rougeurs ou augmentation de la température corporelle ne sont constatées, l'inflammation chronique est alors qualifiée de bas grade, comme c'est le cas en situation d'obésité. Chez les personnes obèses il est noté des taux sériques élevés de facteurs pro-inflammatoires tels que TNF $\alpha$ , MCP1, IL-6, résistine et ce de manière chronique, associés à une diminution persistante de facteurs anti-inflammatoires tels qu'IL-10 et l'adiponectine.

La réponse inflammatoire liée à l'obésité est initiée par l'hyperplasie du TA<sup>155,158,159</sup>. Ce tissu qui a longtemps été considéré comme un simple tissu de stockage de glucose sous forme de triglycéride, s'est révélé beaucoup plus complexe. D'une part, il est capable de sécréter des acides gras ainsi que des polypeptides (des hormones, des cytokines, des chimiokines) agissant de manière endocrine ou paracrine. De plus, c'est un tissu hétérogène. En effet, il se compose principalement d'adipocytes, mais aussi de pré-adipocytes, de macrophages, de lymphocytes et de cellules endothéliales. Les adipocytes sécrètent des adipokines (la leptine, la résistine,



l'adiponectine) qui régulent la sensibilité à l'insuline, tandis que les cellules immunitaires (les lymphocytes et les macrophages) génèrent une réponse inflammatoire<sup>158,159</sup>.

### 3.1.1. Mécanismes d'infiltration du TA par les macrophages

L'inflammation de bas grade est une composante majeure de la résistance à l'insuline associée à l'obésité. Elle est générée principalement par l'infiltration et l'activation des macrophages dans le TA murins ou humains. Les macrophages dérivés de la moelle osseuse, présents dans le TA, sont activés par la détection de facteurs inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , FFA saturés) libérés par les adipocytes hypertrophiques<sup>160,161</sup>. Ils vont alors sécréter des chimiokines (MCP-1), afin de recruter des macrophages circulants de manière proportionnelle à l'hypertrophie du TA, y entretenant ainsi une inflammation chronique<sup>160,161</sup>. Par exemple, chez des souris ou des humains minces, les macrophages représentent 10% du contenu cellulaire du TA, contre 40% en situation d'obésité<sup>162</sup>. Parallèlement à cette sécrétion de chimiokines, les macrophages activés vont libérer des cytokines pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6). Par leur action paracrine, les cytokines activent des voies pro-inflammatoires, afin de diminuer la sensibilité à l'insuline des adipocytes se trouvant à proximité. Le but est de stopper l'entrée de glucose dans les adipocytes et de limiter ainsi l'hyperplasie du TA<sup>163</sup>. Au niveau systémique les cytokines altèrent également la sensibilité à l'insuline des organes tels que le foie, les muscles *via* leurs actions endocrines (*Figure 15 : Mécanismes régulant la polarité des macrophages et la résistance à l'insuline dans le TA*).

De plus, il a été mis en évidence que l'accumulation de lymphocytes dans la fraction stromale-vasculaire du TA interviendrait dans le recrutement des macrophages et favoriserait leur état pro-inflammatoire, accentuant ainsi la résistance à l'insuline du TA<sup>164</sup>.

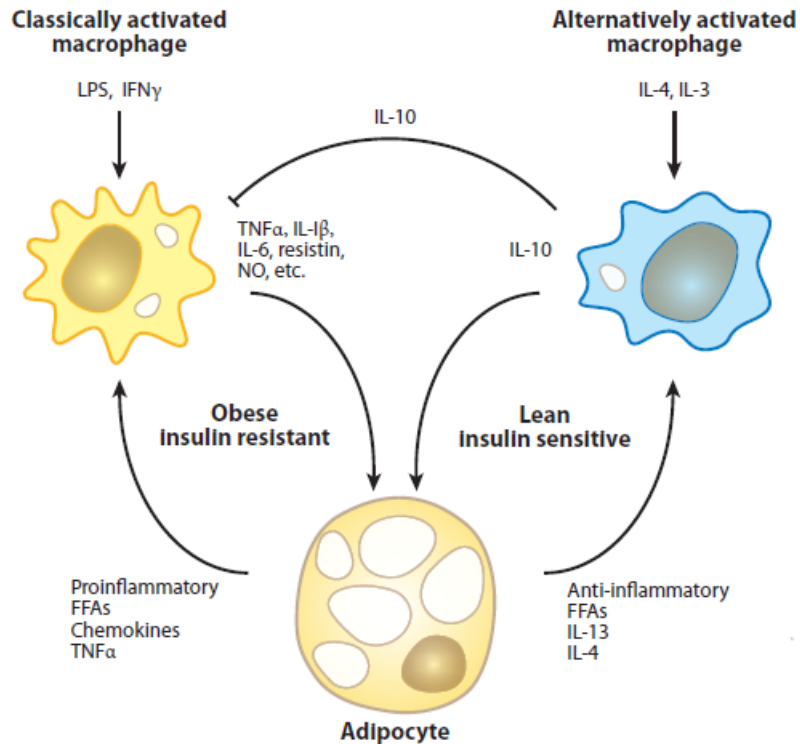


Figure 15 : Mécanismes régulant la polarité des macrophages et la résistance à l'insuline dans le TA.

Les adipocytes, d'animaux minces sensibles à l'insuline, sécrètent des facteurs (comme IL-13, IL-4, FFA et des éléments anti-inflammatoires) qui favorisent transitoirement l'activation des macrophages résidents du TA. Ces derniers, également activés par IL-3 et IL-4 circulants, sécrètent alors IL-10 (cytokine anti-inflammatoire) et des facteurs de sensibilisation à l'insuline, afin d'inhiber l'activation des macrophages du TA et de maintenir la sensibilité des adipocytes à l'insuline. Or, en situation d'obésité, les adipocytes hyperplasiques montrent une perturbation de leur expression génique, entraînant une augmentation de la lipolyse, de la libération de FFA pro-inflammatoires, de chimiokines (MCP-1) et de TNF $\alpha$ . Ces facteurs, ainsi que le LPS et l'IFN $\gamma$ , activent les macrophages M1 du TA, qui produisent alors de grandes quantités de facteurs pro-inflammatoires (tels que TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , la résistine). Ces facteurs induisent l'insulino-résistance du TA, en agissant sur les adipocytes, car ils entretiennent ainsi une boucle de rétroaction positive, amplifiant l'inflammation et la résistance à l'insuline. Figure issue de la revue de Olefsky & Glass. de 2010<sup>155</sup>.

IL-3 (*interleukin-3*), IL-4 (*interleukin-4*), IL-6 (*interleukin-6*), IL-13 (*interleukin-13*), IL-10 (*interleukin-10*), IL-1 $\beta$  (*interleukin-1 $\beta$* ), FFA (*free fatty acid*), NO (*nitric oxide*), MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*), TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor  $\alpha$* ), LPS (*lipopolysaccharide*), IFN $\gamma$  (*interferon gamma*)

### 3.1.2. Activation du phénotype pro-inflammatoire des ATM

Les macrophages du TA ne constituent pas une population homogène concernant leur état d'activation. Deux types au minimum existent, les M1 pro-inflammatoires et M2 comprenant une population de macrophages anti-inflammatoires activés transitoirement<sup>157</sup>. Au cours de l'apparition de l'obésité, les macrophages recrutés sont de type M1 avec une expression accrue de gènes importants pour la migration, l'adhésion (ils sont positifs pour : F4/80 (*EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*), CD11b (*cluster of differentiation 1b*), CD11c (*cluster of differentiation 1c*)) et l'inflammation des macrophages<sup>165,166</sup>. Ils sont très réactifs aux chimiokines et aux cytokines pro-inflammatoires<sup>166</sup>. Tandis que, ceux résidants dans le TA ont d'avantage le profil M2. Ils expriment les protéines de surface F4/80 et CD11b, ils sont peu sensibles aux signaux d'activation et libèrent la cytokine anti-inflammatoire, IL-10<sup>157,166,167</sup>.

En cas d'obésité, les macrophages de type M1 s'accumulent dans le TA, leur nombre y dépassant celui des M2. Ce déséquilibre favorise l'inflammation. Ce processus résulte pour partie du recrutement des macrophages M1 et pour partie de la polarisation des macrophages d'un état d'activation M2 alternatif vers un état d'activation M1. Cette transition peut être induite par plusieurs voies de signalisation. La première est celle des TLR<sup>157,166</sup>, car de fortes concentrations d'acides gras saturés libérés par les adipocytes hypertrophiques ou le LPS (*bactériale lipopolysaccharide*) peuvent interagir avec TLR4<sup>155</sup>. Cela peut induire, soit la voie TRAM dépendante, activant IRF3 (*interferon-regulator factor 3*) par phosphorylation pour former l'homodimère p-IRF3 se fixant sur les motifs ISRE (*interferon-stimulated response element*), soit la voie MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) dépendante, pour activer IKK (*IκB kinase*).

Deuxièmement IL-6, IL-1β et TNFα libérés par les adipocytes hyperplasiques passent aussi par la voie IKK<sup>155</sup>. IKK dissocie NF-κB (composé des sous-unités p50 et p65) de son inhibiteur cytoplasmique IκB. Ce dernier sera ubiquitiné et dégradé, tandis que NF-κB sera transloqué dans le noyau, afin d'induire la transcription de gènes pro-inflammatoires cibles. Par ailleurs, ces cytokines activent la kinase JNK, qui phosphoryle l'extrémité N-terminale de c-Jun sur les gènes cibles, permettant ainsi un échange de dimères c-Jun par des hétérodimères c-Jun/c-Fos et sa fixation à ses éléments de réponse d'ADN apparentés (AP-1 (*Activator protein 1*))<sup>155,166</sup>. L'ensemble de ces voies conduisent à l'activation des gènes des voies pro-inflammatoires

(Figure 16 : Les voies de signalisation pro-inflammatoires conduisant à l'activation des macrophages M1 et à l'insulino-résistance.). De plus, les macrophages activés M1 favorisant ces voies participent à la mise en place de l'insulino-résistance au sein du TA, car les différentes serines kinases (JNK, IKK) utilisées peuvent interférer avec les voies de signalisation de l'insuline<sup>155</sup>. En effet, les phosphorylations sur les sérines des protéines IRS ou du récepteur à l'insuline sont inhibitrices. Elles empêchent la transduction correcte du signal médié par l'hormone créant une insulino-résistance.

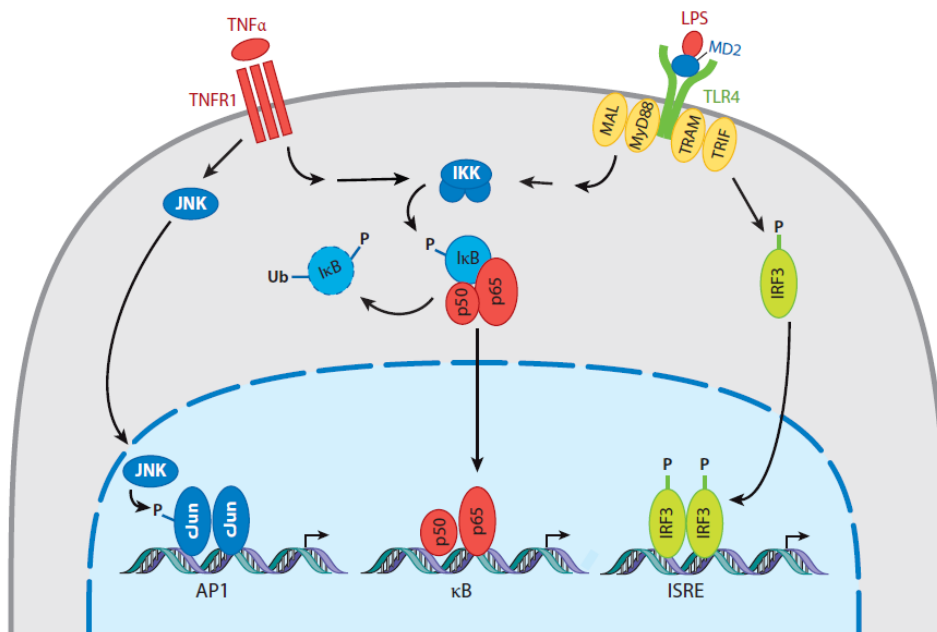


Figure 16 : Les voies de signalisation pro-inflammatoires conduisant à l'activation des macrophages M1 et à l'insulino-résistance.

Le TNFα en se fixant sur son récepteur TNFR1 active JNK, qui phosphoryle c-Jun pour qu'il puisse se fixer sur AP1. De plus, il partage l'activation de NF-κB (composé des sous unités p50 et p65) avec la voie de signalisation TLR4 MyD88 dépendante. Le LPS ou des fortes concentrations d'acides gras libres activent conjointement la voie TLR4 MyD88 indépendante, afin de phosphoryler IRF3, qui dans le noyau se fixe sur les séquences ISRE. Toutes ces voies de signalisation conduisent à l'expression de facteurs pro-inflammatoires, favorisant l'inflammation, l'activation des macrophages M1 et l'insulino-résistance. Figure issue de la revue de Olefsky & Glass. de 2010<sup>155</sup>.

TNFα (*tumor necrosis factor alpha*), TNFR1 (*tumor necrosis factor receptor 1*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), AP1 (*activator protein 1*), IKK (*IκB kinase*), TLR4 (*toll-like receptors 4*), MyD88 (*myeloid differentiation primary response 88*), LPS (*lipopolysaccharide*), TRAM (*toll receptor-associated molecule*), TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*), IRF3 (*interferon regulatory factor 3*), ISRE (*interferon sequence response element*), MD2 (*myeloid differentiation protein-2*)

Divers systèmes permettent de contrebalancer l'activation des macrophages M1 pro-inflammatoires. Tout d'abord, dans une situation physiologique, les gènes qui sont activés par les inducteurs d'activation M1 (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) ont des niveaux d'expression basaux très faibles et sont maintenus dans une balance entre répression et activation. En effet, ces gènes sont réprimés fortement par des complexes de corépresseurs<sup>155</sup>, notamment par le complexe formé de NCoR (*nuclear receptor corepressor*), TBL1 (*transducin  $\beta$ -like protein 1*) et TBLR1 (*transducin  $\beta$ -like protein 1-related protein*)<sup>168,169</sup>. NCoR est recruté par des formes non phosphorylées de c-Jun, afin de réprimer l'expression des gènes pro-inflammatoires dans les macrophages. Cependant, cette répression peut être levée rapidement, afin d'induire une réponse immunitaire innée pour répondre à un stimulus nocif. Pour lever la répression exercée par NCoR, l'Ubch5 (*ubiquitin conjugating enzyme 5*), en réponse aux signaux inflammatoires, interagit avec TBL1 and TBLR1, afin d'ubiquitiner le complexe NCoR pour qu'il soit dégradé par le protéasome et permette la transcription des gènes pro-inflammatoires (*Figure 17 : Complexe de corépresseurs qui régule négativement l'activation des macrophages M1*). De plus, des rétrocontrôles négatifs permettent normalement de rendre l'activation des macrophages M1 anatomiquement localisée et limitée. Par exemple, après l'activation de TLR4, le gène I $\kappa$ B $\alpha$  est induit pour reformer un complexe avec NF- $\kappa$ B et l'inhiber<sup>170</sup>. De plus, les macrophages activés M2 sécrètent la cytokine anti-inflammatoire IL-10, notamment à la suite de l'action de l'adiponectine qui parallèlement peut supprimer la réponse des macrophages M1 au LPS<sup>148,155,157,165,167</sup>.

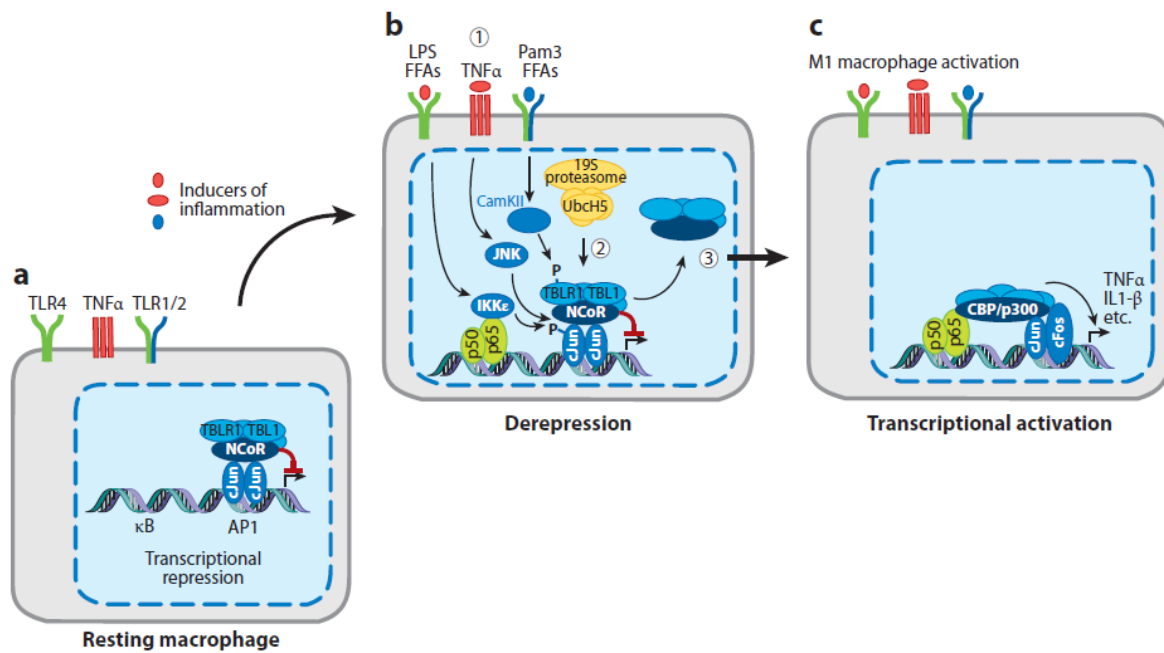


Figure 17 : Complexe de corépresseurs qui régule négativement l'activation des macrophages M1.

(a) Au repos ou dans des conditions activées alternatives, l'expression génique de facteurs pro-inflammatoires est réprimée par le complexe de corépresseurs NCoR-TBL1-TBL1-cJUN, dans les macrophages. (b) En réponse aux médiateurs pro-inflammatoires, des composants du complexe sont phosphorylés. (1) La phosphorylation de c-Jun est induite par TNF $\alpha$  grâce à JNK et par les agonistes de TLR4 grâce à IKK $\epsilon$ . De plus, les agonistes du TLR2 phosphorylent TBL1 grâce à la CamKII. (2) Ces événements entraînent l'ubiquitination du complexe par UbcH5, (3) et sa dégradation par le protéasome. (c) Des activateurs et des coactivateurs sont recrutés, entraînant une activation transcriptionnelle des facteurs pro-inflammatoires. Figure issue de la revue de Olefsky & Glass. de 2010<sup>155</sup>.

TLR4 (*toll-like receptors 4*), TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*), TLR1/2 (*toll-like receptors 1/2*), JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), AP1 (*activator protein 1*), LPS (*lipopolysaccharide*), NCoR (*nuclear receptor corepressor*), TBL1 (*transducin  $\beta$ -like protein 1-related protein*), TBL1 (*transducin  $\beta$ -like protein 1*), CamKII (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase II*), UbcH5 (*ubiquitin conjugating enzyme 5*), CBP/p300 (*CREB-binding protein/p300*), IL-1 $\beta$  (*interleukin-1 $\beta$* ), FFA (*free fatty acid*)

Les macrophages M2 activés jouent donc un rôle déterminant dans l'inflammation puisqu'ils exercent une action antagoniste à celle des macrophages M1. Leur activation résulte de l'interaction d'IL-4 et d'IL-13 avec leur récepteur commun hétérodimérique, induisant ainsi la phosphorylation de la tyrosine et la dimérisation de STAT6 (*signal transducer and activator of transcription 6*). Ce dimère transloque alors dans le noyau pour transcrire les gènes PPAR $\gamma$  et

PPAR $\delta$ . De plus, les PPAR et STAT6 utilisent PGC1 $\beta$  (*peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$* ), afin de maintenir le complexe NCoR et l'expression de régulateur métaboliques favorisant le stade d'activation M2 et anti-inflammatoire<sup>167,171-174</sup>. Le rôle anti-inflammatoire crucial de PPAR $\gamma$  a été étudié grâce aux souris KO-PPAR $\gamma$  dans les macrophages<sup>175</sup>. Ces animaux sous régime contrôle montrent une inflammation importante, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline. De plus, sous régime HF tous ces désordres sont accentués. Cela démontre bien l'importance des rétrocontrôles négatifs, afin de limiter l'inflammation au sein du TA.

Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent qu'un équilibre est requis entre la présence des macrophages M2 activés alternativement et des M1 pro-inflammatoires, afin de maintenir une réponse inflammatoire cohérente et aiguë. Or, en situation d'obésité, cet équilibre est complètement déséquilibré, amplifiant la réponse inflammatoire et l'insulino-résistance malgré les systèmes précédemment mis en place. C'est pour cela que certaines études ont cherché à savoir si les effets insulino-sensibilisateurs de FGF21 passaient par une action anti-inflammatoire, notamment dans le TA.

### **3.2. Actions anti-inflammatoires périphériques de FGF21**

L'amélioration des profils inflammatoires à la suite d'un traitement par du FGF21 sur des animaux obèses, diabétiques<sup>176</sup> ou atteints de NASH (stéatohépatite non alcoolique)<sup>177</sup> sont justifiés par l'amélioration des paramètres métaboliques (glucidique et lipidique). Cependant, lors d'une réponse inflammatoire aiguë induite par du LPS chez des souris C57BL/6 *wild type* les niveaux sériques de FGF21 sont doublés<sup>178</sup>. Cette augmentation serait due à la sécrétion du FGF21 par le TA et les muscles. En effet dans ces conditions, ces tissus ont un niveau d'expression élevé de l'ARNm FGF21 mais pas de la protéine<sup>178</sup>. Cela est corroboré par l'absence d'augmentation du niveau d'expression hépatique de l'hormone. Ainsi, FGF21 serait susceptible d'exercer lui-même une action anti-inflammatoire. Pour étudier cette action, du FGF21 exogène a été administré à des souris traitées au LPS<sup>178,179</sup>. Cette administration améliore le profil inflammatoire des animaux, en diminuant les niveaux sériques de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 et en augmentant celui d'IL-10<sup>178,179</sup>. De plus, la diminution de la mortalité des souris *wild type* montre que le FGF21 réduit la toxicité du traitement LPS. Cet effet est d'autant plus important chez les souris femelles ob/ob<sup>178</sup>.

Les études *in vitro* mettent en évidence que les macrophages sont des cibles pour l'action anti-inflammatoire de FGF21. Des lignées cellulaires de monocytes/macrophages (THP-1 et RAW 264.7) ont été traitées avec du LPS et du FGF21 ou avec du LPS seul<sup>179,180</sup>. Les résultats montrent que le traitement FGF21 réduit l'expression génique et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 induites par le LPS, en inhibant l'activation de NF- $\kappa$ B. En effet, le FGF21 est capable d'inhiber la dégradation d'I $\kappa$ B et la translocation nucléaire de p65 de façon dose dépendante<sup>179,180</sup>. Parallèlement, pour corriger l'inflammation, le traitement par FGF21 augmente la production d'IL-10 par les monocytes/macrophages en activant la voie ERK1/2<sup>179,180</sup>.

Hormis ces cellules immunitaires, les adipocytes sont aussi une cible de l'action anti-inflammatoire de FGF21. Des adipocytes 3T3-L1 ont été surexposés pendant 24h à du TNF $\alpha$ , afin de mimer une situation d'insulino-résistance. Ensuite, un traitement FGF21 a été réalisé<sup>176</sup>. Il en résulte une inhibition de la voie NF- $\kappa$ B, induisant une diminution de l'expression d'IL-6 et de MCP-1. Cet effet anti-inflammatoire permet d'améliorer simultanément le métabolisme du glucose, en augmentant l'expression de GLUT1 dans les adipocytes insulino-résistants<sup>176</sup>. Toujours dans les adipocytes, une autre voie anti-inflammatoire indirecte, FGF21/adiponectine/IL-17A, a été identifiée par l'étude de Bao & al. de 2018<sup>177</sup> sur la NASH. Grâce à des co-cultures d'adipocytes 3T3-L1 différenciés avec des cellules T CD4+ naïves, celle-ci montrent que le traitement par un analogue à FGF21 (PsTag600-FGF21) augmente la sécrétion d'adiponectine, afin de supprimer la différenciation des lymphocytes Th17 et l'expression d'IL-17A (*interleukin-17A*) par ces derniers. Cela est corroboré *in vivo* par la réduction de l'inflammation (marqué par la diminution de l'expression des ARNm hépatiques de TNF $\alpha$ , d'IL-6, d'IL-1 $\beta$ , de F4/80 et de CD68) et de l'infiltration des cellules immunitaires intrahépatique (les cellules T CD3+ et les macrophages F4/80+) après le traitement avec PsTag600-FGF21<sup>177</sup>. Ainsi, FGF21 peut diminuer l'expression d'IL-17A indirectement par l'induction de l'adiponectine. Une autre étude montre que FGF21 inhibe la signalisation d'IL-17A en inhibant la voie TLR4/NF- $\kappa$ B hépatique (sur des cellules Th17, des cellules de Kupffer et des hépatocytes), afin de diminuer l'inflammation lors d'une NASH<sup>181</sup>.

Après avoir détaillé dans ce chapitre les actions insulino-sensibilisatrices et anti-inflammatoires périphériques de FGF21, je développerai dans le chapitre suivant ses différentes actions au niveau central.



## Chapitre III : Action centrale de FGF21

Ces dernières années, des études ont suggéré un rôle important du FGF21 sur le système nerveux central (SNC), notamment dans le contrôle de l'homéostasie énergétique ou dans le rétablissement de fonction cognitive. Dans ce chapitre, je vous présenterai différentes études relatant des rôles de FGF21 au niveau central. Tout d'abord, je décrirai l'expression centrale de FGF21 et de ses récepteurs, afin de déterminer ses sites de production et d'action potentiels au niveau cérébral. Ensuite, j'expliquerai le passage de la BHE par le FGF21 périphérique. Pour terminer, je détaillerai les effets neuroprotecteurs de FGF21 et les répercussions sur le système périphérique de ses actions centrales.

### 1. Expression centrale de FGF21 et de ses récepteurs

Il est commun de dire qu'une hormone ne peut agir sur un tissu que lorsque ses récepteurs sont présents. Nous pouvons alors supposer que si le récepteur FGFR1 et le corécepteur KLB sont exprimés conjointement par certaines structures cérébrales, celle-ci sont des sites d'action potentiels pour FGF21.

Plusieurs études ont montré que FGFR1 est exprimé de manière ubiquitaire dans le cerveau<sup>137</sup>. Il est notable que certaines structures ont cependant une expression de FGFR1 plus importante que d'autres. Par exemple, le cortex, l'hippocampe [dans les régions : DG (*dentate gyrus*), CA (*hippocampus proper*) et SVZ (*subventricular zone*)]<sup>182,183</sup>, le DVC (*dorsal-vagal complex*) [dans la zone *postrema*, le NTS (*nucleus tractus solitari*) et le NG (*nodose ganglion*)], le cervelet ainsi que l'hypothalamus [dans les noyaux SCN, PVN et ARC] expriment fortement FGFR1<sup>137,138,182-185</sup>. Par ailleurs, il est a été mis évidence que le profil d'expression de ce récepteur est différent en fonction de l'âge des animaux et des structures cérébrales étudiées (*Tableau 4 : Caractérisation du profil d'expression de l'ARNm FgfR1 dans le cerveau*)<sup>182</sup>. Par exemple, dans le cortex à 1 mois post-natal, FGFR1 est exprimé dans les astrocytes (GFAP+), les neurones (NeuN+ ; *hexaribonucleotide binding protein-3*) et les oligodendrocytes (OLIG2+ ; *oligodendrocyte transcription factor*). Alors qu'à 7 jours post-natal, il était aussi retrouvé dans les cellules souches BLBP (*brain lipid binding protein*) et SOX2 (*sex determining region Y-box 2*) positives. De plus, dans l'hypothalamus murin, FGFR1 est exprimé dans les tanycytes, les astrocytes et les cellules souches (SOX2+). En revanche, les études divergent concernant son expression dans les neurones et dans les oligodendrocytes<sup>185,186</sup>.

Time point	Area	<i>Fgfr1</i> expression in cell types					
		BLBP	GFAP	SOX2	DCX	NeuN	Olig2
P7	DG	++	++	NA	+++	+	
	CA		++	NA		++	
	SVZ	+++	+	NA			++
	Cortex	+++	++	NA		+	++
	Hypothalamus		++	NA			
1 month	DG		++	++	++		
	CA		+			+	
	SVZ		++	++			
	Cortex		++			+	+
	Hypothalamus		++	++			

**Notes.**  
NA, not analyzed.

*Tableau 4 : Caractérisation du profil d'expression de l'ARNm Fgfr1 dans le cerveau.*

Comparaison qualitative de l'expression de l'ARNm Fgfr1 à sept jours post-natals (P7) et à un mois post-natal, dans divers types cellulaires (cellules souches, les astrocytes, les neurones, les oligodendrocytes..) de différentes structures cérébrales. Tableau provenant de l'étude de Choubey & al. de 2016<sup>182</sup>.

DG (*dentate gyrus*), CA (*hippocampus proper*), SVZ (*subventricular zone*), BLBP (*brain lipid binding protein*), GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), SOX2 (*sex determining region Y-box 2*), DCX (*doublecortin*), NeuN (*hexaribonucleotide binding protein-3*), Olig2 (*Oligodendrocyte transcription factor*)

Puisque FGFR1 a une expression cérébrale ubiquitaire, la spécificité d'action de FGF21 est d'avantage déterminée par l'expression du corécepteur KLB. Effectivement, le profil d'expression de celui-ci est plus restreint et il s'exprime toujours à des niveaux plus faibles que FGFR1, comme dans le DVC dans les zones du NTS et du NG<sup>137,184</sup>. Par RTqPCR (*real-time quantitative polymerase chain reaction*), il a été montré que KLB était exprimé dans l'hypothalamus<sup>185</sup>. Par la suite, quatre régions hypothalamiques ont été spécifiées : l'ARC, le VMH, le PVN et le SCN, notamment grâce à l'utilisation d'un modèle de souris CRE-KLB<sup>137,138,187</sup>. Des analyses de scRNA-seq ont également été menées sur le même modèle de souris, et ont permis d'identifier douze clusters cellulaires hypothalamiques exprimant KLB. Il s'agit principalement des péricytes (42.6%), des tanocytes (16.4%), des oligodendrocytes<sup>186</sup> (3.1%) et des neurones (2.4%). Dans le VMH, les types de neurones exprimant KLB sont ceux glutamatergiques, GABAergiques et dopaminergiques<sup>187,188</sup>. Dans le PVN, les neurones à ocytocine, arginine, vasopressine et à CRH (*corticotropin-releasing hormone*), expriment eux aussi KLB<sup>124</sup>. De plus, les expressions neuronales de KLB et de FGFR1 sont confirmées dans les

lignées cellulaires, SHSY5Y (*human neuroblastoma cell line*) et mHYPO (*embryonic mouse hypothalamic cell line*)<sup>185,189</sup>.

Au vu des profils d'expression des récepteurs, FGF21 est donc susceptible d'agir au niveau cérébral et particulièrement au niveau hypothalamique. De plus, des études ont révélé une expression centrale de cette hormone dans l'hypothalamus<sup>185,190,191</sup>, le cervelet, l'hippocampe<sup>192</sup>, le cortex, le striatum et le SNcp (*substantia nigra pars compacta*)<sup>193</sup>. Il a aussi été montré que les expressions hypothalamiques du FGF21 et de ses récepteurs sont diminuées lors d'une surexposition à la résistine, mais augmentées chez des souris obèses DIO, alimentées pendant 12 semaines avec un régime HF (dont 60% de l'énergie est fournie par les lipides)<sup>185,191</sup>.

L'ensemble de ces travaux suggère qu'en plus de son action périphérique, le FGF21 pourrait traverser la barrière hématoencéphalique (BHE) et agir au niveau central pour exercer ces effets métaboliques *via* l'activation de ses récepteurs exprimés dans plusieurs régions du SNC.

## **2. FGF21 et la barrière hémato-encéphalique**

Dans cette sous partie, je commencerai par définir ce qu'est la BHE et son rôle en condition physiologique. Ensuite, je détaillerai l'action de FGF21 sur les cellules endothéliales microvasculaires de la BHE lors de perturbations métaboliques.

### **2.1. Description de la BHE en condition physiologique**

La BHE est une interface d'échange dynamique entre le microenvironnement neuronal et les capillaires sanguins. Son rôle est de contrôler l'élimination des substances toxiques produites par le cerveau dans la circulation sanguine et de capter les nutriments nécessaires au bon fonctionnement cérébral. La BHE est donc indispensable à l'homéostasie du système nerveux central.

L'hormone FGF21 a un faible niveau de liaison au *heparan sulfate*. Cette caractéristique biochimique lui permet d'être sécrétée dans la circulation sanguine et d'agir à distance de son site de production, sans être piégée dans la matrice extracellulaire. Par conséquent, cette hépatokine circulante pourrait agir au niveau cérébral si elle est capable de passer la BHE. Or Hsuchou & al. en 2007<sup>194</sup> ont montré que le FGF21 périphérique traverse la BHE par diffusion simple, de manière non saturable, avec un ratio d'influx cérébral de  $0.23 \pm 0.12 \mu\text{L/g.minutes}$  unidirectionnel. Un tel ratio est environ quatre fois supérieur à celui de l'albumine, mais

respectivement dix à vingt fois plus faible que celui de FGF21 dans le muscle et le foie. Quant à l'efflux cérébral de FGF21, il est indépendant d'un transporteur, non saturable et comparable à celui de l'albumine.

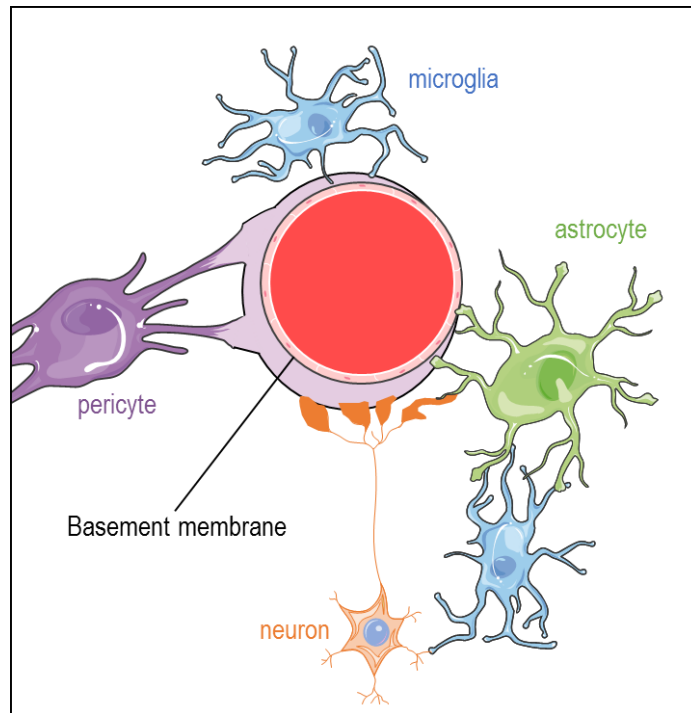
Dès lors, Hsuchou & al. 2007<sup>194</sup> affirment que le FGF21 périphérique peut atteindre directement le cerveau. Ils mesurent, qu'après dix minutes d'une injection intraveineuse de <sup>125</sup>I-FGF21 sur des souris CD1 mâles, 0.5% de <sup>125</sup>I-FGF21 est retrouvé dans un gramme de tissu cérébral. Sur la totalité du FGF21 exogène retrouvé dans le cerveau, 70% ont atteint le parenchyme cérébral. Il ne reste donc pas bloqué dans les microvascularisations composant la BHE. De plus, 75% du FGF21 est sous forme active contre 94% dans le sérum. Cependant, la forme fonctionnelle de FGF21 se dégrade rapidement, car après seulement vingt minutes, 43% du FGF21 dans le cerveau est sous cette forme contre 83% dans le sérum.

FGF21 passe donc la BHE, et est retrouvé dans le tissu cérébral. Une étude sur une cohorte humaine mixte montre que FGF21 est présent dans le LCR, quoique de manière plus faible qu'au niveau plasmatique (diminution de 60%)<sup>151</sup>. L'étude montre également l'absence de dysmorphisme sexuel ou de variation liée à l'âge concernant les taux de FGF21 cérébrospinal ou plasmatique. Ces taux de FGF21 se révèlent être positivement corrélés entre eux, ainsi qu'avec l'IMC, la masse adipeuse, le poids corporel, l'indice HOMA-IR et l'insulinémie<sup>151</sup>.

## **2.2. Perturbation de la BHE – Action de FGF21 sur les cellules endothéliales microvasculaires de la BHE**

La BHE se compose d'unités neurovasculaires<sup>196-198</sup> comprenant des cellules endothéliales, des astrocytes, des macrophages périvasculaires, des péricytes, des neurones et une membrane basale (*Figure 18 : Représentation schématique d'unités neurovasculaires de la BHE*). Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales sont non fenestrées. Elles ont comme particularité d'être reliées entre elles par des complexes jonctionnels serrés et adhérents. Les jonctions serrées permettent de restreindre la diffusion paracellulaire. Les protéines les composant appartiennent aux familles des claudines, des occludines, des molécules d'adhésion jonctionnelle et des zonula occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3) (*Figure 19 : Description de la composition des jonctions serrées des cellules endothéliales de la BHE*). Quant aux jonctions adhérentes, elles sont importantes dans le maintien des jonctions serrées et des cellules endothéliales au sein du complexe jonctionnel ; les protéines les composant appartiennent à

la famille des VE-cadhérines. Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales permettent ainsi le maintien de l'intégrité et de la perméabilité de la BHE. Or il est connu que le diabète ainsi que l'hyperglycémie peuvent augmenter dramatiquement la perméabilité de la BHE<sup>199,200</sup>. Cela peut conduire à des déficits neurologiques et favoriser l'extension d'œdèmes cérébraux à la suite d'un AVC ou d'un traumatisme crânien.



*Figure 18 : Représentation schématique d'unités neurovasculaires de la BHE.*

L'unité neurovasculaire de la BHE se compose d'une membrane basale renfermant une monocouche de cellules endothéliales cérébrales, ainsi que de péricytes et d'astrocytes qui viennent au contact de la membrane basale. Les cellules endothéliales interagissent, d'une part, avec les prolongements astrocytaires grâce à des protéines transmembranaires (les aquaporines), et d'autre part avec les péricytes grâce à des jonctions *peg-socket*, lorsque la lame basale est absente. De plus, les astrocytes et les péricytes interagissent entre eux et également avec les cellules microgliales et les neurones, afin d'assurer le bon fonctionnement de la BHE. Figure fortement inspirée de la revue de Haddad-Tovoli & al de 2017<sup>196</sup>.

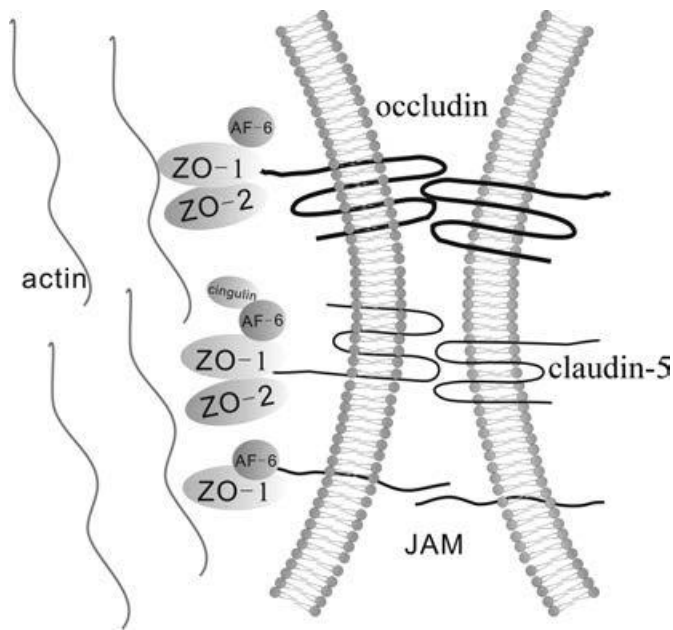


Figure 19 : Description de la composition des jonctions serrées des cellules endothéliales de la BHE.

Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales sont reliées entre elles par des complexes jonctionnels de type serré. Les jonctions serrées restreignent la diffusion paracellulaire, grâce aux protéines de la famille des claudines, des occludines, des JAM et des ZO. La claudin-5, l'occludine et Jam sont des protéines transmembranaires. Avec leurs domaines extracellulaires, elles interagissent avec leur homologue respectif, exprimé dans la membrane de la cellule endothéliale adjacente. Leur extrémité C-terminale intracellulaire interagit avec

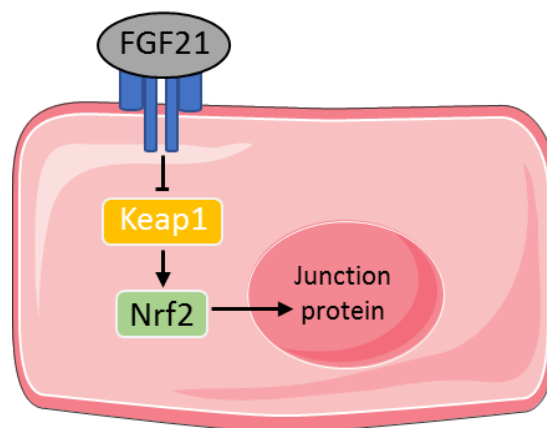
les ZO, qui les rattachent au cytosquelette d'actine. ZO-1 forme un complexe avec la protéine AF-6, qui elle-même interagit avec la cingulin, afin de moduler les jonctions serrées. Figure issue de la revue de Liu & al. de 2012<sup>198</sup>.

AF-6 (*afadin*), JAM (*junctional adhesion molecules*), ZO (*zona occludens*)

Certaines études concluent que FGF21 jouerait un rôle déterminant pour préserver la BHE lors d'un diabète, notamment parce que les cellules endothéliales microvasculaires expriment FGFR1 et KLB<sup>201</sup>. FGF21 agirait sur les cellules endothéliales en limitant la perméabilisation de la BHE, favorisée par le diabète. De fait, le marqueur NAF1 (*nuclear assembly factor 1*) montre que l'extravasation de la BHE diminue lorsque des souris diabétiques db/db, âgées de 16 semaines, sont traitées avec du rFGF21 à une dose de 3mg/kg par jour pendant 10 jours<sup>202</sup>. Cet effet protecteur déterminant de FGF21 passe par différentes voies de signalisation, qui ont pour but de maintenir les complexes jonctionnels inter-cellulaires.

Premièrement, FGF21 empêche la perte de l'expression des protéines de jonction (ZO-1, occludine, claudin-5 et VE-cadhérine) par les cellules endothéliales des souris db/db. Cette action fait intervenir la voie de signalisation Keap1/Nrf2<sup>202</sup> (*kelch-like ECH-associated protein 1 / nuclear factor erythroid 2-related factor 2*), connue pour être un mécanisme majeur dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif, et ce dans diverses situations pathologiques, incluant le DT2. Nrf2 est un régulateur transcriptionnel de gènes cytoprotecteurs (anti-

oxydants, *glutathione generating enzymes*). Keap1 est un répresseur de Nrf2, qui séquestre celui-ci dans le cytoplasme, l'ubiquitine et l'adresse au protéasome pour qu'il soit dégradé. FGF21 interagit avec FGFR1/KLB sur les cellules endothéliales microvasculaire de la BHE, *in vivo*. La phosphorylation de FGFR1 permet d'augmenter son interaction avec Keap1. Ensuite, Keap1 libère Nrf2 dans le cytoplasme, pour qu'il transloque dans le noyau et augmente l'expression des protéines de jonction (*Figure 20 : FGF21 limite potentiellement la perméabilité de la BHE lors d'un DT2 en induisant la voie de signalisation Keap1/Nrf2*). Par ailleurs, l'induction par FGF21 des protéines de jonction dans les cellules endothéliales passe également par la voie PPAR $\gamma$ . Cela a été montré suite à l'injection intrapéritonéale de FGF21, six heures après un AVC ischémique survenu chez des souris db/db<sup>203</sup>, ou sur des souris C57BL/6N ayant subi un traumatisme crânien<sup>204</sup>. FGF21 interagit avec FGFR1, afin d'augmenter la liaison à l'ADN du facteur de transcription PPAR $\gamma$ . PPAR $\gamma$  active alors ses gènes cibles (CD36 (*cluster of differentiation 36*) et FABP4 (*fatty acid-binding protein 4*)) et favorise l'expression des protéines de jonction (occludine, claudin-5, ZO-1 et VE-cadhérine). Par cette voie, au bout de 48 heures, FGF21 diminue la perméabilité de la BHE dans les zones corticales péri-lésionnelles, l'inflammation et la taille des lésions tissulaires cérébrales, comme après un traumatisme crânien. Les effets protecteurs de FGF21, passant par l'induction des protéines de jonction *via* les voies Keap1/Nrf2 et PPAR $\gamma$ , ont été confirmés *in vitro*. Certaines de ces études utilisaient des monocouches de cellules endothéliales HBMEC (*human brain microvascular endothelial cells*) exposées à une hyperglycémie et surexposées à IL1 $\beta$ <sup>202,203</sup>. Une autre étude a confirmé l'implication de PPAR $\gamma$ , à partir de culture de cellules HBMEC stimulées au TNF $\alpha$ <sup>204</sup>.



*Figure 20 : FGF21 limite potentiellement la perméabilité de la BHE lors d'un DT2 en induisant la voie de signalisation Keap1/Nrf2.*

Lors d'un DT2, le FGF21 interagit avec ses récepteurs KLB et FGFR1, exprimés par les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de la BHE. FGFR1 activé lie Keap1, ce qui libère le régulateur transcriptionnel Nrf2. Nrf2 au lieu d'être dégradé, passe alors dans le noyau pour induire l'expression des protéines de jonction, permettant ainsi de limiter la perméabilité de la BHE, lors d'un DT2. Figure issue de l'article de Yu & al. de 2019<sup>202</sup>.

Nrf2 (*NF-E2-related factor-2*), Keap1 (*Kelch ECH-associating protein 1*)

Deuxièmement, la perte des protéines de jonction à la surface des cellules endothéliales, n'est pas le seul facteur connu de dysfonctionnement de la BHE. Le vieillissement lié à l'âge est un facteur de prédisposition, car il entraîne diverses modifications de l'environnement cérébral, notamment le manque d'élasticité des parois cérébrovasculaires, l'augmentation du stress oxydatif et une inflammation de bas grade. Ces perturbations sont partiellement causées par l'action de l'Ang II (angiotensine II) sur les cellules endothéliales de la BHE. L'Ang II promeut le vieillissement cérébrovasculaire, en favorisant l'activation de la voie p53, le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydatif. Dans ce contexte, il a été mis en évidence que le FGF21 prévient l'action de l'Ang II en inhibant la voie p53 de manière AMPK dépendante (*5'-AMP-activated protein kinase*)<sup>201</sup>. Cette action de FGF21 a été montrée sur des cultures cellulaires de hBVSMC (*human brain vascular smooth muscle cells*). En effet, FGF21 active la voie AMPK, afin d'améliorer l'expression de TRF2 (*telomeric repeat binding factor 2*) et d'inhiber l'induction de Siah-1 (*siah E3 ubiquitin protein ligase 1*) par l'Ang II. Siah-1 est une E3 ubiquitine ligase qui dégrade TRF2, une protéine de liaison aux télomères empêchant la sénescence cellulaire et l'activation de p53. Par conséquent, *via* TRF2, FGF21 diminue indirectement l'activation de p53 et de p21, qui est le principal effecteur de p53. Parallèlement, FGF21 améliore la biogénèse mitochondriale, en restaurant le complexe IV de la chaîne respiratoire et l'activité citrate synthase dans les cellules endothéliales microvasculaires. Enfin, FGF21 réduit le stress oxydatif et la production des ROS (*reactive oxygen species*) induits par l'Ang II dans ces cellules. L'ensemble de ces effets protecteurs de FGF21 luttent contre le vieillissement cérébrovasculaire, afin de préserver la perméabilité de la BHE<sup>201</sup> (*Figure 21 : Action potentielle du FGF21 pour lutter contre le vieillissement cérébrovasculaire induit par l'angiotensine II.*). Cependant, les effets neuroprotecteurs de FGF21 ne sont pas seulement observés sur les



cellules endothéliales microvasculaires de la BHE. Ils le sont aussi sur les neurones et ce dans diverses pathologies.

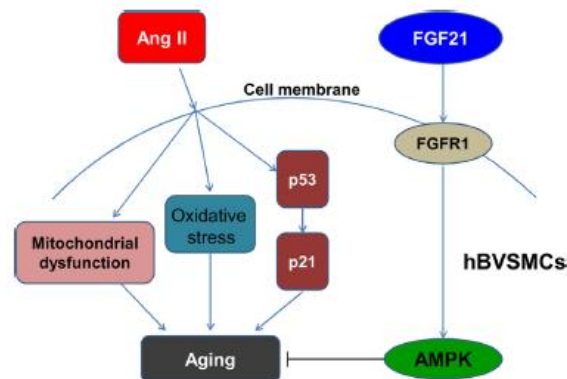


Figure 21 : Action potentielle du FGF21 pour lutter contre le vieillissement cérébrovasculaire induit par l'angiotensine II.

Sur des cultures cellulaires de hBVSMC, l'angiotensine II favorise l'activation de la voie p53, le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydatif, afin de promouvoir le vieillissement cérébrovasculaire. Or FGF21, en interagissant avec FGFR1 et KLB, inhibe l'action de l'angiotensine II, de manière AMPK dépendante. Figure provenant de l'article de Wang & al. de 2016<sup>201</sup>.

Ang II (*angiotensin II*), hBVSMC (*human brain vascular smooth muscle cells*), FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor 1*), AMPK (*5'-AMP-activated protein kinase*)

### 3. Effets neuroprotecteurs de FGF21

Plusieurs études montrent un rôle neuroprotecteur de FGF21 dans des maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique. Chacune de ces maladies est associée à un stress oxydatif, à une mort neuronale importante ainsi qu'à un statut inflammatoire élevé. Dans ces contextes, il a été montré que le FGF21 prévient l'ensemble de ces effets délétères grâce à ses actions antioxydantes, anti-inflammatoires et neuroprotectrices.

#### 3.1. Action antioxydante et anti-apoptotique

##### 3.1.1. Le stress oxydant

Le dioxygène est indispensable aux organismes aérobies pour produire de l'énergie sous forme d'ATP (*adenosine triphosphate*). La production d'ATP, aussi appelée phosphorylation oxydative, est la principale source d'énergie cellulaire. Elle se réalise *via* la chaîne de transport d'électrons

présente dans la membrane interne des mitochondries. Les organismes aérobies sont donc capables, grâce aux mitochondries, de consommer et d'utiliser l'oxygène, mais aussi d'éliminer les métabolites réduits produits, appelés ROS. Les ROS interviennent dans des processus physiologiques, tels que l'angiogenèse, la défense immunitaire (comme la phagocytose) et la signalisation intracellulaire. Ce sont des espèces chimiques instables car ils possèdent sur leur couche périphérique un électron célibataire. Cela leur confère une réactivité supérieure à l'oxygène dont ils sont issus. Les principaux ROS sont l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $HO^{\cdot}$ ). La régulation de leur concentration intracellulaire passe par l'action de dégradation des enzymes antioxydantes. Par exemple, la métalloenzyme, SOD (*superoxide dismutase*), catalyse la dismutation de  $O_2^{\cdot-}$ , tandis que l'enzyme héminique, CAT (*catalase*), et la GPx (*glutathion peroxydase*) catalysent respectivement la dismutation et la réduction de  $H_2O_2$ . L'équilibre entre la production et l'élimination des ROS est l'homéostasie redox, soit la balance entre antioxydant et pro-oxydant. Celle-ci permet de maintenir des concentrations de ROS intracellulaire non délétères. Lorsqu'un déséquilibre de l'homéostasie redox survient, cela génère un stress oxydant. Si celui-ci est transitoire, il intervient dans des processus physiologiques non délétères. Cependant, s'il est prolongé dans le temps, il peut conduire à la mort cellulaire. Le stress oxydant est la résultante d'une production excessive et prolongée de ROS, associée à une réponse antioxydante inefficace. A forte concentration, les ROS ont ainsi des effets délétères car ils peuvent oxyder de l'ADN, des protéines et des lipides en leur enlevant des électrons, provoquant leur instabilité. C'est pour cela que les ROS sont considérés comme cytotoxiques, et qu'ils peuvent favoriser la mort cellulaire en générant un stress oxydant.<sup>205</sup>

### **3.1.2. Action antioxydante et anti-apoptotique de FGF21 en situation pathologique**

Certaines pathologies comme les maladies neurodégénératives, le diabète et l'obésité sont associées au stress oxydant. Il a été montré que l'agrégation toxique d'amyloïdes bêtas ( $A\beta$  :  $A\beta_{1-40}$ ,  $A\beta_{1-42}$ ,  $A\beta_{25-35}$ ) mal repliés, l'hyperphosphorylation de la protéine Tau favorisée par ces derniers, l'hyperglycémie et le vieillissement avaient des effets neurotoxiques. Cela résulte souvent d'une surproduction de ROS associé à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, conduisant à un effet pro-apoptotique. Des études se sont intéressées à l'action neuroprotectrice de FGF21 *via* des effets anti-oxydants et anti-apoptotiques.

Par exemple, dans des conditions non pathologiques, l'étude *in vitro* de Makela & al. de 2014<sup>206</sup> utilise des neurones dopaminergiques traités pendant 24h avec du FGF21 à une dose de 50 ng/mL. L'étude met en évidence que FGF21 active fortement la voie Nampt/SIRT1 (*nicotinamide phosphoribosyltransférase / déacétylase Sirtuin1*), conduisant à l'activation de PGC-1 $\alpha$ . Cette stimulation de PGC-1 $\alpha$  passe par l'augmentation de l'activité promotrice du gène, de l'ARNm et par la désacétylation post-transcriptionnelle induite par SIRT1. PGC-1 $\alpha$  induit alors, dans les neurones dopaminergiques, l'expression d'enzymes antioxydantes mitochondriales comme SOD et Trx2 (*thioredoxin 2*).

Deux études *in vivo* viennent confirmer l'augmentation de l'expression de SOD. La première montre que FGF21 réduit la neurodégénérescence dans l'hippocampe lors du vieillissement. Elle a été menée sur des souris Kunming âgées de trois mois, qui ont reçu une injection sous-cutanée simultanée de D-galactose (à 180mg/kg par jour) et de FGF21 (à 5mg/kg par jour) pendant huit semaines<sup>207</sup>. La seconde porte sur des souris diabétiques db/db, âgées de quatre ou six mois, recevant quotidiennement pendant quatre mois du FGF21 en injection intrapéritonéale (à 1mg/kg par jour)<sup>208</sup>. Elle montre que FGF21 atténue la neurodégénérescence en exerçant une action antioxydante. De plus, ces deux études rapportent que cette action centrale de FGF21 favorise l'expression de la T-AOC (*total anti-oxidation capability*), la restauration de l'activité de la GPx et de la CAT dans les neurones. Cela a pour conséquence d'inhiber la production de ROS. Il est notable que dans tous les modèles pathologiques cités dans cette partie, le FGF21 périphérique induit la diminution centrale de la production de ROS mitochondriaux.

En plus de cette action antioxydante, FGF21 préserve la morphologie mitochondriale, notamment en limitant la vacuolisation. C'est le cas, dans des modèles neurotoxiques de la maladie Alzheimer (comme le montre l'étude d'hippocampe de rats et les cultures cellulaires de SHSY5Y surexposées aux A $\beta$ )<sup>209</sup> ou d'obésité associée à une insulino-résistance (comme le montre l'étude sur des rats mâles Wistar nourris pendant seize semaines avec régime HF)<sup>210</sup>. Parallèlement, FGF21 active les voies AKT/GSK-3 $\beta$  et AMPK $\alpha$ /SIRT1, afin d'exercer un effet neuroprotecteur mitochondrial chez des souris db/db âgées<sup>208</sup>. Cet axe de signalisation AMPK/SIRT1/PGC-1 $\alpha$  stimule, dans le mésencéphale, la biogénèse mitochondriale. De plus, il augmente la capacité respiratoire mitochondriale en favorisant l'expression génique des

transporteurs d'électrons mitochondriaux<sup>193,206</sup>. L'ensemble de ces résultats montre que FGF21 est capable d'augmenter l'efficacité mitochondriale en maintenant l'intégrité de ces organites indispensables à la survie cellulaire.

Ainsi, grâce à ses différentes actions, le FGF21 périphérique prévient le stress oxydatif cérébral et peut l'inverser en situation pathologique. Par exemple, chez des animaux obèses insulino-résistants, la concentration protéique cérébrale du biomarqueur de stress oxydant, la malondialdéhyde, est fortement diminuée chez les animaux traités avec du FGF21. En effet elle passe de 1.68 $\mu$ mol/mg (chez les animaux non traités) à 0.96 $\mu$ mol/mg (chez les animaux traités)<sup>210</sup>. De plus, dans une situation de vieillissement induit par le D-galactose, la production de la malondialdéhyde est atténuée de 25% dans le cerveau des souris recevant un traitement FGF21<sup>207</sup>. Cette amélioration, de la concentration de malondialdéhyde, illustre l'inhibition du stress oxydant induite par FGF21 dans le cerveau.

Par son effet antioxydant, FGF21 exerce une action anti-apoptotique indirecte. En diminuant la production des ROS qui sont cytotoxiques, il améliore par conséquent la survie cellulaire. FGF21 exerce également une action anti-apoptotique directe, démontrée principalement dans l'étude de lésions cérébrales hypoxique-ischémiques chez des rats nouveau-nés. Le traitement par rhFGF21 *in vivo* (injection intrapéritonéale de 1,5 mg/kg par jour, pendant trois jours après la lésion) favorise la récupération fonctionnelle des rats<sup>211</sup>. L'action de FGF21 passe par son interaction avec FGFR1/KLB, qu'il régule à la hausse dans le cortex et l'hippocampe lésés. Ensuite, p-FGFR1 active la voie PI3K(*phosphoinositide 3-kinases*)/Akt, afin de rétablir l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), d'inhiber le clivage de la caspase 3 et de diminuer le pourcentage de cellules Tunel positive de 45.47% dans le cortex et de 23.22% dans l'hippocampe<sup>189,193,209,211</sup>. Ces effets démontrés *in vivo* sont contrés partiellement *in vitro* par les inhibiteurs de FGFR1, PD173074, et de la PI3k, LY294002.

Par ailleurs, une étude sur la maladie d'Alzheimer a montré que FGF21 protégeait de la toxicité des A $\beta$  en réduisant l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (*Bcl-2-associated X protein*) et en favorisant celle de la protéine anti-apoptotique Bcl2<sup>209</sup>. Le ratio Bcl-2/Bax est ainsi amélioré par FGF21, aussi bien dans une étude *in vivo* menée sur des hippocampes de rat, que dans une étude *in vitro* menée sur des cultures cellulaires de SHSY5Y exposées au

préalable aux A $\beta$ . L'ensemble de ces mécanismes anti-apoptotiques sont confirmés par l'étude sur la maladie de Parkinson, de Fang & al de 2020<sup>193</sup>. Ces chercheurs impliquent également l'inhibition au niveau cérébral de la voie JNK par le prétraitement FGF21 pour exercer une action anti-apoptotique.

Ainsi, FGF21 favorise la survie neuronale en limitant le stress oxydatif et en inhibant l'apoptose. L'action antioxydante de FGF21 favorise l'activité des enzymes antioxydantes, limite la production de ROS et maintient un bon fonctionnement mitochondrial. De plus, FGF21 exerce une action anti-apoptotique, en favorisant l'expression neuronale des protéines anti-apoptotiques et en inhibant celle des pro-apoptotiques. Or, lorsqu'une apoptose et un stress oxydant surviennent ils sont fréquemment accompagnés d'une inflammation de bas grade néfaste elle aussi pour les neurones. Par conséquent, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées au rôle de FGF21 sur l'inflammation centrale associée à différentes pathologies.

### **3.2. Action anti-inflammatoire**

Plusieurs études ont démontré le rôle anti-inflammatoire du FGF21 systémique. Sur des souris C57BL/6J rendues obèses par un régime HF de trente-trois semaines, le traitement pharmacologique, injections sous-cutanées quotidiennes de rhFGF21 à une dose de 0.5mg/kg pendant les trois dernières semaines, a permis d'abaisser significativement les concentrations plasmatiques des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$ <sup>212</sup>. Dans cette même étude menée sur des souris obèses<sup>212</sup>, le traitement rhFGF21 produit une action anti-inflammatoire au niveau centrale en diminuant l'expression des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$  dans l'hippocampe. De plus, ce traitement supprime l'activation des cellules microgliales dans le gyrus denté de l'hippocampe, en diminuant de 20,1% le nombre de cellules positives pour IBA1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*) et de 20,3% pour MHCII (*major histocompatibility complex class II molecules*), par rapport aux souris non traitées<sup>21</sup>. Ces résultats ont été récemment confirmés par l'étude de Wang & al de 2020. Ce travail met en évidence l'effet anti-inflammatoire du FGF21 *via* l'inhibition de la voie NF- $\kappa$ B<sup>208</sup>, dans l'hippocampe de souris C57BL/6N dépressives<sup>213</sup>. Le prétraitement FGF21 (par deux injections intrapéritonéales par jour de 1.5mg/kg) active FGFR1 et inhibe ainsi la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B. Cela a pour conséquence de supprimer partiellement l'expression génique hippocampique d'IL-1 $\beta$ , de

TNF $\alpha$  et d'IL-6 et d'inhiber la microgliose (cf. : I.3.2). Cette inhibition se manifeste par une diminution de la taille des somas, un allongement des filaments et par la diminution du nombre de cellule IBA1+. Tous ces effets signalétiques ont été validés sur des cultures primaires de cellules microgliales corticales de rats nouveau-nés. De façon intéressante, ces effets sont inversés par l'inhibiteur de FGFR1, PD173074. Par ailleurs, FGF21 n'a pas seulement un effet sur la microgliose : il diminue aussi l'astrogliose comme le montre la diminution du marquage GFAP dans le mésencéphale de souris atteintes de la maladie de Parkinson, en réponse à un traitement FGF21<sup>193</sup>. L'étude de Yu & al. confirme que FGF21 diminue la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B dans le cerveau, de 30%<sup>207</sup>. Elle met par ailleurs en évidence un autre mécanisme, qui passe par la réduction de l'action des AGE (*advanced glycation end*). Les AGE se forment lors de la réduction de sucre et réagissent de manière non enzymatique avec les protéines, les lipides ou l'ADN comme peuvent le faire les ROS. Ils sont impliqués dans des pathologies dégénératives comme le diabète et la maladie d'Alzheimer. Or dans cette étude, FGF21 atténue de 30% leur production en diminuant l'expression des enzymes productrices d'AGE (aldose réductase, sorbitol déshydrogénase), de leur récepteur (RAGE : *receptor AGE*) et en empêchant la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ , l'inhibiteur de NF- $\kappa$ B. Le FGF21 inhibe ainsi l'action activatrice des AGE sur la voie NF- $\kappa$ B, afin de supprimer la neuroinflammation. Cela entraîne une diminution de 50% de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et l'IL-6 et une augmentation de celle d'IL-10.

Les actions anti-inflammatoires du FGF21 périphérique, décrites précédemment au niveau central, sont également exercées dans le mésencéphale de souris atteintes de la maladie de Parkinson<sup>193</sup> et dans le cerveau de souris âgées diabétiques db/db<sup>208</sup>. De plus, des expériences *in vitro* menées sur des cellules neuronales SHSY5Y confirment qu'un traitement par FGF21 protège de la neuroinflammation induite par une surexposition au LPS ou aux A $\beta$ <sup>189,208</sup>. Par ailleurs, lorsque FGF21 n'est plus exprimé, en situation d'obésité (chez les souris obèses KO-FGF21 nourries avec un régime HF pendant douze semaines), on constate une augmentation de l'expression de l'ARNm d'IL-1 $\beta$  et des protéines IBA1 ainsi que de GFAP dans les noyaux ARC. L'expression accrue de ces marqueurs révèle une inflammation hypothalamique ; celle-ci est corrélée à l'augmentation de l'expression de HSP72 (*heat shock protein 72*) dans les noyaux ARC et la LH, signe de lésions neuronales. Il a été montré que l'inflammation associée aux lésions hypothalamiques engendre une réduction de la réponse thermogénique du TA brun<sup>191</sup>.

En effet, dans l'ARC, l'expression de NPY est augmentée, ce qui favorise l'inhibition de la thermogénèse. De plus, les lésions dans le PVN entraînent une diminution de l'ARNm du neurotransmetteur thermogénique TRH, alors que celui du neurotransmetteur anti-thermogénique MCH (*melanin-concentrating hormone*) augmente dans la LH.

L'ensemble de ces études montrent qu'en limitant l'inflammation cérébrale et le stress oxydatif, FGF21 atténue la neurodégénérescence. Dans le cas de la maladie de Parkinson, FGF21 protège de la perte des neurones dopaminergiques dans la SNpc et dans le striatum, en protégeant les neurones de l'environnement toxique généré par l'agrégation de A $\beta$  mal replié<sup>208</sup>. De plus, dans le cortex et l'hippocampe, FGF21 va empêcher l'hyperphosphorylation de la protéine Tau induite par les A $\beta$ <sup>209,214</sup>. Pour cela, FGF21 interagit avec FGFR1c pour activer l'AMPK par phosphorylation. Ensuite, celle-ci inhibe la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) et par conséquent empêche l'hyperphosphorylation de Tau. Cette voie de signalisation, a été observée en situation de restriction calorique sur des souris ApoE<sup>-/-</sup> (modèle de souris de la maladie d'Alzheimer). Elle permet d'améliorer la plasticité synaptique chez ces souris par rapport à celles nourries *ad-libitum*. L'amélioration de la plasticité synaptique se traduit par un nombre accru de neurones positifs pour le PSD95 (*postsynaptic density protein 95*) et par de meilleures performances cognitives (évaluées par le test de *Morris water maze*). Ainsi, FGF21 favorise la survie des neurones cholinergiques et améliore la plasticité synaptique, afin de maintenir les capacités cognitives des animaux modèles de la maladie d'Alzheimer.

### **3.3. Relation entre le rôle neuroprotecteur de FGF21 et les fonctions cognitives**

Globalement, les études sur les actions neuroprotectrices de FGF21 montrent une amélioration des capacités cognitives et du comportement des animaux atteints de pathologies dégénératives. Cela peut être des animaux modèles de maladies neurodégénératives (comme Alzheimer ou Parkinson), de dépression, d'AVC, d'obésité associée à une insulino-résistance, de diabète ou de vieillissement. Or, dans ces différentes situations pathologiques, le traitement par FGF21 améliore l'apprentissage spatial et entretient la mémoire à long terme<sup>207-211,214</sup>. D'après les résultats au test *Morris water maze*, l'amélioration de l'apprentissage spatiale se traduit par un temps d'échappement faible, un tracé direct et une plus petite distance parcourue pour localiser la plateforme immergée. La mémoire à long terme s'évalue quant à

elle par la fréquence de franchissement à l'emplacement d'origine de la plateforme en 60s une fois celle-ci retirée. Or, chez les animaux traités par FGF21, cette fréquence est plus importante que celle des animaux non traités, donc leur mémoire à long terme est maintenue.

De plus, le traitement par FGF21 diminue le comportement anxieux, comme le montre la tâche de reconnaissance d'objets nouveaux et le test *elevated plus maze*<sup>211,212</sup>. En effets, les résultats de ces expériences comportementales montrent que les rongeurs traités avec du FGF21 passent davantage de temps à explorer les conditions inconnues (un objet, le bras ouvert du labyrinthe). Ils ont donc une volonté d'exploration accrue et une anxiété diminuée par rapport aux animaux non traités. Outre l'anxiété, les comportements dépressifs des animaux sont également corrigés par l'administration de FGF21. Cela se manifeste par une activité locomotrice élevée et un temps d'immobilité faible par rapport aux animaux malades non traités, lors du *forced swim test*, du *suspension test* et de l'*open field test*.

D'autre part, FGF21 améliore la récupération fonctionnelle, en rétablissant les capacités motrices des animaux atteints d'AVC ou de la maladie de Parkinson<sup>193,211,215</sup>. Le *rotarod test* et le *corner-turning test* montrent que les animaux traités ont une endurance de course et une coordination sensori-motrice supérieure aux animaux non traités.

A travers ces tests comportementaux, les études montrent que les capacités neuroprotectrices de FGF21 permettent de maintenir et de restaurer l'intégrité des réseaux neuronaux. Cette préservation se traduit par l'amélioration des capacités cognitives et motrices endommagées au cours de pathologies actuellement toujours incurables. Au vu des capacités neuroprotectrices de FGF21, il pourrait également participer au maintien de l'intégrité des circuits neuronaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, lors de l'obésité ou du DT2.

### **3.4. Rôle neuroprotecteur indirect de FGF21**

Il a été exposé précédemment que le FGF21 passe la BHE et joue un rôle neuroprotecteur fondamental, grâce à ses actions antioxydantes et anti-inflammatoires. Par ailleurs, des études montrent qu'il limite également la taille des lésions cérébrales démyélinisantes<sup>186</sup> ou traumatiques<sup>216</sup>. En effet, lorsque la perméabilité de la BHE est altérée et est associée à une lésion cérébrale démyélinisante, un afflux de FGF21 circulant est observé autour du site lésé.



Le FGF21 y favorise la prolifération des cellules précurseurs d'oligodendrocytes, pour augmenter indirectement la remyélinisation dans les sites lésés<sup>186</sup>. La remyélinisation est importante car elle favorise la restauration de la conduction saltatoire. De plus, elle apporte un support trophique pour les axones et favorise par conséquent la récupération fonctionnelle.

D'autre part, FGF21 stimule la migration des cellules souches mésenchymateuses au niveau des sites de lésions cérébrales traumatiques<sup>192,216</sup>. Habituellement, les cellules souches mésenchymateuses exercent un effet neuroprotecteur à travers une action anti-inflammatoire et la sécrétion de facteurs trophiques (tel que FGF21), après avoir été recrutées autour des sites de lésion. Or, lorsque ces cellules surexpriment artificiellement FGF21 et qu'elles sont transplantées dans le ventricule latéral controlatéral lésé, elles empêchent les séquelles liées au traumatisme cérébral. En effet, les cellules souches mésenchymateuses surexprimant FGF21 sont retrouvées en plus grand nombre dans les sites de lésion traumatique, par rapport à celles ne surexprimant pas FGF21. Leur recrutement est rapide, ciblé et stable *in vivo*. Vingt-huit jours après la lésion, dans l'hippocampe ipsilatéral, le niveau physiologique de FGF21 est rétabli, la neurogénèse est augmentée ainsi que la maturation des neurones immatures (marqués à la doublecortine). Cela a pour conséquence de diminuer les pertes de mémoires et d'améliorer le repérage spatial dépendant et indépendant de l'hippocampe. Ces études mettent donc en évidence que le FGF21 potentialise les capacités de réparation endogène des cellules souches mésenchymateuses dans les sites de lésions traumatiques.

#### **4. Action centrale de FGF21, répercussions périphériques**

Dans cette sous-partie, je détaillerai les actions sur le SNC de FGF21 afin de réguler la thermogénèse, la réponse comportementale à la suite d'une surexposition à des macronutriments et la réponse adaptative au jeûne.

##### **4.1. Action de FGF21 sur la thermogénèse**

Le FGF21 circulant agit sur l'hypothalamus et de DVC pour réguler les paramètres métaboliques périphériques. Cela a été démontré grâce au modèle de souris KLB<sup>Camk2a</sup> ; ces animaux n'expriment plus dans les neurones de l'hypothalamus et du DVC le corécepteur à FGF21, KLB. Par conséquent FGF21 ne peut plus agir sur les neurones de ces structures cérébrales. En effet, il est montré que les souris KLB<sup>Camk2a</sup> ne perdent pas de poids et ne diminuent pas leur glycémie

à la suite d'une injection périphérique de FGF21, contrairement aux souris contrôles  $KLB^{fl/fl}$ <sup>217</sup>. Ces résultats montrent donc que l'action centrale de FGF21 est nécessaire pour la régulation des paramètres métaboliques périphériques. D'autres études corroborent cette conclusion. Par exemple, chez les souris *wild type* C57BL/6, l'injection intracérébroventriculaire de FGF21, dans le ventricule latéral à une dose de 0,4 µg par jour, améliore de 16% le ratio métabolique. Pour autant, l'activité physique et la prise alimentaire des animaux restent inchangées par rapport aux contrôles (souris recevant des injections intracérébroventriculaires de véhicule)<sup>125</sup>. De plus, en situation pathologique d'obésité, cette action centrale de FGF21 est conservée. Elle consiste à augmenter les dépenses énergétiques, afin de lutter contre la prise de poids corporel et l'insulino-résistance périphérique<sup>217,218</sup>. Cependant, les dépenses ne sont pas favorisées par une activité physique plus intense ou par la diminution de la prise alimentaire, mais par la stimulation de la thermogénèse dans le TA brun<sup>219</sup>.

La thermogénèse dite de non-frisson est une production de chaleur par le TA brun<sup>220</sup>. Cette capacité résulte du découplage fonctionnel, induit par la protéine UCP-1, de la chaîne respiratoire mitochondriale à celui de l'ATP synthase<sup>220</sup>. En effet, UCP-1, exprimé dans la membrane interne mitochondriale, accroît la perméabilité de celle-ci en agissant comme un canal à proton. Cela a pour conséquences d'augmenter les processus oxydatifs et la production de chaleur au détriment de la synthèse d'ATP. Cette activité thermogénique est généralement induite par le système nerveux sympathique à la suite d'une exposition au froid, afin de maintenir la température corporelle constante. Elle permet également de brûler l'excédent énergétique lors d'apports disproportionnés, afin de participer au maintien de l'homéostasie énergétique (cf. : I.1.) (*Figure 22 : Modèle de régulation de l'expression d'UCP1 par le système adrénergique dans les adipocytes bruns*).

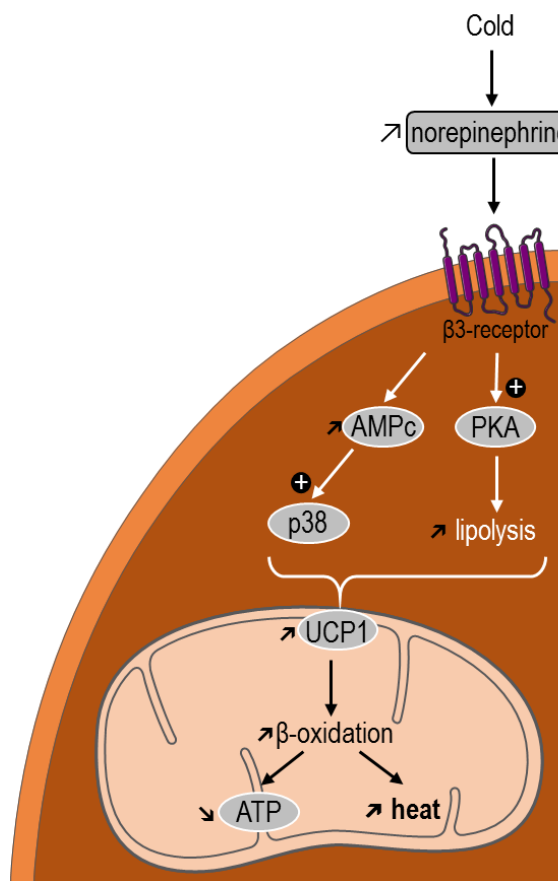


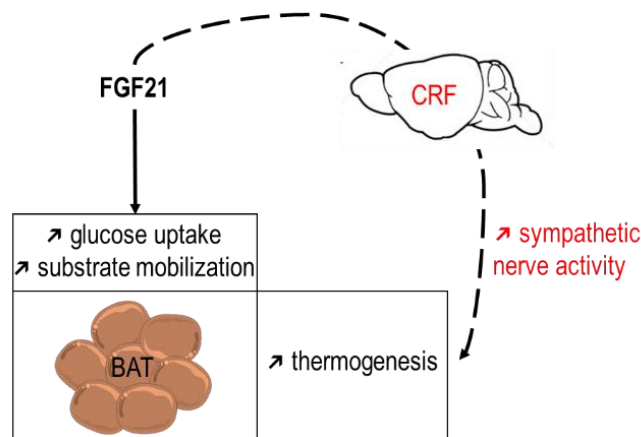
Figure 22 : Modèle de régulation de l'expression d'UCP1 par le système adrénergique dans les adipocytes bruns.

L'activité nerveuse sympathique est stimulée à la suite d'une exposition au froid, conduisant ainsi à la libération de noradrénaline. Cette dernière se fixe sur les récepteurs  $\beta_3$ -adrénergiques, exprimés par les adipocytes bruns, afin d'augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc et d'activer la PKA. Cela induit, d'une part l'activation de la voie p38, et d'autre part l'augmentation de la lipolyse, qui toutes deux conduisent à l'augmentation de l'expression d'UCP1 dans la membrane interne mitochondriale. Une fois UCP1 activé, il dissipe le gradient de protons existant de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Cela augmente la capacité oxydative mitochondriale, engendrant une production de chaleur au détriment de la synthèse d'ATP. Figure fortement inspirée de la publication de Carrière & al. de 2013<sup>220</sup>.

AMPc (cyclic adenosine monophosphate), PKA (protein kinase A), UCP1 (uncoupling protein 1), ATP (adenosine triphosphate), p38 (p38 mitogen activated protein kinase)

Cependant, l'activité thermogénique est négativement corrélée à la masse adipeuse globale, ce qui implique qu'en situation de surpoids celle-ci est diminuée. Or il a été montré que l'action centrale de FGF21, de manière CRH-dépendante, augmente l'activité thermogénique du TA brun des souris obèses (les souris KLB<sup>fl/fl</sup> nourries avec un régime HF pendant trois mois). En effet, trente minutes à quatre heures après l'injection intracérébroventriculaire de 1µg de

FGF21, on constate une activité nerveuse sympathique dans le TA brun. Ce phénomène est corrélé avec l'induction importante dans ce tissu des expressions géniques des marqueurs thermogéniques : UCP-1, Dio2 (*deiodinase 2*) et Elovl3 (*elongation of very long chain fatty acids like 3*). En outre, l'implication de la CRH a été démontrée par l'utilisation d'antagonistes qui empêchaient les effets du FGF21 sur la thermogénèse. De plus, trois heures après l'injection de FGF21, l'expression de l'ARNm CRH hypothalamique était augmenté et corrélée à celle de l'ACTH plasmatique<sup>124,137</sup>. Or, la CRH hypothalamique est le principal stimulateur de la libération d'ACTH hypophysaire, qui favorise à son tour la libération de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. Ces résultats mettent donc en évidence que le FGF21 module l'axe corticotrope (*Figure 23 : Action centrale de FGF21 pour favoriser les dépenses énergétiques et la perte de poids*).



*Figure 23 : Action centrale de FGF21 pour favoriser les dépenses énergétiques et la perte de poids.* Chez des souris obèses, le FGF21 agit sur le système nerveux central pour induire, de manière CRH dépendante, une activité nerveuse sympathique dans le TA brun. Cela augmente l'expression d'UCP1 et la lipolyse dans le TA brun. Parallèlement, FGF21 augmente directement dans le TA brun l'entrée de glucose et la mobilisation des substrats oxydants. Ces deux effets favorisent les dépenses énergétiques par la production de chaleur. Figure fortement inspirée de l'article d'Owen & al. de 2014<sup>124</sup>.

CRF (*corticotropin-releasing factor or CRH*), BAT (*brown adipose tissue*)

Outre cette action thermogénique, FGF21 favorise les dépenses énergétiques et la perte de poids en stimulant le *browning* du TA chez les souris obèses<sup>219</sup>. Le phénomène de *browning* est une réponse adaptative, augmentant la capacité thermogénique par conversion du TA blanc en brun, donnant ainsi des adipocytes beiges caractérisés par une expression importante d'UCP-1 et par une activité métabolique élevée<sup>220</sup>. FGF21 agirait en augmentant l'expression

génique d'UCP-1 dans le TA blanc des souris obèses<sup>219</sup>. Il augmente également la mise à disposition des substrats thermogéniques (les acides gras) dans les TA blancs (le TA blanc épendymal et sous-cutané) *via* l'augmentation de l'expression de lipases (la HSL et l'Atgl (*adipose triglyceride lipase*)) et d'enzymes de synthèse d'acides gras (l'Acaca (*acetyl-CoA carboxylase a*) et la Scd1 (*stearoyl-coenzyme A desaturase 1*))<sup>124</sup>. La stimulation du *browning* par l'action centrale de FGF21 est aussi observée en situation non pathologique, notamment chez les souris C57BL/6 recevant des injections intracérébroventriculaires de FGF21 (à une dose de 0,4 µg par jour dans le ventricule latéral). En effet, après l'injection centrale de FGF21, on observe un renouvellement accru de la noradrénaline dans le TA brun et le TA blanc inguinal. La noradrénaline interagit avec les récepteurs β-adrénergiques des adipocytes, pour augmenter l'expression des molécules impliquées dans le *browning* : UCP-1 (de 40% dans le TA brun et de 50% dans le TA blanc inguinal), Dio2, LCAD (*long chain acyl-CoA dehydrogenase*), VLCAD (*very long chain acyl-CoA dehydrogenase*), Cox7a (*cytochrome c oxidase subunit 7a*), et Cox8b (*cytochrome c oxidase subunit 8b*)<sup>219</sup>. Ces résultats ainsi que ceux obtenus par l'utilisation de β-bloquants, montrent la nécessité du système noradrénaline et β-adrénergique, afin d'induire le *browning* *via* FGF21<sup>125</sup>.

Grâce aux modèles de souris obèses KO-KLB (les souris KLB<sup>Camk2a</sup> n'expriment plus KLB dans les neurones du DVC et hypothalamiques ; les souris Klb<sup>Phox2b</sup>/Tg n'expriment plus KLB dans les neurones du DVC surexprimant FGF21), il a donc été démontré que la stimulation du *browning* par la noradrénaline et la stimulation de la thermogénèse par la CRH résultent en partie de l'action hypothalamique de FGF21<sup>124,219</sup>. En outre, ces modèles prouvent que l'expression de KLB hypothalamique est nécessaire à l'action directe du FGF21 sur le SNC.

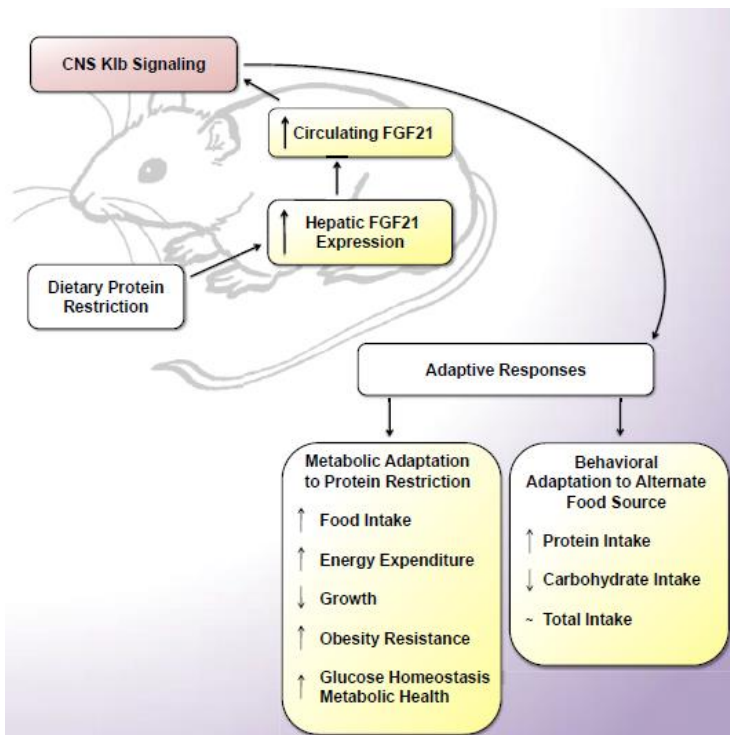
Parallèlement, chez les souris obèses surexprimant FGF21 (les souris KLB<sup>fl/fl</sup>/Tg), le FGF21 tend à rétablir une sensibilité à l'insuline périphérique, en augmentant l'expression de PPARγ et de l'adiponectine dans le TA blanc<sup>124,125</sup>. De plus, il améliore les paramètres physiologiques en diminuant le poids corporel ainsi que le pourcentage de la masse grasse et en augmentant le pourcentage de la masse maigre. Il diminue également la glycémie, l'insulinémie et le taux de cholestérol<sup>219</sup>. Outre ses actions sur les TA et les paramètres physiologiques en situation d'obésité, FGF21 agit au niveau central pour induire un effet insulino-sensibilisateur hépatique<sup>218</sup>. Pour démontrer l'existence de cet axe entre le cerveau et le foie, des rats rendu

obèses après huit semaines de régime HF ont reçu un traitement avec du hFGF21 (injection intracérébroventriculaire dans les ventricules latéraux de 0.4µg par jour pendant 2 semaines). L'action centrale du hFGF21 induit une forte amélioration de la sensibilité à l'insuline hépatique, grâce à la suppression insulino-dépendante de la production hépatique de glucose par néoglucogénèse. Cet effet du hFGF21 se traduit par une inhibition importante médiée par l'insuline de l'expression hépatique de la G6Pase (*glucose 6-phosphatase*) et de Pepck (*phosphoenolpyruvate carboxykinase*). Cependant, l'injection intracérébroventriculaire de FGF21 n'a eu aucun effet sur l'insulinémie à jeun, le taux de triglycéride ou d'acides gras libres plasmatiques. Ces résultats montrent donc que l'action centrale du FGF21 induit des effets insulino-sensibilisatrices périphériques et améliore le profil métabolique des animaux, notamment grâce à la mise en place d'un axe de régulation entre le cerveau et le foie.

#### **4.2. FGF21 et la réponse adaptative aux excès en macronutriments (glucides et protéines)**

L'alimentation est la principale source en macronutriments. Or, lorsque les apports énergétiques sont inappropriés par rapport aux besoins physiologiques, cela a des répercussions sur le métabolisme. Par exemple, un apport disproportionné en lipides diminue les dépenses énergétiques, favorise l'insulino-résistance et augmente le poids corporel des rongeurs. La restriction protéique provoque quant à elle les effets opposés<sup>188</sup>. En effet, lors d'une restriction protéique (provoquée par la consommation de régimes pauvres en protéines standard ou HF), les souris contrôles KLB<sup>lox/lox</sup> ou les souris n'exprimant plus KLB dans les adipocytes (souris KLB<sup>Adipo</sup>) montrent, de manière adaptative, une augmentation de la prise alimentaire jusqu'à ce que suffisamment de protéines soient absorbées pour assurer le bon fonctionnement de l'organisme<sup>221-223</sup>. Afin de contrebalancer l'augmentation de la prise alimentaire, les dépenses énergétiques augmentent simultanément, comme le montrent l'amélioration du ratio de consommation en oxygène et l'expression génique très importante d'UCP-1, dans le TA blanc inguinal<sup>188,221</sup>. La prise de poids est alors stabilisée voir diminuée, ainsi que la masse grasse. Par ailleurs, les animaux soumis à une restriction protéique présentent une meilleure tolérance au glucose et une plus grande sensibilité à l'insuline, associées à une faible insulinémie et glycémie à jeun<sup>188,221</sup>. Ces effets bénéfiques, sont observés chez les souris KLB<sup>Adipo</sup>, ils sont donc indépendants de l'action de FGF21 sur le TA<sup>221</sup>. En revanche, ils disparaissent si la signalisation cérébrale de FGF21 est altérée, notamment chez

les souris obèses FGF21-KO et les souris n'exprimant plus KLB au niveau cérébral<sup>221</sup> et plus spécifiquement dans les neurones glutamatergiques<sup>188</sup> (*Figure 24 : Schéma récapitulatif de l'action centrale de FGF21 en situation de restriction calorique*). En effet, lorsque ces derniers n'expriment plus KLB (les souris KLB Vglut2-KO), FGF21 n'est plus capable d'induire des effets adaptatifs à la restriction protéique et de protéger du gain de poids corporel. Or, ces résultats ne sont pas reproduits si KLB n'est pas exprimé dans les neurones GABAergiques (les souris KLB Vgat-KO). Cela signifie que seul les neurones glutamatergiques sont nécessaires à l'action centrale de FGF21 pour provoquer la réponse métabolique adaptative induite par une restriction protéique<sup>188</sup>.



*Figure 24 : Schéma récapitulatif de l'action centrale de FGF21 en situation de restriction calorique.*

Lors d'une restriction calorique, l'expression hépatique de FGF21 augmente conjointement avec le niveau circulant de FGF21. Le FGF21 agit alors au niveau central, afin d'induire une adaptation du métabolisme et du comportement alimentaire. L'action métabolique passe par une diminution de la croissance associée à une augmentation de la prise alimentaire, des dépenses énergétiques, de la résistance à l'obésité et de l'homéostasie du glucose. L'action sur le comportement induit, quant à elle, une augmentation de la consommation de protéines, une

diminution de celle des glucides tout en maintenant un apport calorique stable. Figure récapitulative de l'article de Hill & al. de 2019<sup>221</sup>.

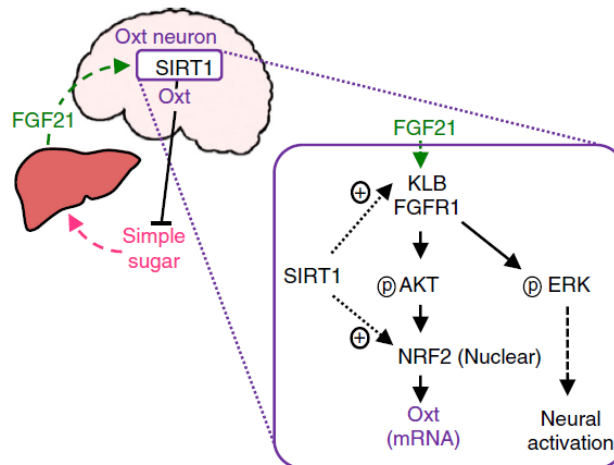
Parallèlement, l'expression hépatique et le niveau de FGF21 plasmatique sont augmentés, de façon indépendantes à l'action centrale de FGF21, chez les individus minces et obèses soumis à une restriction protéique<sup>221</sup>. Cela montre que, dans cette situation, des informations périphériques sont transmises par l'intermédiaire de FGF21 depuis le foie vers le cerveau mais

non en sens inverse. Ainsi, la restriction calorique stimule la production hépatique de FGF21, afin d'augmenter la disponibilité de l'hormone au niveau plasmatique<sup>221,224</sup>, ce qui potentialise son action centrale, afin de favoriser la consommation de protéines. Les souris soumises à une restriction protéique s'orientent alors vers un régime riche en protéine au détriment de celui riche en glucides. Elles manifestent donc une préférence pour le régime pauvre en sucre (*Figure 24 : Schéma récapitulatif de l'action centrale de FGF21 en situation de restriction calorique*). Pourtant les sucres simples (le glucose, le fructose, le sucrose) favorisent eux aussi la sécrétion de FGF21 hépatique par l'activation de ChREBP (*carbohydrate-responsive element-binding protein*)<sup>224</sup>. En effet, les animaux KO-FGF21 hépatique et KO-ChREBP ont des concentrations plasmatiques faibles de FGF21 et manifestent une préférence exacerbée pour le glucose et le fructose. Au contraire, lorsque les souris surexpriment FGF21 (souris transgénique surexprimant FGF21 : Tg-FGF21 ou les souris recevant une injection de hFGF21 à une dose de 0.3 mg/kg), elles montrent une diminution de leur préférence pour les aliments riches en sucrose de 34%, une diminution de la consommation de celui-ci de 59% et de la taille des repas de 42%. De plus, l'administration de FGF21 réduit aussi la préférence au goût sucré de 83% sans pour autant causer une aversion gustative. Ces résultats mettent donc en évidence que, la sécrétion accrue de FGF21 hépatique dans la circulation sanguine transmet un message post-prandial inhibiteur de la prise de sucres simples au cerveau.

Ces modifications du comportement alimentaire résultent de l'action hypothalamique directe de FGF21, dans le PVN et le VMH<sup>224</sup>. En effet, lorsque KLB est spécifiquement supprimé dans le PVN (les souris KO-KLB dans les neurones Sim1 (*single minded 1*) : KLB Sim1-KO ; les souris KO-KLB dans les neurones à vasopressine : KLB AVP-KO ; les souris KO-KLB dans les neurones à ocytocine : KLB Oxy-KO), FGF21 ne limite plus la consommation basale en sucrose. Or, ce n'est pas le cas si KLB est supprimé du SCN ou du NTS. La signalisation de FGF21 dans le PVN intervient donc dans l'inhibition la prise de sucrose, et plus spécifiquement l'action de FGF21 sur les neurones à ocytocine<sup>225</sup>. En effet, FGF21 interagit avec ses récepteurs FGFR1 et KLB pour activer ERK1/2 et AKT, dans les neurones à ocytocine. Ensuite, p-ERK1/2 stimule l'activité neuronale de 13%, mesurée grâce au marqueur c-Fos, tandis que p-AKT recrute le facteur de transcription Nrf2. Nrf2 augmente alors l'activité du promoteur, l'expression et la sécrétion de l'ocytocine par les neurones spécialisés du PVN, afin de supprimer la préférence aux sucres simples. Cette signalisation FGF21-KLB-p-AKT-Nrf2 est potentialisée par SIRT1, qui régule



positivement l'expression de KLB dans les neurones à ocytocine et donc améliore la sensibilité neuronale à FGF21. Parallèlement et indépendamment de FGF21, SIRT1 augmente le recrutement de Nrf2 et par conséquent l'expression de l'ocytocine. Cela a été démontré *in vitro* sur une lignée cellulaire murine hypothalamique N41 *via* l'utilisation d'un inhibiteur de ERK (UO126) et d'un inhibiteur de la PI3K (*wortmannin*). Cela a aussi été confirmé *in vivo*, avec les souris NS-OE surexprimant SIRT1 ou au contraire NS-KO (*Figure 25 : Modèle de régulation de la préférence aux sucres simples*).



*Figure 25 : Modèle de régulation de la préférence aux sucres simples.*

L'ingestion de sucres simples favorise la sécrétion de FGF21 par le foie. FGF21 agit comme un signal post prandial endocrinien sur les neurones à ocytocine. En effet, FGF21 interagit avec ses récepteurs, FGFR1 et KLB, pour activer ERK et AKT dans ces neurones. Ensuite, p-ERK stimule l'activité neuronale, tandis que p-AKT recrute le facteur de transcription Nrf2, afin d'augmenter la sécrétion d'ocytocine, qui supprime la préférence pour les sucres simples. Parallèlement, SIRT1 favorise la sensibilité à FGF21 des neurones à ocytocine et stimule la transcription de cette dernière *via* NRF2. Ainsi, SIRT1 potentialise la régulation par rétroaction négative de la préférence aux sucres simples, grâce à FGF21 et à l'ocytocine. Figure issue de l'étude de Matsui & al. de 2018<sup>225</sup>.

Oxt (ocytocine), SIRT1 (*déacétylase sirtuin1*), KLB (*klotho β*), FGFR1 (*fibroblast growth factor receptor 1*), AKT (*protein kinase B*), ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), NRF2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

Pour autant, la signalisation dans le PVN n'est pas nécessaire à la suppression de la consommation de sucrose médiée par FGF21, contrairement à la signalisation dans le VMH qui, elle, est nécessaire et suffisante pour supprimer cette consommation et la préférence au goût sucré. En effet, la signalisation dans le VMH de FGF21 implique spécifiquement les neurones glutamatergiques et est indépendante des neurones GABAergiques et

dopaminergiques<sup>187</sup>. Cependant, la signalisation de FGF21 dans le VMH n'est pas suffisante pour réguler les dépenses énergétiques, le poids corporel ou la préférence au goût sucré non nutritif (étudiée grâce à l'utilisation d'un édulcorant, la saccharine). Or, il a été montré, dans le VMH, que la signalisation de FGF21 aux neurones glutamatergiques potentialise directement la réactivité à une hyperglycémie des neurones glucosensibles exprimant KLB<sup>187</sup>. En effet, cela se traduit, dans les neurones glucosensibles, par l'augmentation de la fréquence des potentiels d'action, de leur résistance membranaire et de la dépolarisation du potentiel de membrane au repos. Il est notable que les neurones du VMH exprimant KLB constituent une population cellulaire hétérogène, car ils répondent différemment à FGF21, en réponse à l'augmentation de glucose. En effet cette population se compose à 70% de neurones dits *glucose-excited*, à 23% de neurones dits *glucose-inhibited* et à 7% de neurones dits *glucose-insensitives*. De plus, grâce à la technique de *patch clamp*, il est montré que FGF21 potentialise considérablement les changements de concentration de  $[Ca^{2+}]_i$  des neurones dits *glucose-excited* et *glucose-inhibited* en réponse à l'augmentation du glucose, par rapport aux souris traitées avec le véhicule. L'action de FGF21 potentialise donc les réponses des neurones glucosensibles du VMH (les *glucose-excited* et les *glucose-inhibited*) en réponse à une hyperglycémie, afin d'agir comme un signal post-prandial inhibiteur (*Figure 26 : Schéma récapitulatif de l'action de FGF21 sur les neurones glutamatergiques pour supprimer la prise de carbohydrates*). En effet, FGF21 agit comme un rétrocontrôle négatif de la prise alimentaire, car lorsqu'il est injecté (injection intracérébroventriculaire à une dose de 50ng/2 $\mu$ L) à des souris présentant une hyperglycémie, il active rapidement les neurones NUCB2/Nesf-1 (*nucleobindin 2 / nesfatin-1*) du PVN, pour exercer directement un effet anorexigène<sup>226</sup>. L'action directe de FGF21 est prouvée par l'augmentation de  $[Ca^{2+}]_i$  dans les neurones NUCB2/Nesf-1 après l'administration de FGF21 à une dose de 50 ng/mL.

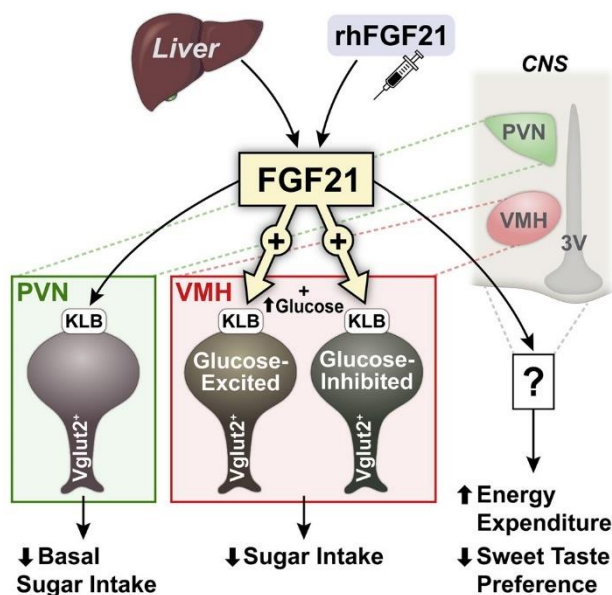


Figure 26 : Schéma récapitulatif de l'action de FGF21 sur les neurones glutamatergiques pour supprimer la prise de carbohydrates.

La signalisation de FGF21 (hépatique ou exogène), aux neurones glutamatergiques (du PVN et du VMH), est nécessaire et suffisante pour diminuer la consommation de sucres simples et la préférence pour le goût sucré. De plus, le FGF21 agit directement dans le VMH pour réguler spécifiquement l'apport en saccharose, mais pas la préférence au goût sucré non nutritif, le poids corporel ou les dépenses énergétiques. Enfin, le FGF21 affecte l'activité neuronale en augmentant l'activation et l'excitabilité des neurones glucosensibles du VMH. Figure récapitulative de l'étude de Jensen-Cody & al. de 2020<sup>187</sup>.

rhFGF21 (*recombinant human FGF21*), CNS (*central nervous system*), VMH (*ventromedial hypothalamus*), PVN (*paraventricular nucleus*), 3V (*third ventricle*), KLB (*klotho  $\beta$* ), Vglut2<sup>+</sup> (*vesicular glutamate transporters 2 positif neurons*)

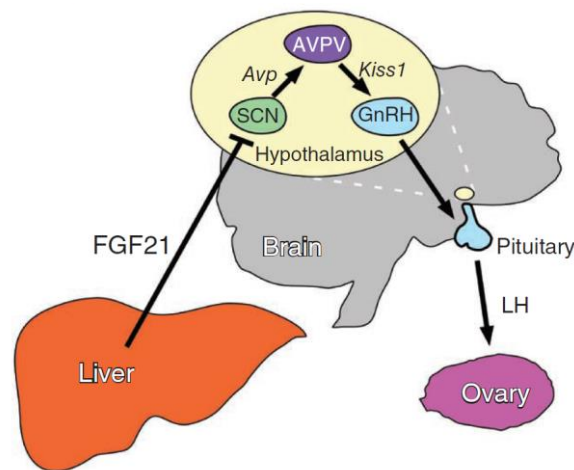
#### 4.3. FGF21 et la réponse adaptative au jeûne

Le jeûne crée des conditions diamétralement opposées à l'excès calorique exposé précédemment. Pourtant, l'action centrale de FGF21 a aussi été étudiée dans cette condition, car le niveau d'expression hépatique de FGF21 ainsi que son niveau circulant sont augmentés pendant le jeûne. Il est notable que les niveaux de FGF21 circulant augmentent, dans des conditions d'excès ou au contraire de restriction calorique importante. De ce fait, dès que les apports énergétiques sont disproportionnés par rapport aux besoins physiologiques, FGF21 est impliqué dans la régulation métabolique.

Pour mimer des phases de jeûne chez les animaux, la restriction alimentaire ou la torpeur peuvent être induites<sup>227</sup>. Dans les deux cas, le taux d'acide gras circulant augmente car ceux-ci deviennent la principale ressource énergétique. De plus, la fertilité des animaux décroît, les dépenses énergétiques ainsi que leur croissance sont restreintes, et leur température corporelle est abaissée<sup>227</sup>. Dans ces conditions, des études ont montré que le FGF21 intervient dans la régulation adaptative au jeûne de l'axe gonadotrope, du cycle circadien, de la sécrétion de glucocorticoïdes et de l'homéostasie lipidique.

Tout d'abord, l'axe gonadotrope. Deux études ont exploré l'impact de FGF21 sur cet axe. La première s'est appuyée sur des souris femelles transgéniques surexprimant FGF21, qui se révèlent être très peu fertiles<sup>228</sup>. Ces données rappellent celles obtenues en phase de privation nutritionnelle et montrent un lien entre la surexposition à FGF21 et l'infertilité. Ce lien s'explique en partie par l'action hypothalamique de FGF21. En effet, dans le SCN, FGF21 interagit avec KLB pour supprimer la cascade de signalisation vasopressine-kisspeptine-GnRH. L'induction du déficit en GnRH inhibe le pic de LH durant la phase proœstrus, qui est responsable de l'ovulation. Les souris transgéniques présentent alors un taux de LH circulant très faible par rapport aux souris contrôles. De plus, leur puberté débute tardivement et leur cycle œstrus est très perturbé. Par conséquent, la surexposition à FGF21 induit un hypogonadisme hypogonadotrope chez les souris femelles transgéniques. Cependant, cette infertilité est corrigée par l'injection intracérébroventriculaire de vasopressine ou de kisspeptine, restaurant ainsi la sécrétion de GnRH. L'infertilité est aussi corrigée par la suppression sélective de KLB dans le SCN, empêchant alors l'action de FGF21 au niveau central. Ainsi le FGF21 définit un axe hépatique-neuroendocrinien adaptatif important, qui permet de réduire la fertilité de mammifères en réponse à un déficit nutritionnel (*Figure 27 : Schéma illustrant l'action de FGF21 sur l'axe gonadotrope*). La seconde étude confirme l'implication de FGF21 dans la régulation de la reproduction<sup>229</sup>. Elle montre la nécessité d'une régulation fine par FGF21 de l'axe gonadotrope, afin d'optimiser la capacité de reproduction. Dans cette seconde étude, la voie FGF21 hypothalamique, au lieu d'être potentialisée, est supprimée chez des souris femelles C57BL/6J KO-KLB et ce spécifiquement dans les neurones à GnRH. De manière surprenante, une suppression de la sécrétion de GnRH est aussi constatée, entraînant un retard pubertaire, associé à une faible fertilité. Pour autant, les neurones ne sont pas dysfonctionnels, car l'injection intrapéritonéale de GnRH exogène ou de kisspeptine induisent le pic de LH. De plus, le KO-KLB n'impacte ni le nombre, ni la distribution, ni l'expression hypothalamique des

neurones à GnRH, ni la synthèse et le transport du peptide. Ainsi, la signalisation de FGF21 joue un rôle essentiel dans la sécrétion de la GnRH, comme le démontrent des expériences *ex vivo* sur des explants d'EM, où FGF21 induit la sécrétion de GnRH sur les explants de souris *wild type* mais pas sur ceux des souris KO-KLB. Comme ces deux études le montrent, la carence et l'excès de FGF21 peuvent donc conduire à des défauts de la sécrétion et de la fonction de la GnRH.



*Figure 27 : Schéma illustrant l'action de FGF21 sur l'axe gonadotrope.*

Chez des souris femelles, la surexposition à l'hépatokine FGF21 imite l'infertilité secondaire à la famine. En effet, le FGF21 agit sur le noyau supra-chiasmatique hypothalamique, pour supprimer la cascade de signalisation vasopressine-kisspeptine-GnRH. Le déficit de sécrétion de GnRH a pour conséquence d'inhiber le pic de LH pendant la phase proœstrus, ce qui provoque une diminution de l'ovulation et une infertilité chez ces animaux. Ainsi, le FGF21 inhibe la reproduction chez les souris femelles lors d'un déficit nutritionnel. Figure issue de l'étude d'Owen & al. de 2013<sup>228</sup>.

SCN (*suprachiasmatic nucleus*), Avp (*arginine vasopressin*), AVPV (*anteroventral periventricular*), Kiss1 (*kisspeptin 1 gene*), GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*), LH (*luteinizing hormone*)

Cependant, la fertilité n'est pas la seule conséquence du jeûne. En effet, les dépenses énergétiques sont elles aussi diminuées pendant cette période, afin de limiter la consommation de substrats énergétiques pour des activités superflues et ainsi subvenir en priorité aux besoins physiologiques essentiels. Or, le FGF21 est surexprimé pendant le jeûne et agit sur le SCN et le DVC, pour perturber l'activité physique circadienne des animaux. En effet, il supprime l'activité physique en phase nocturne et augmente celle en phase diurne<sup>137</sup>. En outre, par cette action

hypothalamique, il modifie les expressions des gènes circadiens spécifiquement au niveau hépatique (*Bmal1* (*brain and muscle arnt-like protein-1*), *clock* (*circadian locomotor output cycles kaput*), *Per2* (*period circadian regulator 2*) ou *PPAR $\alpha$* )<sup>227</sup>. De plus, grâce à son action sur le SCN, FGF21 diminue les taux plasmatiques diurnes d'insuline, de glucose et de cholestérol. La surexpression de FGF21 module les produits de sécrétion du SCN afin de stimuler la sécrétion de corticostérone<sup>137</sup>. Pour cela, il favorise l'expression génique hypothalamique de la CRH au détriment de celle de l'AVP. En effet, bien que la CRH et l'AVP stimulent la sécrétion d'ACTH hypophysaire, l'activité de la CRH est prédominante par rapport à celle de l'AVP. De plus, ces changements hypothalamiques sont corrélés à la diminution plasmatique d'ACTH et à l'augmentation plasmatique de corticostérone. La diminution de l'ACTH plasmatique, malgré l'augmentation de l'expression de la CRH, s'explique par le rétrocontrôle négatif puissant qu'exerce la corticostérone sur l'hypophyse, afin d'inhiber sa propre synthèse surrénalienne. Le taux plasmatique élevé de corticostérone constaté lors d'une surexposition à FGF21, est donc une autre caractéristique du jeûne.

Parallèlement, pendant le jeûne FGF21 intervient également dans la régulation de l'homéostasie lipidique. Les acides gras circulants (le palmitate), particulièrement élevés pendant le jeûne, induisent la production tanycytaire du peptide FGF21, afin d'informer le SNC du statut nutritionnel. L'étude de Geller & al 2019 identifie pour la première fois l'existence d'un site de synthèse et de sécrétion hypothalamique de l'hormone FGF21, les tanocytes<sup>190</sup>. FGF21 y exerce alors une action autocrine et paracrine, conduisant à l'inhibition des neurones à GHRH, TRH et AVP, selon le mécanisme de signalisation suivant<sup>190</sup> : tout d'abord, le palmitate plasmatique est détecté par les tanocytes ; il peut ensuite y être stocké dans des vésicules lipidiques, ou y être oxydé directement, afin d'activer la voie ROS/p38-MAPK. Cette voie induit un pic d'expression du peptide FGF21 dans les tanocytes (*Figure 28 : Schéma illustrant l'implication du FGF21 tanycytaire dans le maintien de l'homéostasie lipidique pendant le jeûne*). Ce pic a été observé *in vitro*, sur des cultures primaires de tanocytes murins, douze heures après un traitement au palmitate. Cela a été confirmé *in vivo*, dans cette même étude de Geller & al de 2019, après vingt heures d'une injection en intraveineuse de palmitate, l'expression de l'ARNm FGF21, dans le *punch* du MBH, est augmentée. Cette même étude précise que le FGF21 tanycytaire est sécrété proportionnellement à sa synthèse et ne résulte pas d'une accumulation. De plus, à partir d'une étude de la délétion spécifique de FGF21 dans les tanocytes (les souris

FGF21<sup>fl/fl</sup>Tan<sup>TAT-CRE</sup>), il a été montré que FGF21 inhibe la lipolyse et le *browning* dans le TA blanc sous-cutané. En revanche, le FGF21 favorise la lipogénèse dans le TA, afin de réguler l'homéostasie lipidique en situation de jeûne en modulant l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien<sup>230</sup> (Figure 28 : Schéma illustrant l'implication du FGF21 tanocytaire dans le maintien de l'homéostasie lipidique pendant le jeûne).

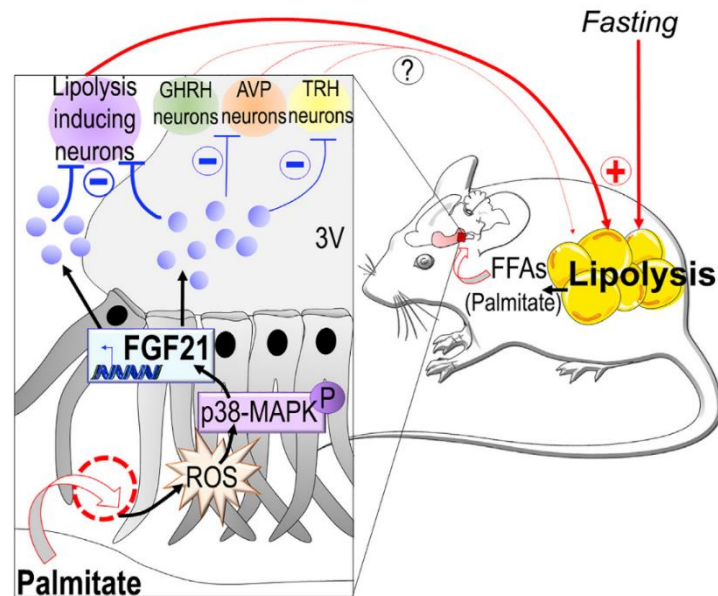


Figure 28 : Schéma illustrant l'implication du FGF21 tanocytaire dans le maintien de l'homéostasie lipidique pendant le jeûne.

Le jeûne, probablement via la stimulation de la lipolyse, augmente le niveau d'acides gras circulants pour stimuler la sécrétion de FGF21 par les tanocytes. En effet, ces cellules stockent le palmitate dans des gouttelettes lipidiques et l'oxydent, conduisant ainsi à la sécrétion de ROS, qui activent la voie de signalisation p38-MAPK. Cette voie induit alors l'expression tanocytaire du FGF21. Le FGF21, sécrété par les tanocytes, inhibe l'activité des neurones GHRH, AVP et TRH, afin de diminuer la lipolyse et le *browning* en situation de jeûne. Figure issue de l'article de Geller & al. 2019<sup>190</sup>.

ROS (reactive oxygen species), p38-MAPK (p38-mitogen-activated protein kinases), GHRH (growth hormone-releasing hormone), AVP (arginine vasopressin), TRH (thyrotropin-releasing hormone), FFA (free fatty acid)



## CONTEXTE et OBJECTIFS de la thèse

L'hypothalamus joue un rôle crucial dans la régulation de la prise alimentaire et de la balance énergétique. L'altération du contrôle hypothalamique, notamment par la consommation d'un régime alimentaire enrichi en lipides (HF), favorise l'installation de désordres métaboliques majeurs. Il a récemment été montré que dès quelques jours de régime HF, une inflammation hypothalamique apparaît. Celle-ci est réversible et précède l'installation de l'insulino-résistance et de l'obésité, ce qui suggère son rôle causal dans la mise en place de ces perturbations métaboliques. En parallèle, l'organisme met en place des mécanismes de compensation, notamment en augmentant la sécrétion de l'hormone FGF21. Cette hépatokine, connue pour son implication dans la régulation du métabolisme des glucides et des lipides, agit via les récepteurs FGFR1 et KLB, afin d'exercer des actions anti-inflammatoires et insulino-sensibilisatrices sur divers tissus périphériques (TA, foie, muscles, pancréas). Récemment, il a été montré qu'une injection intracérébroventriculaire de FGF21 rétablit la sensibilité à l'insuline et améliore les paramètres métaboliques chez des souris obèses. De plus, il a été mis en évidence l'expression de FGF21 dans l'hypothalamus médio basal (MBH). Cela suggère un rôle important du FGF21 hypothalamique dans l'homéostasie énergétique, cependant celui-ci demeure mal compris à ce jour. Dans ce contexte, l'objectif de ma thèse vise à déchiffrer les mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent les effets insulino-sensibilisateurs et anti-inflammatoires de FGF21 au niveau du MBH. Cette étude s'articulera autour des axes suivants :

1/ Caractériser, en condition physiologique, l'expression de FGF21 et de ses récepteurs (FGFR1/KLB) dans les noyaux hypothalamiques et les populations cellulaires du MBH.

Pour cela, des souris C57BL/6J sont nourries avec un régime standard « chow diet » (CD). L'expression hypothalamique du FGF21 endogène est étudiée par RTqPCR et immunohistochimie couplée ou non à de l'hybridation *in situ*, permettant ainsi d'identifier les types cellulaires du MBH susceptibles d'être des sites de production de FGF21. De plus, les profils d'expression des récepteurs FGFR1 et KLB sont caractérisés par immunohistochimie, dans différents types cellulaires, ce qui révèle des sites d'action potentiels de FGF21.



2/ Etudier l'impact de la consommation du régime obésogène HF à court terme (pendant trois et huit jours) sur l'expression de FGF21 et de ses récepteurs dans le MBH.

Des souris C57BL/6J sont soumises soit à un régime CD, soit à un régime HF pendant trois ou huit jours. Le but est de mettre en relation l'installation de la gliose réactionnelle (étudiée par immunohistochimie) et de l'intolérance au glucose (relevée par un test de tolérance au glucose : GTT) induites par le régime HF, avec l'évolution des niveaux d'expression génique et protéique de FGF21 et de ses récepteurs dans le MBH (par immunohistochimie couplée ou non à de l'hybridation *in situ*).

3/ Etudier les effets de l'inactivation spécifique de FGF21 dans le MBH, sur le développement précoce de la gliose réactionnelle et de l'intolérance au glucose induites par la consommation du régime HF pendant trois jours.

Pour cela, son expression génique est réprimée *via* l'injection d'un AAV-ShFGF21-GFP dans les noyaux ARC des souris C57BL/6J soumises à trois jours de régime HF. Les conséquences de cette inactivation sur la tolérance au glucose sont observées par un GTT, et celles sur la gliose réactionnelle par quantification des images d'immunohistochimie dans le MBH. L'étude de ces paramètres permet d'identifier *in vivo*, l'action insulino-sensibilisatrice et anti-inflammatoire de FGF21 hypothalamique. Enfin, afin de compléter les résultats obtenus *in vivo*, des études *in vitro* (*culture cellulaire de lignées neuronales et gliales*) ont été faites afin d'identifier les voies de signalisation qui sous-tendent ces effets bénéfiques de FGF21 en condition d'insulino-résistance.

## RESULTATS

# FGF21 expressed in mediobasal hypothalamus modulates short-term high fat diet induced hypothalamic inflammation and glucose intolerance.

Coralie Alexandre<sup>1</sup>, Jeanne Guitton<sup>1</sup>, Monica Imbernon<sup>2</sup>, Ghislaine Poizat<sup>1</sup>, Sarah Al-Rifai<sup>1</sup>, Vincent Prévot<sup>2</sup>, Mohammed Taouis<sup>1\*</sup> and Yacir Benomar<sup>1\*</sup>.

1. University of Paris-Saclay, CNRS, Molecular Neuroendocrinology of Food Intake (NMPA), Paris-Saclay Institute of Neurosciences (NeuroPSI) UMR 9197, Saclay, France.
2. University of Lille, Inserm, CHU Lille, Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Lille Neuroscience & Cognition, UMR-s 1172, FHU 1000 Days for Health, Lille, France.

\* To whom correspondence should be addressed: [yacir.benomar@universite-paris-saclay.fr](mailto:yacir.benomar@universite-paris-saclay.fr); [mohammed.taouis@universite-paris-saclay.fr](mailto:mohammed.taouis@universite-paris-saclay.fr)

---

## ABSTRACT

FGF21, a metabolic hormone mainly produced by the liver, has emerged as a promising therapeutic candidate for the treatment of obesity and type 2 diabetes with anti-inflammatory and insulin-sensitizing properties. FGF21 is also expressed in the hypothalamus where its role is still unknown. Besides, short-term high fat diet (HFD) consumption promotes the acute and selective inflammation of the mediobasal hypothalamus (MBH) prior to any peripheral major metabolic defects. Here we investigated whether local hypothalamic FGF21 is implicated in short-term HFD-induced hypothalamic inflammation. We show that short-term HFD increased MBH expression of FGF21 specifically in tanycytes and ARC neurons and reactive gliosis accompanied by glucose intolerance. The selective knockdown of FGF21 into the MBH exacerbates short-term HFD-induced hypothalamic inflammation, glucose intolerance, insulin resistance and body weight gain. These findings are reinforced by the preventive effect of FGF21 on palmitate-induced inflammation of cultured tanycytes, neurons, astrocytes and microglia. In conclusion, this study reveals the anti-neuroinflammatory role of MBH FGF21 especially during short-term HFD consumption and suggests that hypothalamic FGF21 expression defect could initiate the early onset of hypothalamic inflammation. These findings constitute an important step to further understand the physiopathological significance of hypothalamic FGF21.

**Keywords :** obesity, high fat diet, FGF21, Hypothalamus, inflammation, insulin-resistance.

---

## INTRODUCTION

Growing evidence considers chronic systemic inflammation induced by high fat diet (HFD) feeding as a preponderant mechanism for the development of obesity and associated metabolic dysfunctions (4, 5). HFD consumption triggers an inflammatory response in the hypothalamus (6-9), a key brain region controlling energy homeostasis, which causes hypothalamic neuronal injuries and the impairment of leptin/insulin signaling promoting body weight gain and subsequent metabolic dysfunctions (10-13). Accumulating evidence suggests that HFD consumption rapidly within few days' affects the MBH, prior to any peripheral metabolic or endocrine changes (14 -16). In this context, hypothalamic resident glial cells, and particularly microglia and astrocytes, are identified as HFD targets to initiate the early onset of hypothalamic inflammation and the resultant potential metabolic disorders (17). However, the cellular and molecular mediators are still not fully characterized.

Fibroblast growth factor 21 (FGF21), an endocrine hormone predominantly produced by the liver, has recently emerged as a promising therapeutic candidate for the treatment of obesity and T2D (18). Indeed, FGF21 treatment counteracts obesity, chronic inflammation, insulin resistance and glucose intolerance (19-24). FGF21 binds to a cell-surface receptor composed of a canonical FGF receptor (FGFR) in complex with a co-receptor,  $\beta$ -Klotho (KLB) (25,26). Besides its peripheral effects, FGF21 has an impact at the hypothalamic level to regulate glucose and lipid metabolism and insulin sensitivity (27,28). Indeed, FGF21 was detected in human cerebrospinal fluid and several brain areas including the hypothalamus (29). Furthermore, the tanycytes, a subset of hypothalamic glial cells, produce and secrete FGF21 in response to circulating free fatty acid to modulate lipid homeostasis likely through an action on GHRH, TRH, and AVP neurons (30). Based on the metabolic and anti-inflammatory properties of FGF21, we hypothesized that hypothalamic FGF21 could be a component of the potential signaling cascades orchestrating the early onset of HFD-induced MBH inflammation and subsequent metabolic dysfunctions.

In the present study, we show that 3 or 8 days HFD consumption increases FGF21 expression in tanycytes and neurons of the MBH, but not in astrocytes or microglia cells. We also demonstrate that the knockdown of FGF21 into the MBH aggravates 3 days HFD-induced hypothalamic gliosis, glucose intolerance and insulin resistance. The protective effect of FGF21 is consolidated in cultured neural cells, where FGF21 reduces palmitate-induced inflammation. Collectively, our findings reveal the MBH FGF21 as a critical regulator of the early onset of HFD-induced hypothalamic gliosis and insulin resistance.

---

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Adult male C57BL/6J mice (Janvier Labs, Le Genest-St-Isle, France), were housed under specific pathogen-free conditions in a temperature-controlled environment (21-22°C) with a

12-h light/dark cycle and had free access to water and food. Mice were fed with normal chow diet (CD; 19.6% proteins, 8.4% lipids, 72.4% carbohydrates) or a high-fat diet (HFD) with 60% kcal from fat (16.7% proteins, 59.5% lipids, 22.1% ENA; 292HF SAFE, Augy, France), for 3 or 8 days. Animals weight and food intake were daily measured. All experimental procedures were performed according to the institutional guidelines for animal use specified by the European Union 609 Council Directive (2010/63/EU), and approved by the French Ethics Committees for the Care and Use of Experimental Animals (C2EA, 59 Committee Paris Centre et Sud; authorization n° 27899)

#### **AAV2-GFP-U6-scramble-shRNA and AAV2-GFP-U6-mFGF21-shRNA delivery.**

AAV2-EGFP-U6-scramble-shRNA (VB180117-1020znr) and AAV2-EGFP-U6-mFGF21-shRNA (VB191122-5441cvh) were from VectorBuilder (Chicago, USA). C57BL/6J mice were anesthetized with 0.5–2.0% isoflurane in 95% O<sub>2</sub> /5% CO<sub>2</sub> mixture and placed in a stereotaxic frame. AAV2-shRNA viruses (1µl at 10<sup>12</sup> GC/ml) were injected (over 10min), both, into the third ventricle (anteroposterior, –1.7 mm; 0 mm from midline; dorsoventral, – 5.6 mm) and bilaterally in the hypothalamic ARC nucleus (anteroposterior, –2.18 mm; mediolateral, ±0.25 mm; dorsoventral, –5.6 mm). Mice were allowed three weeks of recovery after AAV2-ShRNA injections; and then subjected to 3-days HFD. At the end of the HFD challenge, the mice were transcardially infused with 4% PFA, and the brains were removed and processed for immunofluorescence and confocal microscopy analyses.

#### **Glucose tolerance test (GTT).**

Overnight fasted mice were intraperitoneally (ip) injected with glucose (2g/kg of body weight) and blood samples were collected through their tail vein (n = 5–7/group). Blood glucose level was determined before and 15, 30, 60, 90, 120 min after glucose challenge using glucometer (Accu-Check system, Roche).

#### **Fluorescent immunohistochemistry**

Mice under anesthesia were infused with 4% paraformaldehyde (PFA) solution. Brains were collected, post-fixed in PFA 4%, cryoprotected in 20% sucrose solution for 48 hours and frozen in -40°C cooled isopentane solution. Brain coronal sections (20µM thickness) through the hypothalamus were then subjected to standard immunohistochemistry protocol. Briefly, brain sections were first incubated with NH<sub>4</sub>Cl (50mM) for 20min and blocked/permeabilized with PBS solution containing 0.2% fish gelatin, 0.1% TritonX100, 2% normal donkey serum, for 1h30 at room temperature. The sections were incubated for 48h at 4°C with: rabbit anti-FGF21 (1/250); rabbit anti-FGFR1 (1/400); rabbit anti-KLB (1/100); rabbit anti-IBA1 (1/2000); mouse anti-GFAP (1/500); mouse anti-NeuN (1/400) ; chicken anti-Vimentin (1/1000) primary antibodies and then incubated with the appropriate fluorescent secondary antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (1/300 Sigma-Aldrich). Images were acquired using a Zeiss LSM-700 confocal microscope. Z stacks containing 7 Z section images were analyzed using Zen imagine software (Zeiss) and reconstructed in Image J 1.52p (NIH). Quantification of fluorescence intensity was performed in a blinded fashion using ImageJ software. Both sides of

bilateral structures of the ARC were quantified on 3 slides per animal, and replicate values from each animal were individually averaged.

For rabbit anti-FGF21 immunoreactivity detection, it is necessary to realize an antigen unmasking with citrate buffer (sodium citrate 10mM, 0.05% Tween20; pH=6) during 7min at 90°C before the use of NH<sub>4</sub>Cl. Then the protocol is the same as standard immunolabelling.

### **Production of mouse *FGF21* probe**

Mouse mRNAs (1µg) were reverse transcribed using qScript reverse transcriptase kit (Quantabio 95047-100). *Fgf21* cDNA was amplified by PCR with palindromic sequences of EcoR1 or BamH1 at extremities and purified (QIAquick Spin Handbook kit). In the same time the PSPT[amp<sup>r</sup>] plasmid was cleaved by EcoR1 and BamH1. The insert and plasmid were purified on gel (QIAquick® Spin Handbook gel extraction kit). Then the ligation of insert and PSPT[amp<sup>r</sup>] according to the manufacturer's instructions and were transfected in E.Coli DH5α by thermal shock. Resistant clones to ampicillin, so transfected with PSPT[amp<sup>r</sup>]+*Fgf21*, were isolated and cultured in LB with ampicillin (1/1000) overnight at 37°C. Plasmids were purified according to manufacturer's recommendations of Maxiprep kit (PureLink HiPure Plasmid Filter DNA Purification kit ; Invitrogen). The sequence to FGF21 was checked by sequencing, and then transcribed in vitro.

### **Combined *in situ* Hybridization and Immunohistochemistry.**

Hypothalamic Fluorescent in situ hybridization (FISH) was performed using FGF21 mRNA probe to characterize FGF21 expression. In addition, FGF21 FISH was combined to immunofluorescence using Iba1, GFAP, Vimentin, or NeuN antibodies that are markers for microglia, astrocytes, tanycytes or neurons, respectively. Briefly, a total of 150ng/mL of purified digoxigenin (DIG) FGF21 RNA probes was hybridized to 20µm thick brain coronal sections. Hybridization was performed at 65°C for 16h in hybridization solution: 50% formamide, 5x SSC, 5,6% Denhardt's, 10% dextran sulfate, 200µg/mL yeast RNA. Afterward, brain sections were washed and blocked/permeabilized in PBS solution containing 0.2% Triton X-100, 10% BSA, and 2% sheep serum for 1h30 at room temperature and then incubated overnight with anti-digoxigenin-AP 31 (Roche Diagnostics) and primary antibodies. After washing, the sections were incubated for 2h at RT with the appropriate secondary antibodies. Then, FISH detection using the tyramide signal amplification (TSA-Cy5, Perkin Elmer) methods was performed according to the manufacturer's recommendations. 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.

### **Primary culture and cell line experiments.**

#### **Primary tanycyte cultures and treatments**

Tanycytes were isolated from the median eminences (ME) of the hypothalamus of 10-day-old rats and cultured as previously described (Prevot et al 2003). Briefly, after decapitation and removal of the brain, MEs were dissected and dissociated cells were cultured in DMEM

medium (Invitrogen) supplemented with 10% SVF, 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen); under a humid atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>/95% air at 37 °C. Culture medium was changed every 2days. On reaching confluence, tanocytes were isolated from contaminant cells by overnight shaking at 250 r.p.m. at 37 °C and either replated in 12-well culture. Serum-starved cells were incubated with or without Palmitate (200µM), FGF21 (10nM) or Palmitate + FGF21 for 16h. Cells were then washed twice with ice-cold PBS before RNA extraction (Benomar et al., 2013).

### **Primary culture of mouse astrocytes**

Hypothalamic primary cultured astrocytes were prepared from adult C57BL/6 mice as previously described (Sun, X., et al. 2017). In brief, hypothalami were dissected, minced, and incubated in HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) containing 0.05% trypsin for 15 min at 37°C. Enzyme-digested tissue was then mechanically dissociated for 15min using a Pasteur pipette and centrifuged at 300g for 5min. The pellet was suspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% heat- 32 inactivated fetal calf serum (FCS), 1% L-glutamine, and 1% of penicillin-streptomycin (both from Invitrogen). The cells were plated on a poly-L-lysine-coated culture flask and cultured at 37°C in a 95% air / 5% CO<sub>2</sub> incubator with the medium changed every 3 days. After 7 days, the flask was shaken, at 240rpm for 8h to remove contaminants cells. Adherent astrocytes were maintained in astrocyte-specific medium until confluence. The cells were then detached from the culture flask and plated in poly-L-lysine-coated 24-well plates. 24h before experiments, the cells were serum starved and stimulated for 16h with or without FGF21 (10nM), Palmitate (300µM) or Palmitate+FGF21. Cells were then washed with ice-cold PBS before RNA extraction (Benomar et al., 2013).

### **Cell line culture and stimulation:**

Adult mouse hypothalamic neuronal cells (mHYPO) and mouse microglial cells (Sima9) were grown in DMEM medium and in mix DMEM/F12 supplemented with: 10% of FBS, 2 mmol/L of l-glutamine, 100 units/mL of penicillin, and 100 µg/mL of streptomycin in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere at 37°C. At 90% confluence, cells were serum starved overnight and incubated for 16h with or without FGF21 (10nM) (Prospec, Rehovot, Israel), palmitate (500µM) (Sigma) or Palmitate +FGF21.

### **RNA Extraction and Quantitative RT-PCR**

Total RNAs from mice tissues and cells were 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, Villebon-sur-Yvette, France). 1µg of total RNA was reverse transcribed and the cDNAs were submitted to quantitative real-time PCR analysis using specific primer pairs (Eurofins) listed in Supplemental Table 1. The PCR was performed using the Step One apparatus (Applied Biosystems), using Fast SYBR Green Master Mix (Ozyme, France). Relative gene expression

levels were determined using the comparative threshold cycle (CT), which was normalized to the CT of GAPDH or 18S using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

### **Data analysis and statistics**

For *in vivo* studies, the “n” in figures legends correspond to the number of animals per group. For *in vitro* studies, the “N” indicates the number of independent experiments carried out with each condition in triplicate (n=3). Differences between control group and one experimental group are analyzed using Mann-Whitney test. For multiple comparisons between groups we use a Kruskal-Wallis test. Statistical significance was defined as \*p<0.05. Data are shown as mean  $\pm$ SEM for histograms, or as distribution boxplots including medians and the outliers.

---

## **RESULTS**

### **Mediobasal hypothalamic Neurons and tanycytes express FGF21, FGFR1 and KLB**

Firstly, we tested the specificity of the probe used by comparing sense (negative control) and antisense-*FGF21* probe (fig 1A). FISH analysis using antisense-*FGF21* probe reveals *FGF21* mRNA expression in the MBH particularly in the arcuate nucleus (ARC), median eminence and in cells lining the third ventricle (Figure 1A and 1B). Lower *FGF21* mRNA expression was detected in the dorsomedial hypothalamus (DMH) and ventromedial hypothalamus (VMH) (Figure 1B) as evidenced by the quantification of *FGF21* mRNA immunofluorescence intensity (Figure 1C). In addition, Immunohistochemical (IHC) analysis reveals FGF21 immunoreactivity was detected and quantified in the MBH, the DMH and the VMH nuclei, as well as in cells lining the third ventricle (Figure 1D, 1E). To characterize cells expressing FGF21 mRNA, combined FISH and IHC was used. We found that *FGF21* mRNA expression co-localized with NeuN and Vimentin revealing the expression of *FGF21* mRNA in neurons and tanycytes, respectively (figure 1F). In contrast, *FGF21* mRNA does not co-localize with GFAP or Iba1 indicating that astrocytes and microglial cells, respectively, do not express FGF21 (Figure 1G). FGF21 protein expression was also detected in neurons and tanycytes of the MBH, where FGF21 protein co-localizes with NeuN and Vimentin (Figure 1H). Besides, neurons, tanycytes, astrocytes and microglial cells express the functional FGF21 receptor consisting of FGFR1 and KLB as evidenced by the co-localization of FGFR1 and KLB with respectively NeuN (figure 2A, 2E), Vimentin (Figure 2B, 2F), GFAP (Figure 2C, 2G) and IBA1 (Figure 2D).

### **Short-term HFD consumption induces MBH gliosis and glucose intolerance**

To investigate the impact of short-term HFD consumption on hypothalamic inflammation and glucose homeostasis, mice were fed a normal chow diet (CD) or an HFD for 3 (3-days HFDHFD) or 8 days (8-days HFD). IHC analyses reveal that mice fed HFD during 3 or 8 days

exhibit a significant increase of GFAP fluorescence intensity evidencing an MBH astrogliosis (Figure 3A and 3B). The impact of short-term HFD on MBH microgliosis was also assessed. IHC analyses reveal activated microglial cells in the MBH of both 3-days and 8-days HFD fed mice (Figure 3A) associated with a significant increase of both the number IBA1 positive cells (Figure 3C) and the perimeter of their soma (Figure 3D), and the diminution of both total filament length (Figure 3E) and the number of terminals (Figure 3F). We then investigated whether the MBH microgliosis and astrogliosis are associated with changes in metabolic parameters. Indeed, we show the increase in caloric intake of 3-days HFD and 8-days HFD mice as compared to CD mice (Figure 3G) concomitant with increase body gain weight in 3-days HFD mice and this increase is attenuated in 8-days HFD mice (Figure 3H).

Glucose tolerance was also assessed. We show that 3-days HFD mice display higher basal glucose level and marked glucose intolerance as compared to both CD (Figure 3I-L). Moreover, we show that this glucose intolerance is maintained after 8-days of HFD (Figure 3J and 3K).

### **Short-term HFD consumption increases FGF21 expression within the MBH**

Next we investigated the measured the expression levels of FGF21 in response to short-term HFD in the MBH. FISH analyses revealed a marked increase of *FGF21* mRNA expression in the MBH neurons and tanycytes of both 3-days and 8-days HFD mice as compared to CD mice as evidenced by the respective colocalization of FGF21 mRNA with NeuN (Figure 4A, 4B) or Vimentin (Figure 4C, 4D). Besides, IHC analyses reveals that the protein levels of KLB (Figure 4E, 4F) and FGFR1 (Figure 4G, 4H) remain unchanged if the MBH of both 3-days and 8-days HFD mice as compared to CD mice.

### **FGF21 deletion in the MBH exacerbates deleterious effects of short-term HFD consumption.**

To establish the role of MBH FGF21 in short-term HFD induced MBH inflammation and glucose intolerance, we knocked down MBH FGF21 expression by means of stereotaxic injection of GFP-AAV2-FGF21-shRNA both in the 3V and bilaterally into the ARC nucleus as mentioned in the schema (Figure 5A). A representative GFP expression pattern of AAV2-GFP in the MBH is shown in Figure 5B. Scrambled shRNA was used as a Control (GFP-AAV2-Sham-shRNA). FISH evaluated the efficiency of FGF21 knockdown in the MBH and we show a significant decrease of MBH FGF21 expression at both mRNA (Figure 5C) and protein levels (Figure 5D). We also show that the specific knockdown of FGF21 in the MBH exacerbates short-term HFD-induced MBH astrogliosis as evidenced by increased GFAP immunostaining (Figure 5E and 5F) in the ARC nucleus and median eminence (ME) of FGF21shRNA treated mice. Besides, we found that MBH FGF21 deletion increases the number of IBA1 positive cells (Figure 5G) without changes in soma perimeters (Figure 5H, 5E). The number and length of microglia cells terminals are significantly reduced in the ARC of Sh-FGF21 treated mice evidencing microglia activation (Figure 5E, 5J).



Next, we investigated the impact of MBH FGF21 knockdown on peripheral glucose homeostasis and insulin sensitivity. In mice fed Chow diet, the knockdown of FGF21 induced glucose intolerance (Figure 5K and 5L) without changes of basal glycemia (Figure 5M), food intake (Figure 5N) and body weight gain (Figure 5O). Whereas, in mice fed a HFD during 3 days, the specific deletion of FGF21 in the MBH aggravates glucose intolerance (Figure 5P and 5Q) and markedly increased basal glycemia (Figure 5R), body weight gain (Figure 5T) and both visceral and subcutaneous adipose tissue mass (Figure 5V) without changes in energy intake (Figure 5S). The knockdown of MBH FGF21 also exacerbates whole body insulin resistance of 3-days HFD fed mice as evidenced by the loss of the hypoglycemic effect of insulin in Sh-FGF21 treated mice (Figure 5U).

### **FGF21 prevents palmitate-induced inflammatory responses in neurons and tanycytes.**

Using adult mouse hypothalamic neurons (mHYPO) and primary culture of tanycytes, we further investigated whether FGF21 modulates palmitate-induced inflammation. We show that FGF21 treatment markedly reduced palmitate-induced inflammation in both cells as evidenced by significant diminution of IL-6 and IL-1 $\beta$  gene expression in mHYPO cells (Figure 6A, 6B), and IL-6 and TNF- $\alpha$  in tanycytes (Figure 6F, 6G). Besides, FGF21 pretreatment also reduced the inflammatory response induced by palmitate in microglia cell line Sima9 (Figure 6C-E) and astrocytes (Figure 6H-6J). These was evidenced by significant inhibition of palmitate-induced IL-6, TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

---

## **DISCUSSION**

HFD consumption triggers inflammatory response in the central nervous system, specifically in the hypothalamus (6-9). Unlike peripheral inflammation, which occurs as a consequence of obesity, hypothalamic inflammation develops acutely and selectively in the MBH within the first days of HFD consumption contributing to insulin resistance, glucose intolerance and neuronal injuries (13-16). The implicated mechanisms of short-term HFD induced MBH inflammation remain unclear and poorly documented. Here, we show that MBH FGF21 plays an important role in the early regulation of MBH inflammation induced by short-term HFD. Indeed, short-term HFD consumption markedly increased *FGF21* mRNA and protein expressions in the MBH specifically in tanycytes and ARC neurons. Importantly, the selective deletion of *FGF21* mRNA in the MBH aggravates 3-day HFD-induced MBH gliosis, glucose intolerance and insulin resistance. Besides, in vitro studies using primary culture of astrocytes and tanycytes and mouse hypothalamic neuronal and microglial cells lines demonstrate that cells exposure to FGF21 prevents the palmitate-induced inflammation.

Now, many studies consider the MBH inflammation as a key component of the early onset of both neuronal and metabolic disorders induced by short-term HFD consumption (1, 4, 15, 16).

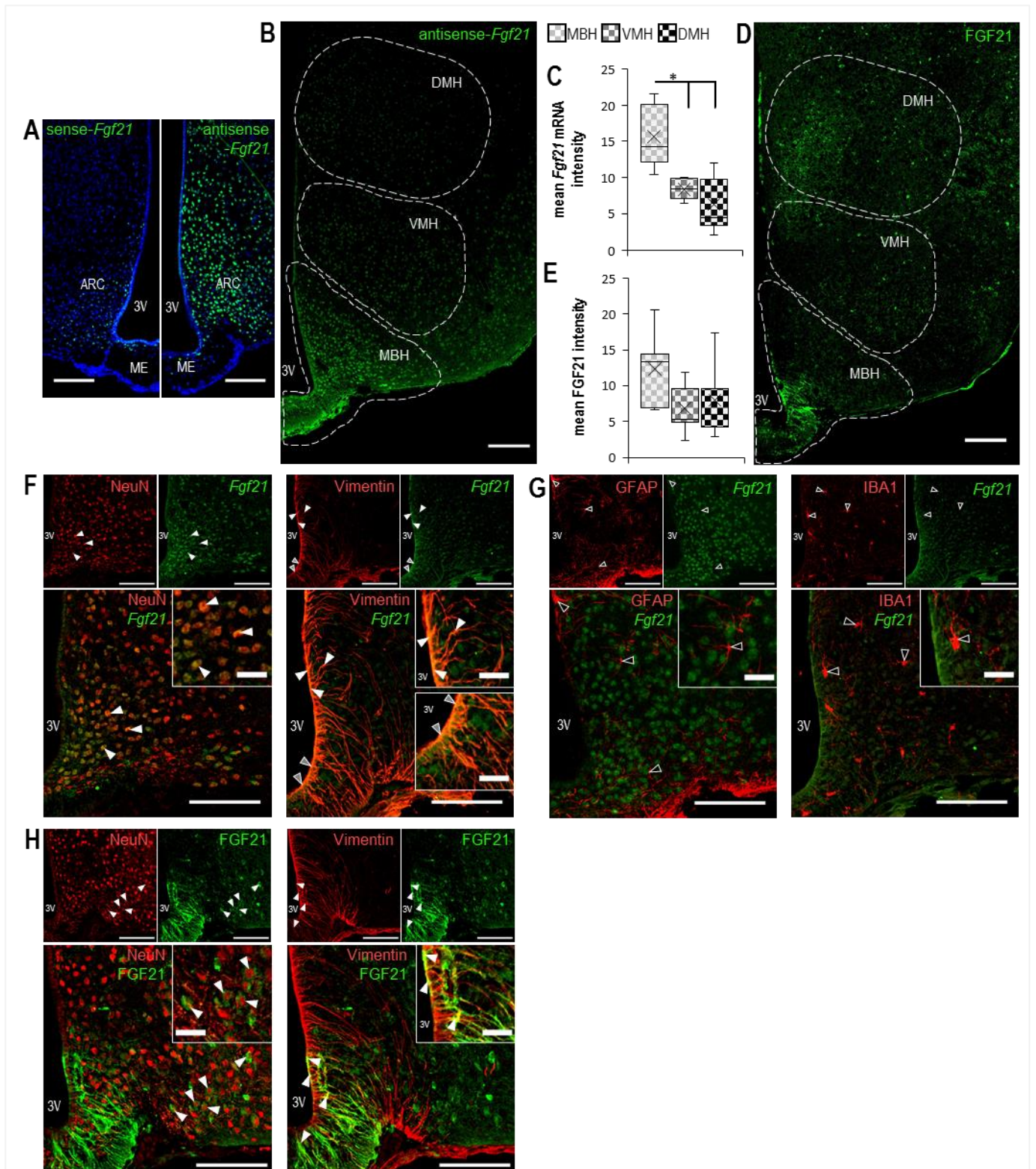
Additionally, it is recognized that short-term HFD induced microgliosis and astrogliosis contribute to the dysfunction of many hypothalamic signaling pathways implicated in the regulation of energy homeostasis (8, 14). Accordingly, we show here that HFD consumption for 3 and 8 days enhanced both astrogliosis and microgliosis within the MBH as evidenced by a significant increase in the area covered by GFAP-positive astrocytes and the number of Iba1-positive microglia accompanied with microglia morphological changes. The short-term HFD consumption also affects peripheral metabolic regulation promoting the onset of insulin resistance and the impairment of glucose homeostasis (31, 32). In agreement with these findings, we report that mice fed HFD for 8 days exhibit glucose intolerance. Our findings provide further evidence linking short-term HFD consumption and the early onset of hypothalamic inflammation and related metabolic dysfunctions. In this context, the hepatokine FGF21, has recently emerged as a promising therapeutic target in obesity and T2D because of its insulin-sensitizing and anti-inflammatory properties (18). Besides its peripheral expression, FGF21 was recently detected in several mouse brain areas, notably in the hypothalamus (30, 33, 34). Nevertheless, the role of hypothalamic FGF21 remains largely unknown. As previously reported, we detected *FGF21* mRNA and protein expressions, in the hypothalamus of mice especially within ARC, DMH and VMH nuclei. In the MBH, we showed a marked FGF21 expression in the median eminence and in tanycytes as recently reported by Geller *et al.* (30). In addition, high FGF21 expression was also found in ARC neurons, whereas MBH astrocytes and microglia cells do not express FGF21. Importantly, we show that short-term HFD exposure for 3 and 8 days strongly increases both tanycytic and neuronal *FGF21* mRNA expression. The upregulation of FGF21 positively correlates with hypothalamic inflammation suggesting the potential involvement of hypothalamic FGF21 in the early regulation of MBH inflammation and gliosis in response to short-term HFD consumption. In line with this hypothesis, recent studies reported that central FGF21 protects against neuronal injury (35) and inhibits HFD-induced neuroinflammation (35, 36). Conversely, FGF21 deficiency aggravates obesity-induced hypothalamic inflammation leading to the impairment of neuronal circuits controlling energy metabolism (24). Consistent with these interpretations, we demonstrate here that the specific knockdown of FGF21 in the MBH, through ICV injection of AAV2-FGF21-shRNA, aggravates short-term HFD-induced MBH microgliosis and astrogliosis evidencing the involvement of hypothalamic FGF21 in the early regulation of HFD-induced MBH inflammation.

Besides, FGF21 acts on the brain to regulate lipid metabolism. FGF21 induces a sympathetic stimulation of WAT and BAT resulting in increased energy expenditure and reduced fat accumulation (19,22 37,38,39). Consistent with these findings, we show here that MBH FGF21 knockdown mice exhibit increased body weight gain and adipose mass without changes in food intake suggesting a crucial role of MBH FGF21 in the central regulation of lipid metabolism. More recently, it has been shown, in lean mice, that tanycytic FGF21 deletion increases energy expenditure and reduces fat accumulation (30). The apparent discrepancy of results between this study and our finding could be attributed to the difference in the metabolic status of animals (HFD vs normal fed) as well as the chosen site for targeted FGF21 deletion (third ventricle, versus MBH). Besides, the selective knockdown of FGF21 in the MBH exacerbates 3 days HFD-induced glucose intolerance and insulin resistance.

According to our findings and previous studies reporting the expression of FGF21 and its receptors FGFR1 and KLB in the hypothalamus (30, 40), we raised the question about the FGF21-targeted cells within the MBH. Using primary culture of tanycytes and hypothalamic neuronal cell line, we have shown that overexposure to FGF21 prevents palmitate-induced both tanycytic and neuronal inflammation. Besides, FGF21 treatment inhibits the inflammatory response induced by palmitate in microglia cell line and in primary cultured astrocytes. These data support our *in vivo* findings and suggest that FGF21 could regulate hypothalamic inflammation via autocrine/paracrine mechanisms preventing inflammatory response within the MBH. Indeed, FGF21 produced by tanycytes and neurons could have autocrine effects on tanycytes and neurons, and paracrine effects on astrocytes and microglia cells to prevent MBH inflammation. Thus, hypothalamic FGF21 constitutes a key mediator of the intercellular crosstalk among MBH-neural cells.

In summary, our study provides substantial evidences for the crucial role of MBH FGF21 in the early regulation of hypothalamic inflammation and subsequent metabolic complications induced by short-term HFD. Further investigations are needed to establish, *in vivo*, the hypothalamic circuits mediating MBH FGF21 action.

## FIGURES AND LEGENDS



**Figure 1 - FGF21 is specifically expressed by neurons and tanycytes of the medio-basal hypothalamus**

**Figure 1 - FGF21 is specifically expressed by neurons and tanycytes of the medio-basal hypothalamus.**

Data obtained from 8 weeks old wild-type C57BL/6J mice, fed with chow diet (CD).

(A) Coronal sections of the medio-basal hypothalamus (MBH : median eminence (ME) and ARC nucleus (ARC)). Images of *in situ* hybridization, showing specificity of *Fgf21* probe. The left panel illustrates the negative control (sense-*Fgf21* probe (green)), and the right one illustrates the specific probe of *Fgf21* mRNA (T7 : anti sense-*Fgf21* probe (green)), DAPI in blue; Scale bars = 100µm.

(B,E) Coronal sections of the hypothalamus showing the (B) gene and (D) protein expression profile of FGF21 in three hypothalamic nuclei (MBH, VMH, DMH). In each nucleus, the expression levels of mRNA (ISH experiment) or FGF21 protein (immunohistochemistry experiment) were quantified by the fluorescence intensity of the *Fgf21* mRNA-specific ISH probe label (C) and anti-FGF21 antibody (E). Kruskal Wallis test (n=5), \*p=0,01 ; Scale bars = 150µm.

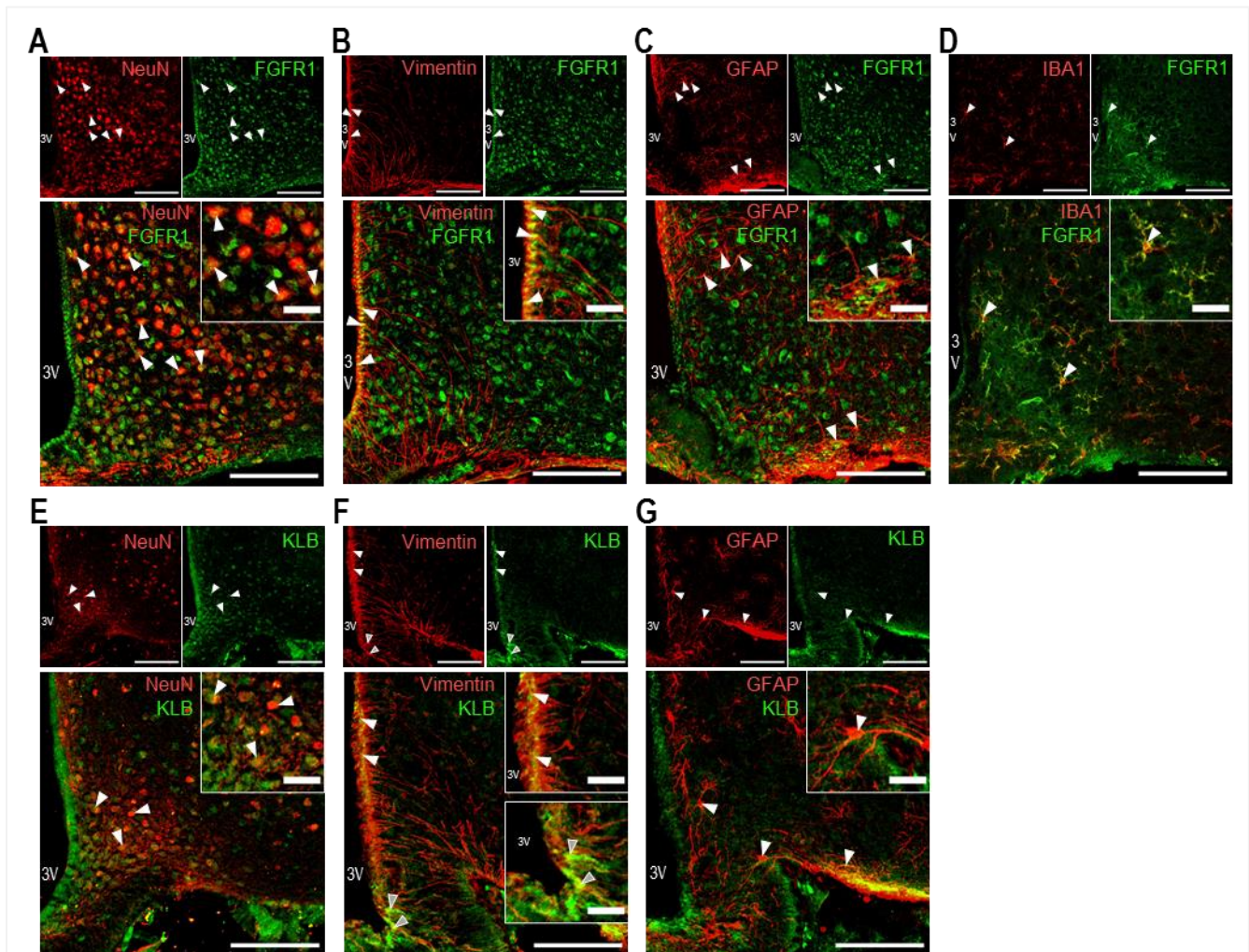
(F-G) Characterization of *Fgf21* mRNA expression in neurons (NeuN-labeling), tanycytes (Vimentin-labeling), astrocytes (GFAP-labeling) and microglial cells (IBA1-labeling) in MBH. *Fgf21* label (green) is merged with cell types specific label (red). In the top right corner of each image, an inset shows zoomed region. These images result from the combination of *in situ* hybridization and immunohistochemistry. Scale bars = 100µm; Insets scale bars = 25µm. Full arrows indicate co-labeling in neurons and tanycytes whereas empty arrows indicate no co-labelling in astrocytes and microglial cells.

(H) FGF21 label (green) is merged with cell types specific label (red). Left: co-expression of FGF21 protein and NeuN (neurons). Right: co-expression of FGF21 protein and Vimentin (tanycytes). Images obtained by immunohistochemistry in the MBH. In the top right corner of each image, an inset shows region at high magnification.

All images obtained with x20 objective confocal microscopy.

vWAT (visceral white adipose tissue), 3V (third ventricle), VMH (ventromedial hypothalamus), DMH (dorsomedial hypothalamus)



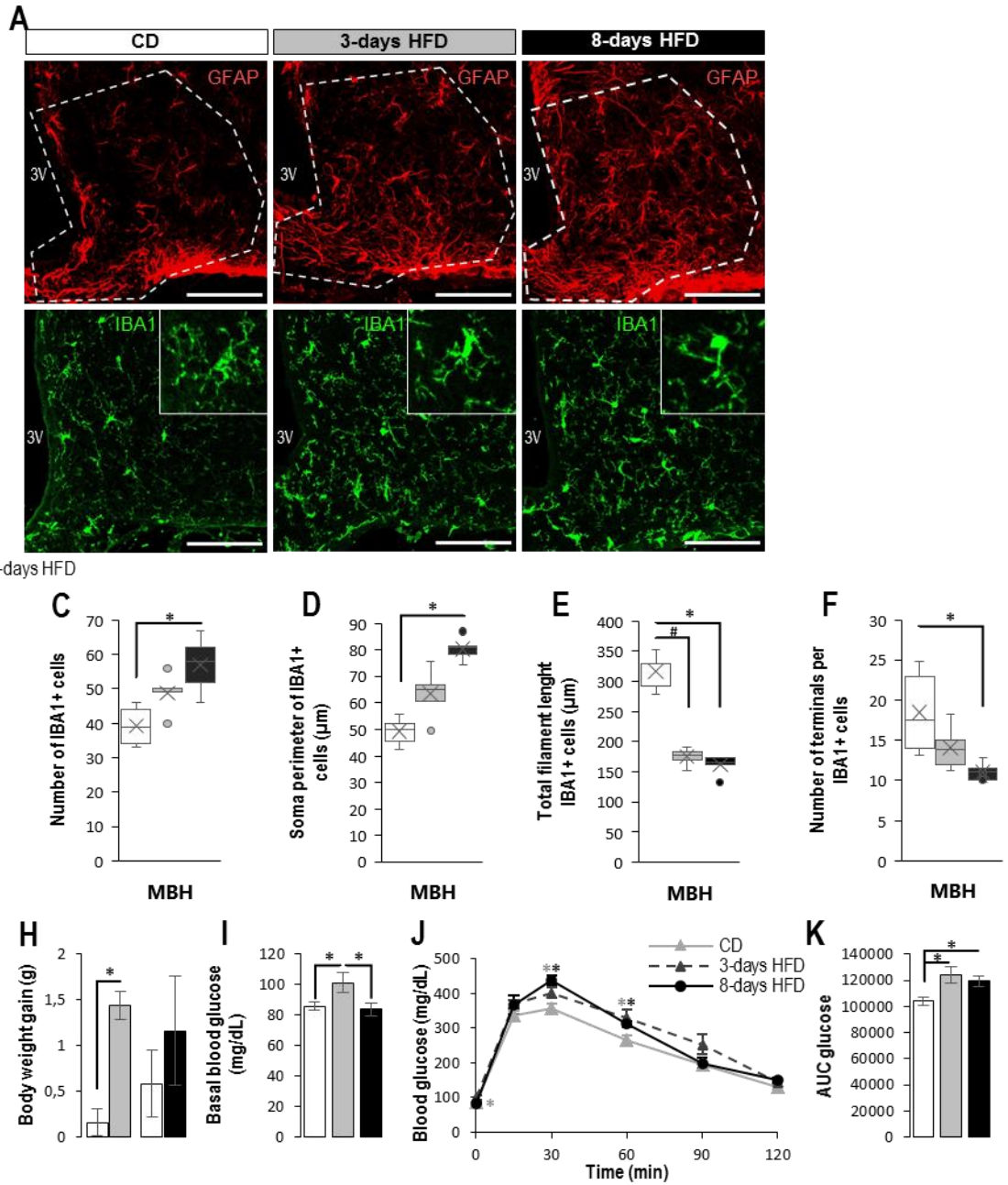


**Figure 2 - FGFR1 and KLB are expressed by neurons and glial cells of the MBH.**

Immunohistochemical labelings show that the FGF21 receptors are mainly expressed by neurons and tanocytes, but they are also expressed weaklier by astrocytes and microglial cells, in the MBH of mice fed with CD.

(A-D) FGFR1 and (E-G) KLB labels (green) are merged with cell types specific label (red). (A) co-expression of FGFR1 protein and NeuN (neurons), (B) and Vimentin (tanocytes), (C) and GFAP (astrocytes), (D) and IBA1 (microglial cells).

(E) co-expression of KLB protein and NeuN, (F) and Vimentin, (G) and GFAP. Images obtained by immunohistochemistry in the MBH of mice fed with CD. In the top right corner of each image, an inset shows region at high magnification. All images are obtained with a x20 objective confocal microscopy. Scale bars = 100µm; Insets scale bars = 25µm. Full arrows indicate example co-labeled neurons, tanocytes, astrocytes and microglial cells.



**Figure 3 – Short-term HFD consumption induces MBH gliosis and glucose intolerance**

### **Figure 3 – Short-term HFD consumption induces MBH gliosis and glucose intolerance**

8 weeks old wild-type C57BL/6J mice were fed with a CD (white) or a high fat diet (HFD : 60% calories from fat) for 3 (grey) or 8 (black) days.

(A) GFAP-stained astrocytes (red) and IBA1-stained microglia (green) in the MBH, obtained by immunohistochemistry. In the top right corner of IBA1-labeling. Inset : a typical microglial cell showing characteristic of its general activation level. On the GFAP-labeling, the region used for astrocytes quantifications in the MBH is delineated by the dotted white line. Scale bars = 100 $\mu$ m.

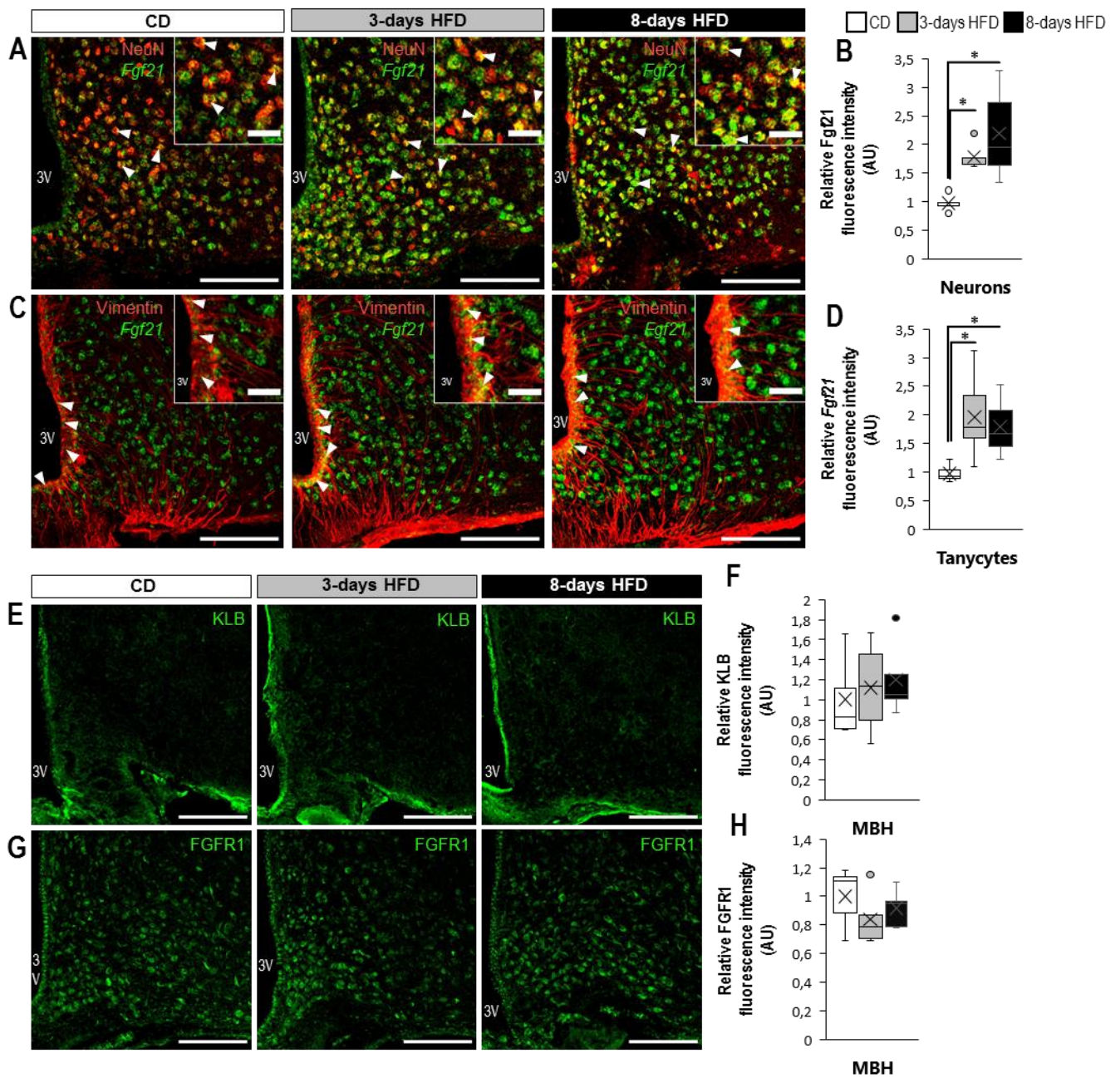
(B) Astrocyte activation quantified as GFAP fluorescence intensity in the MBH.

(C-F) Morphological parameters of microglia cells in the MBH : (C) number of IBA1+ cells, (D) soma perimeter, (E) filament length, (F) number of terminals. For filament length and number of terminals, 10 cells were randomly selected for each image (3 images per animal).

(G) food intake, (H) body weight gain, (I) basal blood glucose level after a 16h fast, (J) GTT after i.p. glucose infusion (2g/kg), (K) AUC of GTT.

All images obtained with x20 objective confocal microscopy. (G-I, K) Data are represented as mean  $\pm$ SEM, Mann-Whitney test (n=9 for CD and 3-days HFD groups ; n=5 for 8-days HFD group), (B-F) Kruskal-Wallis test (n=5), \*p<0,05 and #p<0,1.





**Figure 4 - 3-days of HFD increases *Fgf21* mRNA expression in MBH neurons and tanycytes.**

**Figure 4 - 3-days of HFD increases *Fgf21* mRNA expression in MBH neurons and tanycytes.**

8 weeks old wild-type C57BL/6J mice were fed with a CD (white) or a HFD (60% calories from fat) for 3 (grey) or 8 (black) days.

(A) Effect of 3 or 8 days of HFD on neuronal *Fgf21* mRNA expression. The *Fgf21* label (green) is merged with neuronal marker (NeuN in red) in the MBH. In the top right corner of each image, an inset shows a high magnification region where cells co-expressed *Fgf21* and NeuN. These images result from the combination of *in situ* hybridization (*Fgf21*-labelling) and immunohistochemistry (NeuN-labelling).

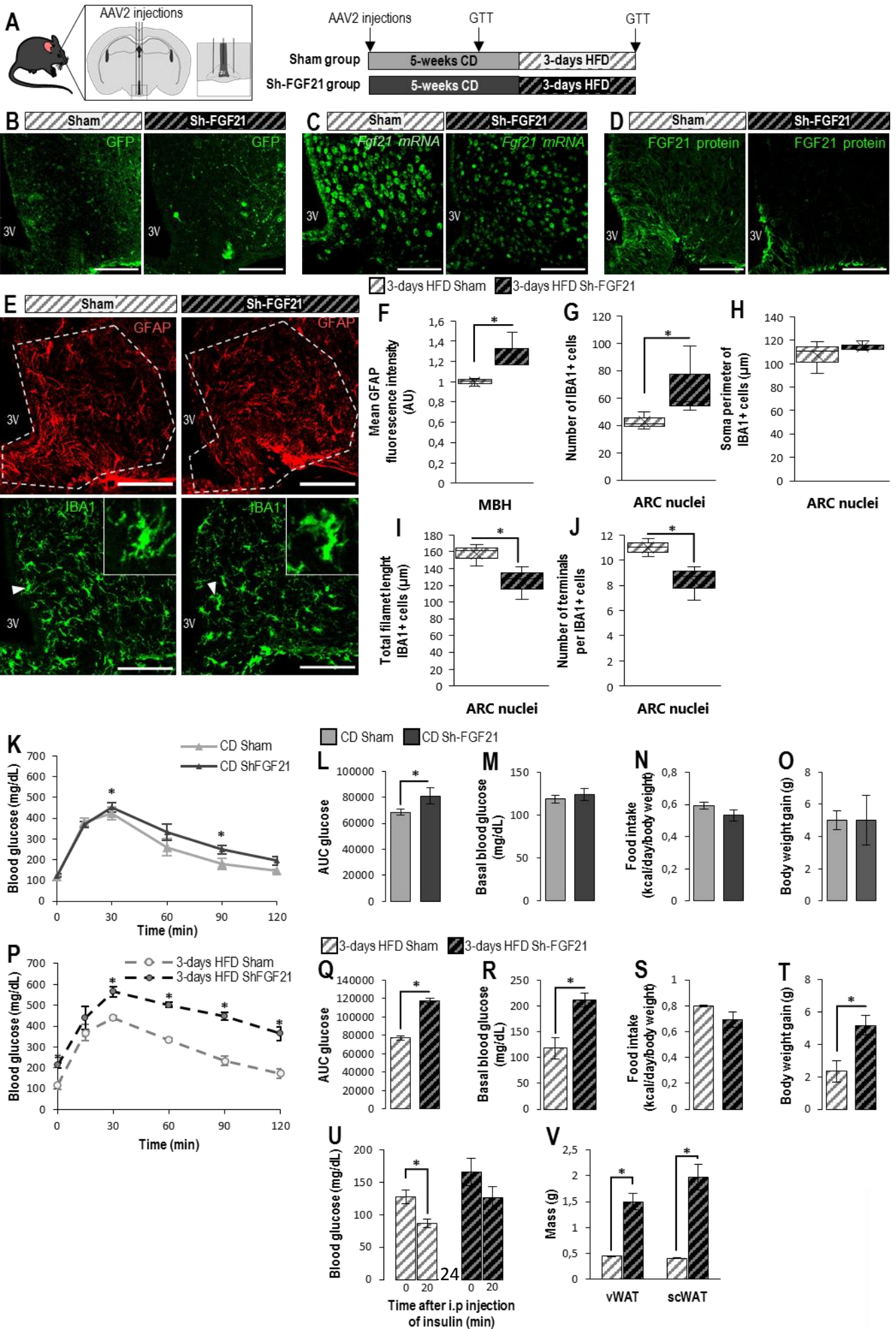
(B) Quantification of relative FGF21 fluorescence intensity in neurons, to estimate the *Fgf21* mRNA expression in this MBH cell population (single data point represent average across 4 sections per animal).

(C) Effect of 3 or 8 days of HFD on *Fgf21* mRNA expression in tanycytes. The *Fgf21* label (green) is merged with tanycyte marker (Vimentin in red) in the MBH. In the top right corner of each image, an inset shows a high magnification region where cells co-expressed *Fgf21* and Vimentin. These images result from the combination of *in situ* hybridization and immunohistochemistry.

(D) Quantification of relative FGF21 fluorescence intensity in tanycytes, to estimate the *Fgf21* mRNA expression in this MBH cell population (single data point represent average across 4 sections per animal).

(E-H) No effect of HFD on local FGFR1 and KLB protein in the MBH. Immunohistochemistry images show the KLB protein (E) and FGFR1 protein (G). Quantification of the relative KLB (F) or FGFR1 (H) fluorescence intensity in the MBH to estimate the impact of HFD on their protein expression levels in this region (single data point represent average across 2 sections per animal).

All images obtained with x20 objective confocal microscopy. Scale bars = 100µm; Insets scale bars = 25µm. Full arrows indicate co-labeling in neurons or tanycytes. Kruskal-Wallis test, \*p<0,05 (n=5) except for KLB (n=4).



**Figure 5 - FGF21 deletion in the MBH exacerbates 3-days HFD-induced hypothalamic reactive gliosis, glucose intolerance and insulin resistance.**

(A) Diagram of experimental protocol : male C57BL/6J mice fed with chow diet (CD) received an i.c.v infusion of AAV-GFP containing either shRNA-Scramble (Sham: plain light grey) or shRNA-FGF21 (plain dark grey), in each ARC nucleus. After 5 weeks, these mice diets are switched to HFD (60% calories from fat) for 3 days (Sham: grey/white and sh-FGF21: dark grey/black). Two GTTs performed, the first during CD period and the second after 3-days HFD. (B) AAV-GFP expressions (auto-fluorescence of GFP) in the MBH, (C) *Fgf21* mRNA expression (*in situ* hybridization) and (D) FGF21 protein expression (immunohistochemistry) of mice after 3-days HFD (left panel : AAV shRNA Scramble (Sham) and right panel : sh-FGF21).

(E) GFAP-stained astrocytes (red) and IBA1-stained microglia (green) in the MBH, obtained by immunohistochemistry. In the top right corner of IBA1-labeling. Inset : a typical microglial cell showing characteristic of its general activation level. On the GFAP-labeling, the region used for astrocytes quantifications in the MBH is delineated by the dotted white line.

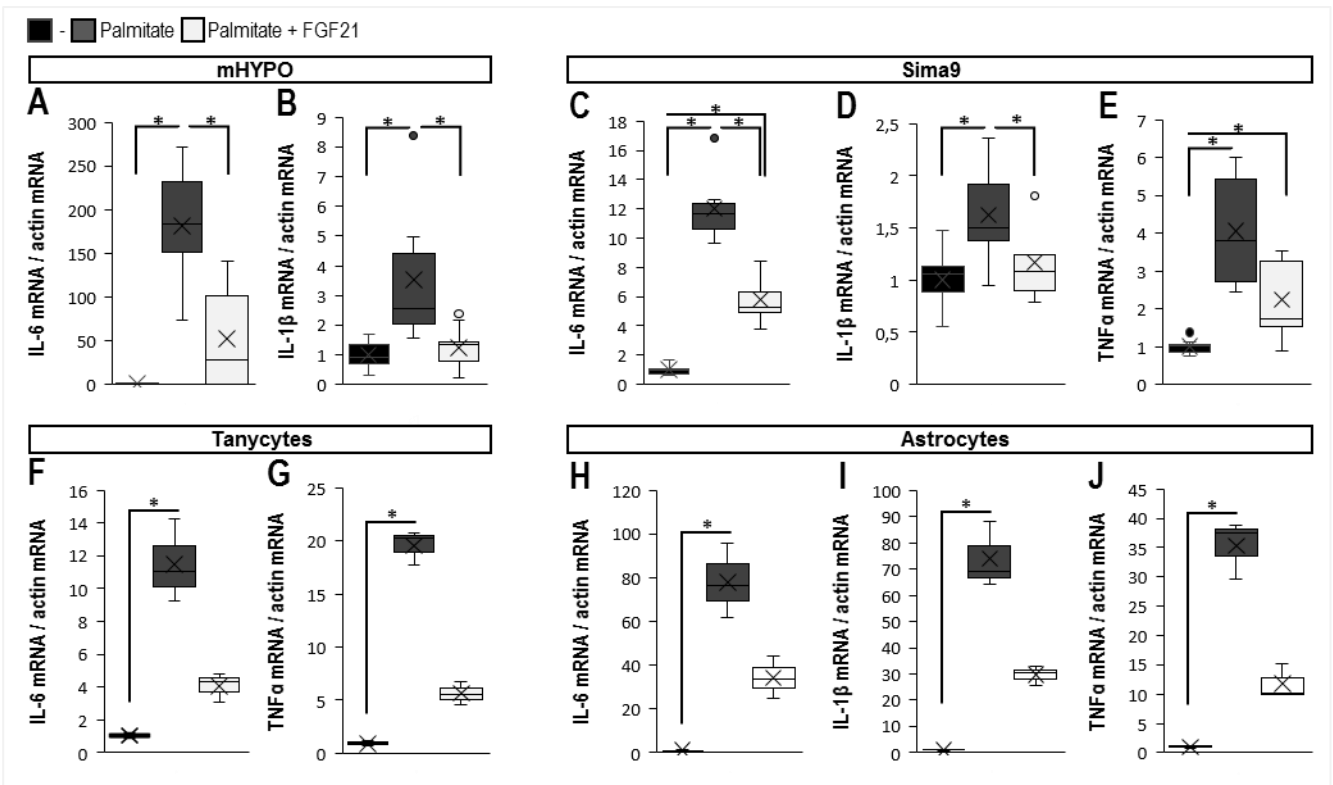
(F) Astrocyte activation quantified as GFAP fluorescence intensity in the MBH.

(G-J) Morphological parameters of microglia cells in the ARC nuclei : (G) number of IBA1+ cells, (H) soma perimeter, (I) filament length, (J) number of terminals. For filament length and number of terminals, 10 cells were randomly selected for each image (3 images per animal).

(K-V) Physiological parameters of mice before (K-O) and after (P-V) HFD : (K,P) GTT after an i.p glucose infusion (2g/kg), (L,Q) AUC of GTT, (M,R) basal blood glucose level after a 16h fast. (N) Food intake and (O) body weight gain were measured in mice fed with CD between D3-D13 and (S,T) between D29-D31 with HFD. (U) Assessment of insulin sensitivity after 3 days of HFD : blood glucose was measured before (0min) and after 20 min of an i.p insulin infusion (concentration). (V) Mass of adipose tissues.

All images were acquired with x20 objective confocal microscopy, Scale bars = 100 $\mu$ m (n = 3/group). Data are represented as mean  $\pm$ SEM, Mann-Whitney test \*p=0,05.

vWAT (visceral white adipose tissue), scWAT (subcutaneous white adipose tissue)



**Figure 6 - Anti-inflammatory actions of FGF21 *in vitro* on neuronal and glial cells**

Anti-inflammatory actions of FGF21 : FGF21 inhibits palmitate-induced inflammation in neurons (mHYPO a mouse neuronal cell line (A-B)), microglia cells (Sima9 a mouse microglial cell line (C-E)), in tanycytes (rat primary culture (F-G)) and in astrocytes (mouse primary culture (H-J)). Serum-starved cells (16h) were pretreated with FGF21 (10nM), Palmitate (0,5mM) or Palmitate+FGF21 for 16 hours. Relative gene expression of inflammatory factors (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) was normalized to actin, GAPDH or RPL19 (data not shows). All results are expressed as means SEM ; N=3 (n=9) for cell lines and N=1 (n=3) for primary cultures ; Kruskal-Wallis test, \* $p < 0,05$ .



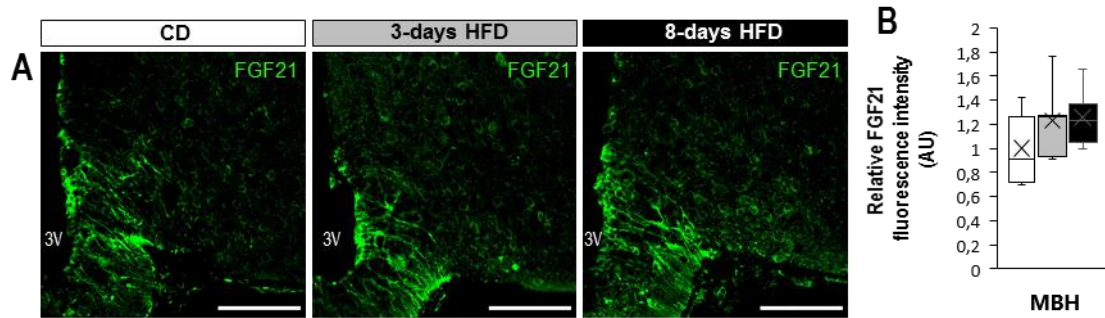
## REFERENCES

- [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] Zatterale F, Longo M, Naderi J, Raciti GA, Desiderio A, Miele C, Beguinot F. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Physiol*. 2020 Jan 29;10:1607. doi: 10.3389/fphys.2019.01607.
- [6] Le Thuc O, Stobbe K, Cansell C, Nahon J-L, Blondeau N, Rovère C. Hypothalamic inflammation and energy balance disruptions: spotlight on chemokines. *Front Endocrinol*. 2017;8:197.
- [7] Jais A, Brüning JC. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. *J Clin Invest*. (2017) 127:24–32. doi: 10.1172/JCI88878
- [8] 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
- [9] 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
- [10] 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
- [11] Horvath TL, Bruning JC. Developmental programming of the hypothalamus: a matter of fat. *Nat Med*. (2006) 12:52–3. doi: 10.1038/nm0106-52
- [12] 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
- [13] 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. *Physiol Behav*, 83(4), 573-578.
- [14] 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

- [15] 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.
- [16] Thaler J.P, Guyenet S.J, Dorfman M.D, Wisse B.E, Schwartz M.W. Hypothalamic Inflammation: Marker or Mechanism of Obesity Pathogenesis? *Diabetes*. 2013 Aug;62(8):2629-34. doi: 10.2337/db12-1605.
- [17] 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.
- [18] Kharitononkov A and DiMarchi R. Fibroblast growth factor 21 night watch: advances and uncertainties in the field. *Intern Med* .( 2017). Mar;281(3):233-246. doi: 10.1111/joim.12580.
- [19] Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A, Ford AM, Micanovic R, Galbreath EJ, Sandusky GE, Hammond LJ, Moyers JS, Owens RA et al (2005) FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest* 115: 1627 – 1635.
- [20] Xu J, Lloyd DJ, Hale C, Stanislaus S, Chen M, Sivits G, Vonderfecht S, Hecht R, Li Y-S, Lindberg RA et al (2009) Fibroblast growth factor 21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure, and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice. *Diabetes* 58: 250 – 259.
- [21] Berglund ED, Li CY, Bina HA, Lynes SE, Michael MD, Shanafelt AB, Kharitononkov A, Wasserman DH (2009) Fibroblast growth factor 21 controls glycemia via regulation of hepatic glucose flux and insulin sensitivity. *Endocrinology* 150: 4084 – 4093.
- [22] Coskun T, Bina HA, Schneider MA, Dunbar JD, Hu CC, Chen Y, Moller DE, Kharitononkov A (2008) Fibroblast growth factor 21 corrects obesity in mice. *Endocrinology* 149: 6018 – 6027
- [23] Jimenez V, Jambrina C, Casana E, Sacristan V, Muñoz S, Darriba S, et al. FGF21 gene therapy as treatment for obesity and insulin resistance. *EMBO Mol Med*. 2018;10(8):e8791.
- [24] Mutsnaini L , Kim C.S, Kim J, Joe Y, Chung H.T, Hye-Seon Choi H.S, Roh E, Kim M.S, Yu R. Fibroblast growth factor 21 deficiency aggravates obesity-induced hypothalamic inflammation and impairs thermogenic response. *Inflamm Res* . 2019 May;68(5):351-358.
- [25] Ding X, Boney-Montoya J, Owen BM, et al.  $\beta$ Klotho is required for fibroblast growth factor21 effects on growth and metabolism. *Cell Metab* 2012;16:387–393
- [26] Kharitononkov 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
- [27] Bookout AL, De Groot MH, Owen BM, Lee S, Gautron L, Lawrence HL, et al. FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med*. 2013;19(9):1147–52.
- [28] 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

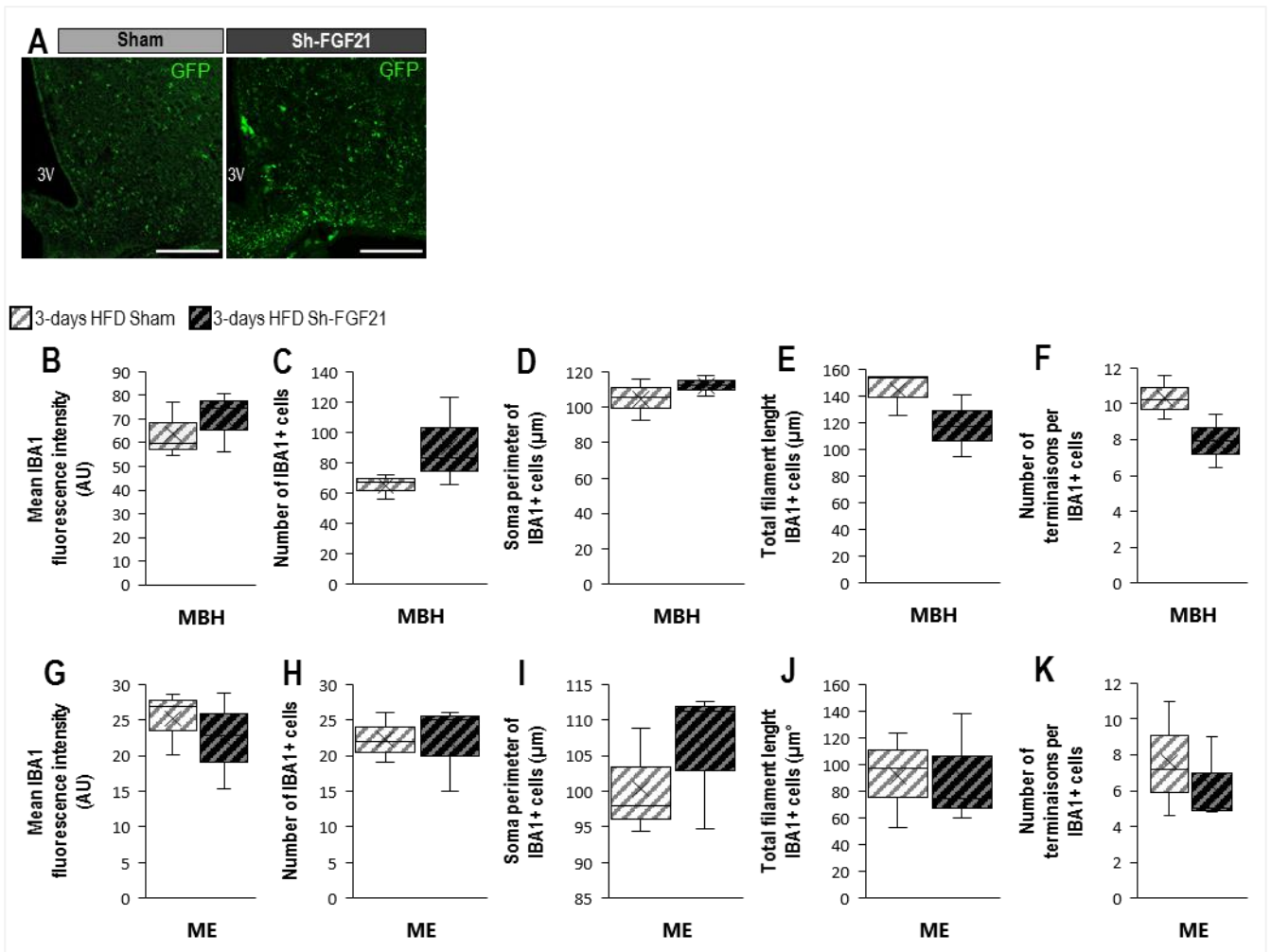
- [29] Tan BK, Hallschmid M, Adya R, Kern W, Lehnert H, Randevo HS. Fibroblast growth factor 21 (FGF21) in human cerebrospinal fluid. *Diabetes*. 2011;60(11):2758–62.
- [30] Geller S, Arribat Y, Netzahualcoyotzi C, Lagarrigue S, Carneiro L, Zhang L, Amati F, Lopez-Mejia IC, Pellerin L. Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion . *Cell Metab*. 2019 Oct 1;30(4):833-844.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2019.08.004.
- [31] Lee Y.S, Li P, Huh J.Y, Hwang I.J, Lu M, Kim J.I, Ham M, Talukdar S, Chen A, Lu W.J, et al., Inflammation Is Necessary for Long-Term but Not Short-Term High-Fat Diet–Induced Insulin Resistance. *Diabetes* . 2011 Oct;60(10):2474-83. doi: 10.2337/db11-0194. Epub 2011 Sep 12.
- [32] Lyu K, Zhang D, Song J, Li X, Perry R.J, Varman T. Samuel, and Shulman G.I. Short-term overnutrition induces white adipose tissue insulin resistance through sn-1,2-diacylglycerol/PKC $\epsilon$ /insulin receptor Thr1160 phosphorylation. *JCI Insight*. 2021;6(4):e139946.
- [33] Petryszak R, Keays M, Tang Y.A, Fonseca N.A, Barrera E, Burdet T, Füllgrabe , Fuentes A.M, Jupp S, Koskinen S, et al. Expression Atlas update—an integrated database of gene and protein expression in humans, animals and plants. *Nucleic Acids Res.*, 44 (2016), pp. D746-D752.
- [34] Restelli L.M, Oettinghaus B., Halliday M., Agca C., Licci M., Sironi L., Savoia C., Hench J., Tolnay M., Neutzner A., et al. Neuronal mitochondrial dysfunction activates the integrated stress response to induce fibroblast growth factor 21. *Cell Rep.*, 24 (2018), pp. 1407-1414
- [35] Leng Y, Wang Z, Tsai L-K, Leeds P, Fessler EB, Wang J, et al. FGF-21, a novel metabolic regulator, has a robust neuroprotective role and is markedly elevated in neurons by mood stabilizers. *Mol Psychiatry*. 2015;20(2):215.
- [36] Wang Q, Yuan J, Yu Z, Lin L, Jiang Y, Cao Z, et al. FGF21 attenuates high-fat diet-induced cognitive impairment via metabolic regulation and anti-inflammation of obese mice. *Mol Neurobiol*. 2017;55(6):4702–17.
- [37] Lin X, Liu Y.B, Hu H. Metabolic role of fibroblast growth factor 21 in liver, adipose and nervous system tissues *Biomed. Rep.*, 6 (2017), pp. 495-502
- [38] Owen B.M, Ding X., Morgan D.A., Coate K.C., Bookout A.L., Rahmouni K., Klierer S.A., Mangelsdorf D.J. FGF21 acts centrally to induce sympathetic nerve activity, energy expenditure, and weight loss *Cell Metab.*, 20 (2014), pp. 670-677.
- [39] Véniant M.M., Komorowski R., Chen P., Stanislaus S., Winters K., Hager T., Zhou L., Wada R., Hecht R., Xu J. Long-acting FGF21 has enhanced efficacy in diet-induced obese mice and in obese rhesus monkeys *Endocrinology*, 153 (2012), pp. 4192-4203
- [40] Talukdar S., Owen B.M., Song P., Hernandez G., Zhang Y., Zhou Y., Scott W.T., Paratala B., Turner T., Smith A., et al. FGF21 regulates sweet and alcohol preference. *Cell Metab.*, 23 (2016), pp. 344-349





**Figure S1 - Impact of HFD on FGF21 protein expression**

No effect of HFD on local FGF21 protein expression in the MBH. Immunohistochemistry images show the FGF21 protein (A). Quantification of the relative FGF21 fluorescence intensity (B) in the MBH to estimate the impact of HFD on its protein expression level in this region (single data point represent average across 2 sections per animal). All images obtained with x20 objective confocal microscopy. Scale bars = 100 $\mu$ m; Insets scale bars = 25 $\mu$ m. Kruskal-Wallis test, (n=5).



**Figure S2 - Quantification of microglial activation in the ME and the MBH**

(A) AAV-GFPs expressions (auto-fluorescence of GFP) in the MBH of mice fed with CD and stayed in CD (left panel : AAV shRNA Scramble (Sham), and right panel : Sh-FGF21), confocal microscopy, Scale bars = 100μm (n = 2).

(B-F) Morphological parameters of microglia cells in the MBH (G-K) and in median eminence (ME) : (B,G) IBA1 fluorescence intensity, (C,H) number of IBA1+ cells, (D,I) soma perimeter, (E,J) filament length, (F,K) number of terminals.

## DISCUSSION et PERSPECTIVES

L'hormone FGF21 joue un rôle crucial dans la régulation des métabolismes glucidique et lipidique. Cette hépatokine est également connue pour ses propriétés anti-inflammatoires et insulino-sensibilisatrices périphériques. Par ailleurs, il a été mis en évidence que le système nerveux central jouerait un rôle important dans la médiation des effets métaboliques du FGF21. Outre sa production périphérique, l'expression du FGF21 a récemment été rapporté dans le système nerveux central en particulier dans l'hypothalamus. Cependant, le rôle du FGF21 hypothalamique, son mode d'action ainsi que sa régulation nutritionnelle demeurent très peu documentés à ce jour. Dans ce travail de thèse, nous montrons que le FGF21 hypothalamique a un rôle déterminant dans la régulation précoce de l'inflammation dans le MBH induite par la consommation aigue d'un régime enrichi en lipides. De plus, le FGF21 hypothalamique serait également impliqué dans le maintien de la sensibilité à l'insuline et dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. Pour arriver à ces conclusions, nous avons dans un premier temps mis en évidence une production hypothalamique du FGF21, spécifiquement dans les neurones et les tanocytes du MBH de souris *wild type* C57BL/6J. De façon intéressante, l'expression génique du FGF21 est fortement augmentée dans le MBH en réponse à une courte exposition à un régime enrichi en lipides (HF). Par ailleurs, nous montrons que la délétion de FGF21 dans le MBH exacerbe les effets délétères du régime HF de court terme, avec une gliose réactionnelle plus précoce, associée à une accentuation de l'intolérance au glucose et de l'insulino-résistance. Ces résultats suggèrent un rôle protecteur du FGF21 hypothalamique. En accord avec ces résultats, nous montrons *in vitro*, sur des cultures de cellules neuronales, microgliales et sur des cultures primaires de tanocytes et d'astrocytes, que le traitement par le FGF21 prévient la réponse inflammatoire induite par une surexposition au palmitate (mimant un régime HF).

[Le FGF21 est exprimé par les neurones et les tanocytes du MBH des souris C57BL/6J.](#)

Pour identifier l'expression hypothalamique de FGF21 en condition physiologique, des souris *wild type* C57BL/6J, âgées de huit semaines, ont été alimentées avec un régime standard (Chow Diet : CD), pendant une semaine. Les noyaux hypothalamiques exprimant l'ARNm *Fgf21* ont été identifiés, par hybridation *in situ*, sur des coupes coronales de cerveau de souris alimentées

avec un régime CD. Tout d'abord, les résultats montrent que la ribosonde-DIG utilisée (la sonde *antisense-Fgf21*) s'hybride et reconnaît de manière spécifique l'ARNm *Fgf21*, car son marquage est distinct de celui du contrôle négatif (marquage de la sonde *sense-Fgf21*) (Figure 1A). Ensuite, dans le MBH, le VMH et le DMH les expressions de l'ARNm et de la protéine FGF21 sont détectées, respectivement par l'utilisation de la sonde *antisense-Fgf21* et par l'anticorps *rabbit* anti-FGF21 (Figure 1B, D). Or, jusqu'à présent, l'expression endogène hypothalamique de FGF21 dans le DMH n'avait pas été clairement démontrée, contrairement à celles dans le MBH et le VMH, mises en évidence précédemment dans l'étude de Geller et al. de 2019<sup>190</sup>. Par ailleurs, les profils d'expression de l'ARNm et de la protéine FGF21 obtenus sont différents de ceux de l'étude de Geller et al. de 2019<sup>190</sup>. En effet, dans l'étude de Geller et al., les marquages spécifiques révélant l'ARNm et la protéine FGF21 bordent le 3V sans s'étendre grandement dans le parenchyme cérébral. En accord avec ces travaux, nos résultats montrent également une expression de l'ARNm *Fgf21* le long du 3V, mais aussi dans le parenchyme cérébral. De plus, l'intensité moyenne du marquage de la sonde *antisense-Fgf21* est significativement plus importante dans le MBH comparé à l'intensité du marquage dans les noyaux VMH et le DMH (\*p=0.0113) (Figure 1C). Cependant, les résultats du marquage immunohistochimique montrent que l'intensité moyenne de fluorescence de la protéine FGF21 est équivalente dans le MBH et les noyaux VMH et DMH (Figure 1E). L'ensemble de ces résultats confirme l'expression et la production endogène du FGF21 dans l'hypothalamus. De plus, l'absence d'accumulation de la protéine FGF21, dans les noyaux hypothalamiques, suggère sa sécrétion rapide. Ce résultat est en accord avec les résultats de Geller et al. mettant en évidence la production du FGF21 par les tanocytes du MBH et sa sécrétion rapide de façon proportionnelle à sa synthèse<sup>190</sup>. Nous supposons donc que la protéine FGF21 est dégradée après son action dans le MBH, ou sécrétée dans des structures cérébrales plus internes, dans la circulation sanguine ou dans le LCR, afin d'exercer une action endocrine centrale ou périphérique. Les hypothèses les plus probables sont celles supposant une action centrale du FGF21 hypothalamique, notamment à cause de sa courte durée de vie (Hsuchou et al. 2007<sup>194</sup>). Ses actions endocrines pourraient intervenir dans la régulation centrale de la prise alimentaire, en régulant l'activité des neurones POMC ou AgRP dans le MBH. Par ailleurs, le FGF21 hypothalamique pourrait agir sur des noyaux hypothalamiques plus internes (PVN) et dans le DVC, pour moduler le browning dans les TA blancs et pour stimuler la thermogénèse dans le

TA brun, comme cela a été précédemment décrit dans les travaux d'Owen et al. 2014<sup>124</sup> et de Douris et al. de 2015<sup>125</sup>.

A la suite de ces résultats, la caractérisation de l'expression génique de FGF21 dans différents types cellulaires (neurones, tanocytes, astrocytes et microglies) du MBH a été réalisée par hybridation *in situ* couplée à de l'immunohistochimie. Nous nous sommes focalisés sur le MBH car c'est une région hypothalamique clé, impliquée dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique et dans l'inflammation hypothalamique induite par le régime HF<sup>37,38</sup>. Nos résultats montrent que l'ARNm *Fgf21* est exprimé dans les neurones et les tanocytes du MBH (Figure 1F), mais pas dans les astrocytes et les cellules microgliales (Figure 1G). Ces résultats sont cohérents avec le profil d'expression protéique de FGF21 (dans les neurones et les tanocytes du MBH) (Figure 1H). Ainsi, les neurones et les tanocytes du MBH sont des sites de production endogènes hypothalamiques de FGF21, chez la souris. Ces résultats confirment l'expression tanocytaire de FGF21<sup>190</sup> et démontrent en plus une expression neuronale de FGF21 dans le MBH.

Afin de déterminer des sites d'action hypothalamiques du FGF21, la caractérisation de ses récepteurs, FGFR1 et KLB, a été réalisée dans le MBH de souris C57BL/6J *wild type*. En effet, pour que le FGF21 puisse activer ses voies de signalisations intracellulaires, il est nécessaire que KLB et FGFR1 soient exprimés conjointement par la même cellule. Précédemment, des études ont montré que FGFR1 est exprimé dans l'hypothalamus (dans les noyaux : SCN, PVN et ARC)<sup>85,137,138,182,184,185</sup>, et que KLB y était également exprimé (dans les noyaux : ARC, VMH, PVN, SCN)<sup>137,138,185,187</sup>, quoique de manière plus faible. Par immunohistochimie, les profils d'expression des protéines FGFR1 et KLB ont été caractérisés. Les résultats montrent que FGFR1 est exprimé dans les neurones (Figure 2A) et dans les tanocytes (Figure 2B) du MBH, mais aussi dans les astrocytes et les cellules microgliales (Figure 2C,D), tandis que KLB est exprimé également dans les neurones et les tanocytes, mais très peu dans les astrocytes (Figure 2E-2F). Ainsi, ces résultats confirment partiellement ceux de l'étude de Choubey et al. de 2016<sup>182</sup>, mettant en évidence que FGFR1 est exprimé dans les tanocytes et les astrocytes de souris transgéniques surexprimant FGFR1. Cependant, l'étude de Choubey & al. soutient que les neurones n'expriment pas FGFR1. Or, nos résultats ainsi que ceux de l'étude de Kuroda et al. de 2017<sup>186</sup> montrent le contraire. La divergence des résultats peut s'expliquer partiellement par le fait que le profil d'expression de FGFR1 évolue au cours du temps<sup>182</sup>, or les souris utilisées

lors des expériences n'avaient pas le même âge (dans l'étude Choubey et al., elles sont âgées d'un mois, contre deux dans notre étude et dans celle de Kuroda et al.). Concernant le profil d'expression de KLB, nos résultats corroborent ceux des analyses scRNA-seq de Jensen-Cody et al. de 2020<sup>187</sup>, identifiant les tanycytes et les neurones comme des clusters hypothalamiques exprimant KLB ; il convient toutefois de préciser que les analyses de Jensen-Cody & al. portaient sur l'hypothalamus entier, et non spécifiquement sur le MBH. Ainsi, au vu des caractérisations des récepteurs, le FGF21 hypothalamique peut potentiellement agir, dans le MBH, de manière autocrine sur les neurones et les tanycytes, et de manière paracrine sur les astrocytes et les cellules microgliales.

#### La consommation du régime HF pendant trois et huit jours augmente l'expression de l'ARNm de FGF21 dans les neurones et dans les tanycytes du MBH.

Dans la seconde partie de l'étude, nous avons étudié la régulation précoce de l'expression du FGF21 hypothalamique et de ses récepteurs (FGFR1 et KLB), par la consommation d'un régime obésogène HF. Pour cela, des souris C57BL/6J, âgées de huit semaines, ont été alimentées avec un régime CD, ou HF (dont 60% de l'énergie est apportée par les lipides) pendant trois et huit jours. Tout d'abord, nous avons évalué l'impact du régime HF de court terme sur le développement de l'inflammation hypothalamique et sur les perturbations métaboliques qui lui sont associées. La réponse inflammatoire au niveau hypothalamique a été évaluée par immunohistochimie, en analysant la gliose réactionnelle dans le MBH, au moyen de marqueurs spécifiques de la microglie (Iba1) et des astrocytes (GFAP).

Après trois jours de régime HF, des signes d'activation astrocytaire et microgliale sont relevés. D'une part, avec l'augmentation de la moyenne d'intensité de fluorescence du marquage protéique GFAP, signifiant la mise en place d'une astrogliose ( $0.05 < \#p < 0.1$ ) (Figure 3A,B). D'autre part, les cellules microgliales semblent présenter des modifications morphologiques, avec une tendance à la diminution de la longueur totale du réseau de filament microgliale ( $0.05 < \#p < 0.1$ ) (Figure 3A,E) et à l'augmentation de la taille du soma, montrant ainsi l'installation de la microgliose (Figure 3A,D). Nos résultats sont en accord avec les travaux de Thaler et al. de 2012<sup>37</sup> et de Waise et al. de 2015<sup>36</sup>. En effet, dans des conditions expérimentales similaires (trois jours de régime HF), ces études montrent une augmentation de l'expression génique

hypothalamique de GFAP, une augmentation du nombre de cellules microgliales associée à des modifications de leur morphologie, témoignant de l'installation précoce d'une astroglie et d'une microglie, en réponse à trois jours de régime HF. De plus, ces deux études confirment conjointement l'activation microgliale par l'augmentation de l'expression génique d'IL-6. Il serait donc intéressant de vérifier l'impact du régime HF de trois jours sur l'expression génique et protéique des cytokines pro-inflammatoires, dans le MBH des animaux.

Parallèlement, les animaux de notre étude, nourris pendant trois jours avec le régime HF, présentent une augmentation de leur prise alimentaire (de 0.18 kcal/day/body weight ; \* $p < 0.05$ ) (Figure 3G), un gain de poids (de 1.3 g ; \* $p < 0.05$ ) (Figure 3H) et une glycémie basale plus élevée (de 15.5 mg/dL ; \* $p < 0.005$ ) (Figure 3I), par rapport aux souris alimentées avec le régime standard, comme dans l'étude de Lee et al. de 2011<sup>231</sup>. De plus, les animaux de notre étude montrent une tolérance au glucose diminuée, comme le montre les résultats du GTT, leur pic glycémique est plus important à 30 et 60 minutes (Figure 3J), ainsi que l'aire globale sous la courbe (\* $p = 0.05$ ) (Figure 3K), par rapport aux souris alimentées avec le régime CD. Un tel effet du régime HF sur la prise alimentaire corrobore les résultats de Grandl et al. de 2018<sup>232</sup>, cependant cette étude ne montre ni d'augmentation de la glycémie basale ni un gain de poids corporel, après trois jours de régime HF, par rapport aux animaux nourris avec un régime CD. Ainsi, les perturbations induites par la surexposition lipidique de trois jours restent controversées. Cependant, elles peuvent s'expliquer par une sensibilité différente au régime HF selon les animaux utilisés, créant ainsi une variabilité importante dans leurs réponses inflammatoires et glycémiques. De plus, lors d'une surexposition lipidique aussi courte, les désordres métaboliques ne sont pas clairement installés comme après huit semaines de régime HF<sup>37,38</sup>. Il est donc concevable d'observer ces divergences, à des stades aussi précoces de l'installation des désordres métaboliques associés à l'obésité.

Les souris soumises à huit jours de régime HF, présentent une importante astroglie dans le MBH, mise en évidence par l'augmentation significative de l'intensité de fluorescence du marquage GFAP (\* $p = 0.007$ ) (Figure 3A,B). Cette astroglie est associée à une microglie, comme cela a été observé dans l'étude de Thaler et al. de 2012<sup>37</sup>. Au vu de nos résultats et de ceux des études déjà réalisées<sup>36,37,56</sup>, l'évaluation de l'activité microgliale a été basée essentiellement sur des critères morphologiques et non sur l'intensité de fluorescence du

marquage IBA1, afin de mieux distinguer les différents stades d'activation de la microglie. En effet, l'intensité de fluorescence d'IBA1 n'est pas un critère assez précis pour distinguer entre des stades d'activations proches. Trois études ont servi de référence pour caractériser l'activation microgliale à travers la quantification de paramètres morphologiques (le nombre de cellule microgliale, la taille du corps cellulaire, la longueur totale du réseau de filaments, et le nombre de terminaisons)<sup>55,56,233</sup>. Les résultats de notre étude montrent que la microgliose se caractérise par l'augmentation significative du nombre de cellules microgliales dans le MBH (en moyenne 39 cellules IBA1 positives dans le MBH des souris contrôles et 57 chez les souris nourries pendant huit jours avec le régime HF ; \*p=0.0112) (Figure 3C) et par un corps cellulaire plus grand (en moyenne le périmètre des somas des cellules microgliales est de 49,3 µm chez les souris contrôles et de 80,42 µm chez les souris nourries pendant huit jours avec le régime HF ; \*p=0.0049) (Figure 3D). L'activation microgliale est confirmée par la diminution significative de la longueur totale du réseau de filament (de 154.9 µm ; \*p=0.006) (Figure 3E) et du nombre de terminaisons du réseau microgliale (entre 7 et 8 terminaisons en moins ; \*p=0.014) (Figure 3F), chez les individus nourris pendant huit jours avec le régime HF, par rapport aux animaux contrôles. Parallèlement à la gliose réactionnelle, les animaux nourris pendant huit jours avec le régime HF présentent une augmentation de leur prise alimentaire (de 0.07 kcal/day/body weight ; \*p<0.05) (Figure 3G). En revanche, leur gain de poids (Figure 3H) ainsi que leur glycémie basale (Figure 3I) sont stabilisés, puisque ces paramètres ne sont pas significativement différents de ceux du groupe contrôle. Par conséquent, ces résultats montrent que leur métabolisme cherche à compenser la surexposition lipidique, et ce peut-être en augmentant les dépenses énergétiques (thermogénèse, activité physique), qui peuvent être évaluées par l'utilisation de cages métaboliques et via un suivi thermique des animaux. Cela est surprenant au vu des résultats de l'étude de Lee et al.<sup>231</sup> et de l'étude de Thaler et al.<sup>37</sup>, montrant des augmentations de ces paramètres. Par ailleurs, en accord avec les travaux de Lee et al.<sup>231</sup>, les animaux de notre étude montrent une tolérance au glucose diminuée, comme le montre les résultats du GTT, leur pic glycémique est plus important à 30 et 60 minutes (Figure 3J), ainsi que l'aire globale sous la courbe (\*p=0.021) (Figure 3K), par rapport aux souris alimentées avec le régime CD. Ainsi, huit jours de régime HF induisent une gliose réactionnelle et une intolérance au glucose chez les souris C57BL/6J.



Dans un deuxième temps, nous avons étudié les répercussions de la consommation du régime HF sur l'expression dans le MBH de FGF21 et de ses récepteurs. L'étude de Geller et al.<sup>190</sup> montre que l'expression génique de FGF21 dans les tanocytes est induite par une surexposition au palmitate, en condition de jeûne. Or, lors de la consommation d'un régime HF, les animaux sont également surexposés au palmitate. Par conséquent, l'expression génique de FGF21 pourrait être modulée en réponse à la consommation de ce régime. Les résultats d'hybridation *in situ* couplée à de l'immunohistochimie, montrent que l'intensité de fluorescence relative de la sonde *antisense-Fgf21* reflétant le niveau d'expression de l'ARNm *Fgf21* augmente significativement dans les neurones (\*p=0.0087) (Figure 4A,B) et dans les tanocytes (\*p=0.0002) (Figure 4C,D) du MBH, dès trois et huit jours de régime HF. En revanche, l'expression protéique de FGF21 (Figure S1B), révélée par l'utilisation de l'anticorps *rabbit* anti-FGF21 (Figure S1A), ainsi que celle de ses récepteurs KLB et FGFR1 (Figure 4F,H), révélés respectivement par immunohistochimie grâce aux anticorps *rabbit* anti-KLB (Figure 4E) et *rabbit* anti-FGFR1 (Figure 4G), ne sont pas modulées par la prise du régime HF. Ces résultats corroborent l'étude de Geller et al.<sup>190</sup>, et montrent que la consommation d'un régime enrichi en lipides induit l'expression précoce du FGF21 dans les tanocytes, mais aussi dans les neurones du MBH. Ce dernier point est important car il met en évidence un rôle potentiel du FGF21 hypothalamique, produit par les neurones et les tanocytes du MBH, dans le maintien de l'homéostasie énergétique au niveau central. Cette hypothèse s'appuie sur les différentes actions centrales de FGF21 mises précédemment en évidence, comme son action thermogénique (Douris et al. de 2015<sup>125</sup> ; Carrière et al. de 2013<sup>220</sup>), son action dans la régulation de l'axe gonadotrope (Owen et al. de 2013<sup>228</sup> ; Xu et al. de 2017<sup>229</sup>), du cycle circadien (Bookout et al. de 2013<sup>137</sup>) et de l'axe thyroïdienne (Yilmaz et al. de 2018<sup>230</sup>), ainsi que son action sur l'homéostasie énergétique et l'hypothalamus. Par exemple, l'étude de Sarruf et al. de 2010<sup>218</sup> montre que l'action centrale de FGF21 améliore l'insulino-sensibilité périphérique. Celle d'Owen et al. de 2014<sup>124</sup> montre, quant à elle, que l'action centrale de FGF21 stimule l'activité sympathique pour augmenter les dépenses énergétiques, ainsi que la perte de poids. Celles de Flippo et al. de 2020<sup>188</sup> et de Jensen-Cody et al. de 2020<sup>187</sup> montrent que l'action de FGF21 sur les neurones glutamatergiques est nécessaire pour induire une perte de poids et adapter le comportement alimentaire, comme le montre également l'étude de von Holstein et al. de 2016<sup>224</sup>.

La délétion du FGF21, dans le MBH, exacerbe la gliose réactionnelle hypothalamique et l'intolérance au glucose induites par trois jours de régime HF.

Actuellement, les études sur l'obésité ont démontré que le FGF21 périphérique ou exogène agissait au niveau central, afin d'exercer un rôle anti-inflammatoire et insulino-sensibilisateur<sup>191,218</sup>. En effet, l'étude de Wang et al. de 2018<sup>212</sup> et celle de Wang et al. de 2020<sup>213,215</sup> ont montré l'implication du FGF21 périphérique dans la régulation hippocampique de la gliose réactionnelle, en situation d'obésité. L'étude de Mutsnaini et al. de 2019<sup>191</sup> montre, quant à elle, que l'inflammation hypothalamique est aggravée et que la réponse thermogénique est perturbée chez les souris obèses invalidées pour FGF21 (douze semaines de régime HF dont 60% de l'énergie provient essentiellement des lipides). Par ailleurs, l'étude de Sarruf et al. de 2010<sup>218</sup>, sur des rats obèses traités avec du FGF21 (injecté par voie intracérébroventriculaire), montre une amélioration de la sensibilité périphérique à l'insuline, ces résultats sont confirmés dans les études de Douris et al. de 2015<sup>125</sup>, de Owen et al. de 2014<sup>124</sup> et de Forney et al. de 2020<sup>219</sup>. Cependant, le rôle du FGF21 produit au niveau cérébral reste largement inconnu à ce jour. Dans ce travail de thèse, nous avons étudié l'implication potentielle du FGF21 hypothalamique dans le développement précoce de l'inflammation hypothalamique et les perturbations métaboliques qui lui sont associées. Pour cela, nous avons étudié l'impact de son invalidation spécifique, dans le MBH de souris C57BL/6J soumises à trois jours de régime HF, *via* une approche d'ARN interférent. Cette technique est basée sur l'injection stéréotaxique, simultanée dans le 3V et dans le noyau arqué, de particules virales adéno-associées porteuses d'un transgène codant pour la GFP (ShRNA-Scramble = groupe Sham (sous régime CD en gris clair uni ; sous régime HF en blanc rayé gris) ; ShRNA-FGF21 = groupe Sh-FGF21 (sous régime CD en gris foncé uni ; sous régime HF en gris rayé noir)) (Figure 5A).

Tout d'abord, l'efficacité de l'injection du Sh-FGF21 a été vérifiée par immunohistochimie. L'analyse de la fluorescence de la GFP montre la présence du marquage GFP dans le MBH des animaux *3-days HFD Sham* et *3-days HFD Sh-FGF21* (Figure 5B), ainsi que dans ceux des groupes CD Sham et CD Sh-FGF21 (Figure S2A). Ensuite, les résultats d'hybridation *in situ* montrent que le ShRNA-FGF21 a inhibé significativement le niveau d'expression de l'ARNm *Fgf21* dans le MBH du groupe *3-days HFD Sh-FGF21* (Figure 5C). De plus, cette diminution est corrélée à celle de l'expression protéique de FGF21 dans le MBH des animaux du groupe 3-

*days HFD* Sh-FGF21 par rapport au groupe contrôle (Figure 5D). Ces résultats confirment que le virus a été injecté dans les zones d'intérêt et qu'il a entraîné une baisse significative de l'expression génique et protéique du FGF21 spécifiquement dans le MBH, permettant ainsi d'étudier spécifiquement le rôle du FGF21 hypothalamique.

Dans ces conditions, les conséquences de l'inactivation du FGF21 hypothalamique sur la gliose réactionnelle après trois jours de régime HF ont été étudiées. Les résultats d'immunohistochimie montrent que l'astrogliose est accentuée chez les animaux ayant reçu le Sh-FGF21 par rapport aux animaux Sham, comme le témoigne l'augmentation significative de l'intensité de fluorescence du marquage GFAP (\* $p=0.025$ ) (Figure 5E,F). En effet, cela traduit un recrutement astrocytaire plus important dans le MBH des animaux *3-days HFD* Sh-FGF21 par rapport aux animaux *3-days HFD* Sham. Ce résultat est cohérent avec ceux de l'étude de Mutsnaini et al.<sup>191</sup> obtenus à partir d'hypothalamus de souris KO-FGF21 obèses (douze semaines de régime HF), montrant également une augmentation du marquage GFAP dans l'ARC. Ce résultat est également en accord avec ceux de l'étude de Fang et al. de 2020<sup>193</sup>, obtenus à partir de mésencéphale de souris atteintes de la maladie de Parkinson traitées avec du FGF21, montrant quant à eux une diminution du marquage GFAP. L'astrogliose mise en évidence, dès trois jours de régime HF, s'accompagne d'une microgliose démontrée grâce au marquage IBA1 (Figure 5E). En effet, par rapport aux souris *3-days HFD* Sham, davantage de cellules microgliales sont retrouvées dans les noyaux ARC des souris du groupe *3-days HFD* Sh-FGF21 (Figure 5G), ce qui est cohérent avec l'étude de Wang et al. de 2018<sup>212</sup>. De plus, l'accentuation de l'activation microgliale, dans les noyaux ARC du groupe *3-days HFD* Sh-FGF21, est confirmée par la diminution significative de la longueur totale du réseau de filament microglial (de 33  $\mu\text{m}$  ; \* $p=0.025$ ) (Figure 5I) et du nombre de terminaisons du réseau de filament (entre 2 et 3 terminaisons en moins ; \* $p=0.025$ ) (Figure 5J), confirmant les résultats d'une étude de Wang et al. de 2020<sup>213</sup>. Cependant, la taille des somas des cellules microgliales (Figure 5H) ne varient pas dans les noyaux ARC, à la suite à l'inactivation du FGF21 hypothalamique et de trois jours de régime HF. Cela signifie que l'activation microgliale est à un stade d'activation intermédiaire et non à un stade amyboïde, comme c'est le cas chez les souris KO-FGF21 nourries pendant douze semaines avec un régime HF (étude de Mutsnaini et al. 2019)<sup>191</sup>. De plus, il est remarquable que l'activation microgliale a lieu uniquement dans les noyaux ARC, car dans l'EM, aucun des paramètres quantifiés précédemment ne sont

significativement différents entre les deux groupes (Figure S2G-K), ce qui se répercute sur les quantifications de ces paramètres dans le MBH entier (Figure S2B-F). Ainsi, l'inactivation du FGF21 accentue la gliose réactionnelle dans l'ARC, mais pas dans l'EM. Or, les résultats de la Figure 3 montrent une faible gliose réactionnelle dans le MBH, après trois jours de régime HF. Ainsi, l'inactivation du FGF21 dans le MBH accentue la gliose réactionnelle induite par le régime HF, suggérant un rôle anti-inflammatoire du FGF21 hypothalamique. Cela signifie que le FGF21 hypothalamique, lors d'une surexposition lipidique, régule négativement l'installation de la gliose réactionnelle dans les noyaux ARC, pour potentiellement préserver l'intégrité des réseaux neuronaux, comme l'a mis en évidence précédemment l'étude de Mutsnaini et al. de 2018<sup>191</sup>. Dans notre modèle expérimental, il serait donc intéressant d'évaluer l'expression du marqueur de dommage neuronal, HSP72 (*heat-shock protein 72*), afin d'estimer la différence d'évolution des lésions neuronales potentielles entre les souris nourries avec le régime HF pendant trois jours ayant reçu le Sh-FGF21 et celles ayant reçu le Sham. De plus, nos résultats d'expérience *in vitro* confirment l'action anti-inflammatoire centrale de FGF21. En effet, la surexposition au FGF21 *in vitro* inhibe la réponse inflammatoire induite par le palmitate dans différents types cellulaires (dans les neurones, les cellules microgliales, les tanocytes et les astrocytes), comme en témoigne la baisse significative de l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires, IL-6 et IL-1 $\beta$ , induites initialement par le traitement palmitate, dans les neurones (lignée cellulaires mHYPO) (Figure 6A,B), les cellules microgliales (lignée cellulaire Sima9) (Figure 6C,D), les tanocytes (cultures primaires de tanocytes de rat) (Figure 6F) et les astrocytes (cultures primaires d'astrocytes murins) (Figure 6H,I). Ces résultats corroborent ceux des études de Kang et al. de 2020<sup>208</sup> et de Wang et al. de 2020<sup>213</sup>. De plus, il est observé une diminution de l'expression génique de TNF $\alpha$  dans les tanocytes (Figure 6G) et dans les astrocytes (Figure 6J). En revanche, le traitement FGF21 n'affecte pas l'expression de TNF $\alpha$  dans les cellules microgliales (Figure 6E), ce qui est en contradiction avec l'étude de Wang et al. sur l'activation microgliale. Cette divergence peut s'expliquer par des conditions expérimentales différentes (culture primaire corticale de rat versus lignée cellulaire microgliale de souris ; traitement LPS versus traitement palmitate). Au vu des résultats *in vivo* et *in vitro*, il serait pertinent de savoir quelles populations neuronales des noyaux ARC sont les plus fortement impactées par l'inflammation associée à l'inactivation hypothalamique du FGF21. En effet, comme l'ont démontré Geller et al.<sup>190</sup>, la délétion spécifique du FGF21 tanocytaire, en situation de jeûne (augmentation du palmitate circulant du fait de l'augmentation de la lipolyse dans le

TA), entraîne dans le TA blanc sous-cutané une augmentation du browning, du fait de la perturbation du réseau neuronal TRH, mais également une stimulation de la lipolyse et une diminution de la lipogénèse, du fait de l'altération des circuits neuronaux AVP et GHRH. Compte tenu des résultats de cette étude, il serait intéressant d'évaluer, dans la situation de surexposition lipidique, les conséquences de l'inactivation du FGF21 dans l'ARC (dans les tanocytes et les neurones) sur l'activité des populations neuronales POMC, AgRP, CRH, GHRH, TRH en évaluant par RTqPCR l'expression hypothalamique des gènes : POMC, AgRP, CRH, GHRH, TRH. De plus, les conséquences sur la lipolyse pourraient être explorées, elles aussi, à travers l'expression génique des lipases Atgl et Hsl, dans les TA blancs. Cela permettrait potentiellement de différencier les rôles du FGF21 produit par les tanocytes et de celui produit par les neurones sur d'éventuelles répercussions centrales et périphériques qu'il nous reste à explorer (sur la thermogénèse<sup>125</sup>, sur la régulation de l'homéostasie énergétique<sup>224</sup>, sur la régulation du métabolisme hépatique<sup>224</sup> et pancréatique<sup>141</sup>).

Parallèlement aux répercussions sur l'inflammation hypothalamique, les conséquences de l'absence de l'expression de FGF21 dans l'ARC ont aussi été étudiées sur la tolérance au glucose, avant et après les trois jours de régime HF. D'après l'étude de Lan et al. de 2017<sup>217</sup>, l'action hypothalamique du FGF21 périphérique est nécessaire pour induire une baisse de la glycémie. En effet, l'étude montre que le FGF21 stimule l'activité du système nerveux autonome, afin d'augmenter la thermogénèse dans le TA brun, induisant ainsi une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une perte de poids corporel. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que le FGF21 hypothalamique était directement impliqué dans l'amélioration de l'homéostasie du glucose. En effet, avant le régime HF, une intolérance au glucose est constatée chez les animaux ayant reçu le Sh-FGF21 (animaux CD Sh-FGF21), par rapport aux animaux du groupe CD Sham. L'intolérance au glucose est caractérisée par un pic glycémique plus élevé à 30 minutes (\*p=0.025), par une normalisation de la glycémie à 90 minutes plus lente (\*p=0.025) (Figure 5K), et par une aire globale sous la courbe plus importante (\*p=0.025) (Figure 5L), par rapport aux animaux du groupe CD Sham. Cependant, la glycémie basale (Figure 5M), la prise alimentaire (Figure 5N) et le poids corporel (Figure 5O) des animaux du groupe CD Sh-FGF21 ne sont pas significativement différents de ceux des

animaux du groupe CD Sham. Cela signifie qu'en condition physiologique, le FGF21 hypothalamique est nécessaire au maintien de l'homéostasie du glucose.

Par ailleurs, en condition obésogène, l'action insulino-sensibilisatrice du FGF21 a été mise en évidence, notamment grâce aux études d'Owen et al. de 2014<sup>124</sup> et de Douris et al. de 2015<sup>125</sup>. Ces études montrent que la surexpression de FGF21 chez des souris obèses tend à rétablir la sensibilité à l'insuline. Ces résultats sont cohérents avec ceux des études de Hill et al. de 2019<sup>221</sup> et de Flippo et al. de 2020<sup>188</sup>, mettant en évidence que la signalisation centrale du FGF21, notamment sur les neurones glutamatergiques du VMH, est déterminante pour maintenir la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline périphérique. Par conséquent, nous avons étudié, sur notre modèle expérimental (Figure 5A), les répercussions de l'inactivation de FGF21 dans l'ARC sur l'intolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. Après un régime HF de trois jours, les animaux ayant reçu de Sh-FGF21 ont une intolérance au glucose exacerbée. En effet, ils présentent une glycémie basale plus élevée (de 93.3 mg/dL ; \*p=0.025) (Figure 5R), un pic glycémique à 30 minutes plus important (de 125.3 mg/dL ; \*p=0.025) et une absence de la normalisation de la glycémie au bout de 120 minutes (glycémie à 120 minutes du groupe *3-days HFD Sham* : 173,7 mg/dL et celle du groupe *3-days HFD Sh-FGF21* : 364.3 mg/dL ; \*p=0.025), par rapport aux animaux du groupe *3-days HFD Sham* (Figure 5P). L'intolérance au glucose observée est confirmée par l'augmentation de l'aire sous la courbe pour le groupe *3-days HFD Sh-FGF21* (\*p=0.025) (Figure 5Q), ce qui est cohérent avec les résultats de Sarruf et al. de 2010<sup>218</sup>. De plus, les animaux du groupe *3-days HFD Sh-FGF21* ont une sensibilité à l'insuline diminuée, car après 20 minutes d'une injection intrapéritonéale d'insuline, la glycémie de ces animaux n'est pas significativement diminuée par rapport à leur glycémie basale. Or, cela n'est pas le cas des animaux *3-days HFD Sham*, qui conservent une sensibilité à l'insuline (Figure 5U). Ainsi, ces résultats démontrent, qu'en condition d'insulino-résistance, le FGF21 maintient la sensibilité à l'insuline des cellules neuronales et périphérique. Compte tenu des études de Sarruf et al. de 2010<sup>218</sup> et de Von Holstein-Rathlou et al. de 2016<sup>224</sup>, nous pouvons supposer que l'action insulino-sensibilisatrice du FGF21 hypothalamique fait intervenir l'axe foie-cerveau. Pour explorer cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer l'expression génique des enzymes G6Pase et de Pepck, impliquées dans la néoglucogénèse hépatique, afin d'étudier l'impact de l'inactivation de FGF21 sur la libération de glucose par le foie.

D'autre part, les effets insulino-sensibilisateurs de FGF21 sont associés à l'augmentation des dépenses énergétiques, qui ne sont pas favorisées par une activité physique plus intense ou par la diminution de la prise alimentaire, d'après les études de Lan et al. de 2017<sup>217</sup> et de Sarruf et al. de 2010<sup>218</sup>. Le fait d'augmenter les dépenses énergétiques, notamment par stimulation du browning dans les TA blancs, sert à lutter contre la prise de poids<sup>125,219</sup>. En nous basant sur ces travaux, nous constatons que les animaux du groupe *3-days HFD Sh-FGF21* présentent un gain de poids (de 2.83 g ; \*p=0.025) (Figure 5T), se justifiant par l'augmentation de la masse des TA blanc viscéral (de 1.05 g ; \*p=0.025), blanc sous-cutané (de 1.57 g ; \*p=0.025) (Figure 5V), par rapport aux groupe *3-days HFD Sham*. Pour autant, la prise alimentaire n'est pas augmentée (Figure 5S). Or, au vu des précédentes études citées<sup>125,217-219</sup>, il est cohérent d'observer une prise de poids corporel à la suite de la suppression de l'expression centrale du FGF21. De plus, lorsque le FGF21 est exprimé fortement, après huit jours de régime HF, le gain de poids est stabilisé (Figure 3H). Il serait donc intéressant d'identifier les mécanismes par lesquels FGF21 intervient dans le maintien un poids corporel à court terme, malgré une surexposition lipidique. Au vu des résultats obtenus, deux pistes sont à privilégier ; celle de la régulation négative de lipogenèse et celle de la régulation positive du browning et de la thermogénèse. Pour constater les répercussions sur la synthèse lipidique, il faudrait examiner les profils d'expressions géniques des enzymes intervenant dans la synthèse d'acide gras (Srebpt, Dgat2, Fasn, Scd1, Acaca), par RTqPCR. Par ailleurs, pour évaluer les répercussions sur l'activité thermogénique ainsi que sur le browning, il serait donc intéressant d'évaluer l'expression génique d'UCP1, de Dio2, d'Elvol3, de LCAD et de VLCAD dans le TA brun et blanc sous-cutané des animaux des groupes *3-days HFD Sham* et *Sh-FGF21*.

En outre, nos résultats et ceux des études présentées s'accordent sur le fait que le FGF21 ne module pas la prise alimentaire<sup>217,219</sup>. En revanche, celle de von Holstein et al. de 2016<sup>224</sup> démontre qu'en réponse à une hyperglycémie, le FGF21 agit sur les neurones glutamatergiques et glucosensibles du VMH comme un message post-prandial inhibiteur en réponse à une hyperglycémie. Or, les neurones POMC sont également responsables d'un message anorexigène. Il serait donc intéressant d'étudier les niveaux d'expression de FGF21 dans les neurones POMC, après trois jours et huit jours de régime HF, et de les corrélés à l'activité de ces neurones (révélée par le marquage c-Fos, niveaux d'expression de POMC), en réalisant une immunohistochimie couplée ou non à de l'hybridation *in situ*. Si cette expression est modulée

dans cette sous-population neuronale de l'ARC, il serait pertinent d'étudier son impact sur le comportement alimentaire et l'insulino-résistance dans un modèle génétique de souris n'exprimant plus FGF21 spécifiquement dans les neurones POMC. De la même manière et compte-tenu des résultats de ce travail de thèse ainsi que de ceux de Geller & al. de 2019, il serait intéressant d'étudier les répercussions de l'inactivation spécifique de FGF21 dans les tanocytes sur la régulation du métabolisme glucidique et l'inflammation hypothalamique, *via* un modèle de souris transgénique.

L'ensemble des résultats que nous avons obtenus apportent de solides arguments en faveur d'un rôle protecteur du FGF21 exprimé par les tanocytes et les neurones du MBH dans la régulation précoce de l'inflammation hypothalamique et de l'intolérance au glucose induites par la consommation du régime HF. Ce travail, constitue une étape importante dans la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la mise en place de l'obésité et du DT2. A terme, elle pourrait ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour lutter contre ces pathologies.



## CONCLUSION GENERALE

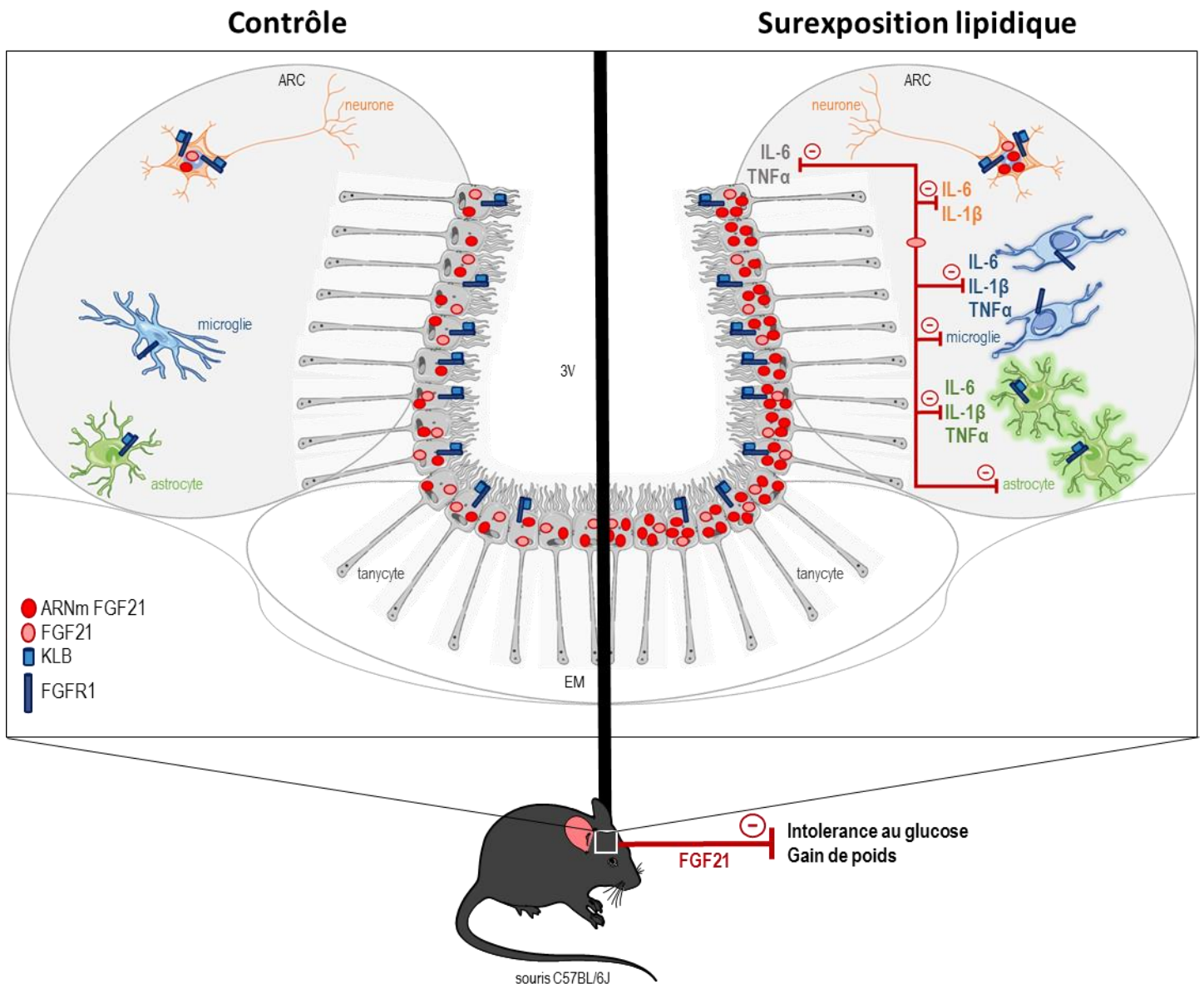


Figure 29 : Résumé graphique des résultats principaux de la thèse.

En condition contrôle (à gauche) : *in vivo*, nous avons montré que le MBH est un site de production hypothalamique du FGF21. En effet, l'ARNm et la protéine FGF21 sont exprimés par les neurones et les tanycytes du MBH, des souris C57BL/6J nourries avec un régime CD. De plus, le corécepteur à FGF21, KLB, est exprimé par les neurones, les tanycytes ainsi que par les astrocytes, tandis que le récepteur FGFR1 est exprimé par les cellules microgliales et ces mêmes types cellulaires, ce qui démontre la possibilité d'une action autocrine et paracrine de FGF21 au niveau hypothalamique.

En condition de surexposition lipidique (à droite) : induite *in vivo* par la consommation d'un régime HF, l'expression génique de FGF21 augmente fortement dans les neurones et les tanycytes du MBH, contrairement à son expression protéique qui reste constante, nous laissant

supposer que le FGF21 n'est pas stocké et qu'il doit être sécrété. L'expression des récepteurs KLB et FGFR1 n'est pas affectée par la consommation d'un régime HF. Pourtant, nous montrons que le FGF21 hypothalamique joue un rôle déterminant dans les premiers stades de développement de l'inflammation centrale et de l'insulino-résistance, associés à l'obésité. En effet, grâce à l'inactivation de l'expression génique de FGF21 dans le MBH, nous mettons en évidence *in vivo* son action anti-inflammatoire, qui consiste à réguler négativement l'activation des cellules microgliales et des astrocytes, malgré le contexte inflammatoire lié à la consommation du régime HF. De plus, *in vitro*, le FGF21 inhibe l'expression génique de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) induite par une surexposition au palmitate, dans les neurones, les tanocytes, les astrocytes et les cellules microgliales. Parallèlement à cette action anti-inflammatoire centrale, le FGF21 hypothalamique exerce une action insulino-sensibilisatrice déterminante, en limitant l'intolérance au glucose périphérique, le gain de poids et en maintenant la sensibilité à l'insuline des animaux. Ainsi, nos résultats mettent en évidence le rôle déterminant du FGF21 hypothalamique dans la régulation précoce de l'inflammation dans le MBH et ses mécanismes d'action permettant le maintien de la sensibilité à l'insuline et le contrôle de l'homéostasie glucidique, lors d'une surexposition lipidique.

Schéma réalisé par Coralie Alexandre à partir d'images *open access* de *Servier medical art*.

## MATERIELS et METHODES

### Expériences *in vivo*

#### Animaux :

Nous avons travaillé sur des souris mâles C57BL/6J *wild type* (Janvier, France), arrivées à l'âge de six semaines, dans notre animalerie. Elles ont été hébergées à 22°C, avec une période d'éclairage de 7h à 19h. A sept semaines, elles ont été placées en cage individuelle. A huit semaines, nous commençons les expérimentations avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Durant toute la durée des expériences, la prise alimentaire individuelle ainsi que le poids corporel des animaux ont été mesurés manuellement et quotidiennement.

#### Composition des régimes :

Le régime standard est sous forme de croquettes dont l'apport énergétique se distribue comme suit : 19,3% provient des protéines, 8,4% des lipides et 72,4% d'extrait non azotée (ENA). Dans cette étude, la condition sous régime standard est aussi appelée chow diet (CD). Le régime enrichi en lipides (HF) est lui aussi sous forme de granulés, mais l'essentiel de l'apport énergétique provient des lipides à 59,5% (protéines 16,7%, ENA 22,1%). Le début de chaque expérience est marqué par le passage du régime CD au régime HF. Ce dernier est délivré pendant trois ou huit jours aux souris (cinq souris/groupe). A la suite de quoi, les animaux sont sacrifiés par perfusion intracardiaque (cf. préparation des échantillons pour l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ*) ou par décapitation.

#### Test de tolérance au glucose :

Les animaux sont mis à jeun la veille au soir du sacrifice, afin de réaliser un test de tolérance au glucose (GTT) le lendemain. Après seize heures de jeûne, la glycémie basale est mesurée directement en prélevant une goutte de sang à l'extrémité caudale de la queue et en la plaçant sur une bandelette glycémique du glucomètre (Accu-check, Roche). Chaque animal reçoit ensuite une injection intrapéritonéale de glucose (2g/kg) et la mesure de la glycémie est répétée à 15, 30, 60, 90 et 120 minutes après cette injection.

### Chirurgie : Injections centrales d'un AAV-Sh-GFP (Figure 5A)

L'injection de l'AAV-ShFGF21-GFP, dans les noyaux ARC et le 3V, a pour but d'inactiver spécifiquement l'expression génique de FGF21 dans l'ARC.

Pour cette procédure chirurgicale, six souris mâles CR57BL/6J sont anesthésiées avec de l'isoflurane (Iso-vet ; Induction de l'anesthésie avec 3.5% d'isoflurane® dans l'air à un débit de 2L/min ; Maintien de l'anesthésie avec 1.5% d'isoflurane® dans l'air à un débit de 0.5L/min). A cette anesthésie gazeuse est associée une injection sous-cutanée d'analgésique (Métacam 5mg/mL), ainsi qu'une injection sous-cutanée de solution saline chauffée (NaCl 0.9% à 10mL/kg/h), pour prévenir de la déshydratation de l'animal. Leurs yeux sont recouverts par une pommade ophtalmique, la tête rasée puis leur peau désinfectée avec de la bétadine dermique. La tête de chaque souris est ensuite placée sur un appareil stéréotaxique (Kopf). Un anesthésique local (solution de Lidocaïne 2mg/kg) est administré sous la peau du crâne qui va être incisée. Après la réalisation de la craniotomie, trois injections ont été réalisées à un débit de 0.2µL/min *via* une micro-pompe automatique munie d'un système d'injection. La première injection est faite dans le 3V (coordonnées 3V : antéropostérieur -1.70mm ; latéral 0mm ; profondeur -5.6mm), puis une autre dans chaque noyau ARC (coordonnées ARC : antéropostérieur -2.18mm ; latéral ±0.25mm ; profondeur -5.6mm). Ces injections aigües contiennent soit un AAV-scramble mRNA-GFP (AAV2-CMV-EGFP-U6-Scramble\_ShRNA : 1µL de la suspension virale 10<sup>12</sup> GC/mL) ou un AAV-ShFGF21-GFP (AAV2-EGFP-U6-mFGF21-ShRNA de type 2 : 1µL de la suspension virale 10<sup>13</sup> GC/mL). Ces animaux sont finalement recousus, réveillés, puis maintenus en isolement et surveillés quotidiennement après la chirurgie. Pendant cinq semaines, ils ont eu accès à la boisson, à de la nourriture CD *ad libitum* et ont subi un test de tolérance au glucose. Ensuite, le régime CD est substitué par un régime HF pendant trois jours.

Le jour du sacrifice, une injection intrapéritonéale d'insuline à 0,075U/mL est réalisée. La glycémie est relevée avant l'injection et après 20 minutes (cf. Test de tolérance au glucose), afin de connaître l'impact de l'inactivation du FGF21 hypothalamique sur l'altération de la sensibilité à l'insuline induite par le régime HF. Les souris ont ensuite été sacrifiées par décapitation. Les différents TAs (blanc sous-cutané, blanc viscéral, et brun) sont prélevés et pesés individuellement. Le cerveau a été prélevé, puis post-fixé dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% durant 24h. Le lendemain, les cerveaux ont été transférés dans une

solution de sucre 20% (une semaine), puis congelés dans de l'isopentane à -40°C, conservés à -80°C jusqu'à ce qu'ils soient coupés au Cryostat.

#### Préparation des échantillons pour l'immunohistochimie et l'hybridation *in situ* :

Après les trois ou huit jours de régime HF, les animaux sont sacrifiés par perfusion intracardiaque, afin de fixer et de récupérer les cerveaux. Pour cela, les souris sont profondément anesthésiées avec une injection intrapéritonéale de médétomidine (1mg/kg) et de kétamine (60mg/kg) dilués dans du sérum physiologique. La cavité thoracique est alors ouverte. Le ventricule gauche est perfusé à l'aide d'une aiguille reliée à une pompe péristaltique, pendant que l'oreillette droite est percée, afin d'évacuer le sang. Dans un premier temps, le sang est remplacé par du PBS1X, et dans un deuxième temps le PBS1X est remplacé par une solution de PFA 4% qui permet de fixer les tissus. Les cerveaux sont ensuite prélevés, et post-fixés dans de la PFA 4% pendant une nuit à 4°C. Le lendemain, ils sont transférés dans une solution de sucre à 20% à 4°C. Au bout de 48h, ils sont congelés dans de l'isopentane à -40°C pendant 2 minutes puis conservés à -80°C, jusqu'à être coupés au Cryostat. Avec cet appareil, des sections coronales symétriques de 20µm d'épaisseur, sont réalisées à -20°C. Elles sont chacune récupérées et disposées sur des lames de verre Superfrost conservées à -20°C jusqu'à la réalisation de l'immunohistochimie couplée ou non avec de l'hybridation *in situ*.

#### Expérience d'immunohistochimie :

Cette expérience permet la détection et la colocalisation de protéines d'intérêt (FGF21, FGFR1, KLB) exprimées dans le MBH de souris. Ces protéines sont révélées par fluorescence, grâce à des interactions entre antigènes et anticorps.

Pour réaliser cette expérience, les sections coronales d'hypothalamus sont réhydratées avec du PBS1X (trois fois, cinq minutes). A la suite de quoi, elles sont recouvertes d'une solution de NH<sub>4</sub>Cl à 50mM pendant vingt minutes, afin de limiter l'auto-fluorescence de la PFA. Les coupes, une fois rincées (PBS1X : trois fois, cinq minutes), sont incubées dans une solution de blocage, qui est aussi perméabilisante (PBS1X, 0.2% *gelatin fish*, 0.1% TritonX100, 2% *normal donkey serum*), pendant une heure trente à température ambiante. Le but étant de limiter les marquages aspécifiques des anticorps. Ensuite, les anticorps primaires, dilués dans la solution de blocage, sont déposés sur les coupes pendant 48h, à 4°C en chambre humide. Entre deux et trois anticorps primaires d'espèces différentes ont été utilisés simultanément (*rabbit anti-*

FGF21 1/250 ; *rabbit* anti-FGFR1 1/400 ; *rabbit* anti-KLB 1/100 ; *rabbit* anti-IBA1 1/2000 ; *mouse* anti-GFAP 1/500 ; *mouse* anti-NeuN 488 1/400 ; *chicken* anti-Vimentin 1/1000). Après 48h, l'excès d'anticorps primaires est éliminé par rinçage au PBS1X (trois fois, dix minutes). Les anticorps secondaires adéquats, couplés à des fluorochromes, sont dilués au 1/400 dans du PBS1X (cf. tableau des matériaux expérimentaux) et laissés pendant une heure trente à l'obscurité avant d'être éliminés. Pour identifier les noyaux cellulaires, du DAPI dilué au 1/1000 dans du PBS1X est déposé sur les coupes pendant cinq minutes. Ensuite, cette solution est éliminée pour réaliser le montage entre lame et lamelle à la suite du dépôt de VectaShield. La fluorescence des anticorps secondaires étant préservée partiellement par le VectaShield, il est tout de même nécessaire de préserver les coupes à 4°C dans l'obscurité jusqu'à l'observation au microscope.

Remarque : la détection de l'immunoréactivité, de l'anticorps primaire *rabbit* anti-FGF21, nécessite un démasquage antigénique. Pour cela, juste après leur réhydratation, les sections sont immergées pendant sept minutes dans du tampon citrate à 95°C (citrate de sodium 10mM, 0,05% Tween20 ; pH=6). Ensuite, elles sont rincées avec du PBS1X (trois fois, dix minutes) et recouvertes de NH<sub>4</sub>Cl. La suite du protocole est identique à celui exposé précédemment.

#### Hybridation *in situ* combinée avec de l'immunohistochimie

Ici, l'hybridation *in situ* permet la détection de l'ARNm de Fgf21 dans le MBH. Cet ARNm est révélé par fluorescence, grâce à un anticorps anti-DIG-HRP, reconnaissant la sonde-ARN-Fgf21 UTP-DIG complémentaire à la séquence de l'ARNm du Fgf21 (cf. Production de la sonde d'hybridation *in situ*) et grâce au système d'amplification du signal Tyramide (TSA) couplé à un fluorochrome (Cy3 ou Cy5). Le couplage de l'hybridation *in situ* avec l'immunohistochimie permet d'identifier les types cellulaires exprimant cet ARN dans les neurones (*mouse* anti-NeuN 488), les tanocytes (*chicken* anti-Vimentin), les microglies (*rabbit* anti-Iba) et les astrocytes (*mouse* anti-GFAP).

Cette expérience débute par la réhydratation des coupes coronales de cerveau avec du PBS1X (trois fois, dix minutes). À la suite de cela, un tampon d'hybridation (50.2% Formamide, 5.7X SSC, 5.6% Denhardt's, 10% Dextran sulfate, 200µg/mL *RNA yeast*) est déposé pendant deux heures à 65°C dans une chambre humide. Ce tampon sert à perméabiliser et à saturer le tissu

pour l'hybridation des sondes à venir. Au bout de deux heures, la sonde sens ou anti-sens à l'ARNm du Fgf21 souris sont décongelées à température ambiante, diluées dans de l'eau *RNAse free* à 100ng/mL, puis chauffées à 90°C pendant cinq minutes au thermocycler, afin de s'assurer qu'elles se trouvent sous forme monobrin. Ensuite, elles sont diluées dans le tampon d'hybridation chaud et déposées pendant une nuit à 65°C en chambre humide.

Le lendemain, l'excès de sonde est éliminé par une succession de lavage au SSC à concentration décroissante (5X SSC-56% formamide ; 5X SSC ; 1X SSC ; 0.2X SSC). Pour limiter le marquage aspécifique des anticorps, les coupes sont recouvertes d'une solution de blocage (PBS1X, 0,2% TritonX100, 2% *sheep serum*, 10% BSA) pendant 1h30 à température ambiante. Puis l'anticorps anti-DIG-HRP (1/500) et les anticorps primaires (anti-NeuN 1/400, anti-Vimentin 1/1000, anti-IBA1 1/2000, anti-GFAP 1/500) sont dilués ensembles dans un tampon (PBS1X, 0,2% TritonX100, 1% *sheep sérum*, 1% BSA) pendant une nuit à 4°C en chambre humide. L'anticorps anti-DIG sert à identifier la sonde sens ou anti-sens, à l'aide du Tag-DIG de la sonde, tandis que les anticorps primaires sont utilisés pour identifier les protéines spécifiques au différents types cellulaires d'intérêt.

Le jour suivant, l'excès d'anticorps anti-DIG et primaire est éliminé par des lavages avec le tampon de blocage d'immunohistochimie standard (quatre fois, dix minutes). Les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome sont ensuite dilués dans ce tampon et déposés pendant deux heures à température ambiante. Ces anticorps sont choisis en fonction de l'espèce des anticorps primaires utilisés et de la compatibilité des fluorochromes. L'excédent est ensuite enlevé par rinçages au PBS1X (quatre fois, dix minutes). Afin de détecter l'anticorps anti-DIG-HRP par fluorescence sur les coupes, la TSA-Cy5 ou TSA-Cy3 sont diluées au 1/50 dans le tampon fourni par le constructeur, pendant dix minutes à température ambiante. Pour finir, du DAPI est déposé sur les coupes, puis éliminé et le montage entre lame et lamelle à la suite du dépôt de VectaShield est réalisé. Les coupes sont conservées à 4°C dans l'obscurité jusqu'à l'observation au microscope.

#### Production de la sonde d'hybridation *in situ*

A partir d'un échantillon hépatique prélevé sur une souris contrôle, les ARN sont extraits (cf. extraction d'ARN à partir de tissus) et suspendus dans 30µL d'eau *RNAse free*. Le lendemain, ils ont été dosés (cf. dosage des échantillons) puis transformés en leur ADN complémentaire (ADNc) (cf. la Rétrotranscription (RT) des ARN et la *quantitative real time polymerase chain*

*reaction* (qPCR) : RTqPCR). L'ADNc de FGF21 est amplifié spécifiquement par PCR, grâce à des amorces souris sens et anti-sens qui lui sont spécifiques (cf. tableau des matériaux expérimentaux) et dans lesquels sont ajoutés les sites de restriction EcoRI et BamH1 qui serviront au clonage dans le plasmide PSPT. Le produit PCR obtenu est purifié sur colonne en suivant les informations du constructeur du QIAquick *Purification kit* puis digéré par les deux enzymes précitées (15U/μg) dans le Tampon 4 de New England Biolabs (50mM K<sup>+</sup> acétate, 20mM Tris-acétate, 10mM Mg<sup>2+</sup> acétate, 100μg/μL BSA) à 37°C pendant deux heures dans un thermocycler.

Parallèlement, le plasmide PSPT est aussi digéré par EcoR1 (20 U/μg) et BamH1 (20 U/μg) pendant trois heures à 37°C dans le Tampon 4, afin de le linéariser et permettre ensuite l'incorporation de l'insert-FGF21, grâce à la complémentarité de leurs extrémités palindromiques. Ce plasmide contient un gène de résistance à l'antibiotique ampicilline (amp) utile à la sélection, et les promoteurs SP6 et T7 nécessaires pour initier la transcription des ARN sens et antisens

Ensuite, la pureté de l'insert (600pb) et du plasmide PSPT[amp] linéaire (3100pb) obtenus sont vérifiées sur gel d'agarose 1% (*DNA grade agarose*, TBE1X, 0.01% BET). Cette étape permet à la fois de les isoler (migration à 150V pendant 30 minutes) et de les récupérer à partir du gel, à l'aide du kit QIAquick *gel extraction kit*. Ensuite, la ligation de l'insert-FGF21 et du plasmide PSPT[amp] est faite selon les proportions suivantes : 1 :1, 1 :3 et 1 :6 (50ng PSPT[amp] pour 10ng d'insert-FGF21 = 1 :1) en présence de la ligase et de son tampon une nuit à 16°C. Les produits de ligation obtenus sont amplifiés en étant transformés dans des bactéries *Escherichia coli* DH5α par choc thermique : vingt minutes dans de la glace, puis trente secondes à 42°C puis deux minutes dans de la glace. Les bactéries transformées sont alors étalées sur un milieu LB+amp dans des boîtes de pétri à 37°C, permettant ainsi la sélection des clones positifs.

Le lendemain, ces clones sont repiqués et amplifiés dans un tube de culture bactérienne contenant du milieu LB+amp (une nuit à 37°C sous agitation) puis conservés dans 50% glycérol à -80°C. Un échantillon de 5μL de chaque clone dilué est prélevé pour faire une PCR sur colonie, afin de vérifier l'incorporation du produit de ligation dans chacun d'entre eux. Pour cela, l'insert-FGF21 est amplifié grâce aux *primers* SP6 et T7 (1/10) et au mix *Phusion*, via le programme PCR suivant : 30s à 98°C, puis vingt-cinq cycles de : 10s à 98°C, 30s à 60°C, 15s à 72°C. Les produits PCR obtenus sont déposés sur un gel d'agarose 1% (bande à 750pb).



Les plasmides PSPT[amp]+insert-FGF21 sont ensuite extraits des bactéries par l'élaboration de maxi-prep selon les recommandations du fabricant du kit Invitrogen. La séquence d'ADN de l'insert-FGF21 (750pb) a été contrôlée par la plateforme de séquençage (Eurofins) :

```
ATGGAATGGATGAGATCTAGAGTTGGGACCCTGGGACTGTGGGTCCGACTGCTGCTGGCTGTCTTC  
CTGCTGGGGTCTACCAAGCATACCCCATCCCTGACTCCAGCCCCCTCCTCCAGTTTGGGGGTCAA  
GTCCGGCAGAGGTACCTCTACACAGATGACGACCAAGACACTGAAGCCCACCTGGAGATCAGGGA  
GGATGGAACAGTGGTAGGCGCAGCACACCCGAGTCCAGAAAGTCTCCTGGAGCTCAAAGCCTTGA  
AGCCAGGGGTCAATCAAATCCTGGGTGTCAAAGCCTCTAGTTTCTTTGCCAACAGCCAGATGGAG  
CTCTCTATGGATCGCCTCACTTTGATCCTGAGGCCTGCAGCTTCAGAGAAGTCTGCTGCTGGAGGACG  
GTTACAATGTGTACCAGTCTGAAGCCCATGGCCTGCCCTGCGTCTGCCTCAGAAGGACTCCCCAA  
ACCAGGATGCAACATCCTGGGGACCTGTGCGCTTCTGCCATGCCAGGCCTGCTCCACGAGCCC  
CAAGACCAAGCAGGATTCCTGCCCCAGAGCCCCAGATGTGGGCTCCTCTGACCCCCTGAGCAT  
GGTAGAGCCTTTACAGGGCCGAAGCCCCAGCTATGCGTCCTGA
```

Pour l'étape de transcription, nous avons procédé à l'amplification par PCR de l'ADNc FGF21 grâce aux *primers* SP6 et T7 et au kit *Phusion* de chez Biolabs selon le même protocole que précédemment. Les produits PCR sont ensuite purifiés sur colonne en suivant les informations du constructeur du QIAquick *Purification kit*, et dosés au Nanodrop.

Afin d'obtenir les sondes ARN capables de s'hybrider à l'ARNm Fgf21 (T7-FGF21, sonde anti-sens à l'ARNm Fgf21) ou non (SP6-FGF21, sonde sens à l'ARNm Fgf21), une transcription *in vitro* est faite sur 500ng de produits PCR purifiés en présence de 2µL de NTP Mix (UTP-tagDIG), 4µL de tampon 5X, 2µL d'ARN polymérase SP6 ou T7, 1µL de *RNAse inhibitor* (DIG RNA labelling kit (SP6/T7)) pendant deux heures à 37°C. Ensuite, 1µL de DNase I est rajouté, afin de dégrader l'ADN restant à 37°C (15 minutes). Les sondes sont conservées dans de l'EDTA 0.2M, à -80°C pendant une nuit, purifiées à l'aide du MEGAclean kit, vérifiées sur gel d'agarose 1% et dosées au Nanodrop pour être conservées à -80°C jusqu'à la réalisation de l'hybridation *in situ*.

## **Acquisition, traitement des images confocales et quantification des marquages avec ImageJ**

### Imagerie confocale :

Les coupes sont observées par microscopie confocal Zeiss LSM-700. Ce type d'imagerie, réglé avec un pinhole de 1AU (airy unit) et 2% de laser, permet d'acquérir des images de faible profondeur de champ dans le MBH. Pour imager le MBH en entier avec l'objectif x20 (ouverture numérique 0.5 ; EC Plan Néofluar), trois images sont requises : une dans chacun des noyaux

ARC et une dans l'EM. Toutes les images présentées dans les figures (cf. partie résultats) représentent des projections d'intensité maximale. Chacune a été acquise avec l'objectif x20, en 16 bit, 1024x1024 pixels et en vitesse d'acquisition sept. Ensuite, grâce au logiciel ZEN les marquages ont été travaillés en adaptant les réglages du gain et du digital offset. Les réglages sont propres à chaque marquage mais conservés à l'identique entre les différentes conditions expérimentales.

#### Traitement des images confocales :

L'ensemble des quantifications d'images a été réalisé à l'aide du logiciel ImageJ. Les images, empilées dans un même *stack*, sont toutes traitées de la même manière. Après conversion des images en 8 bit, le bruit de fond de chaque image est soustrait au marquage spécifique. Pour cela, une ROI (*region of interest*) est définie et placée dans trois zones différentes, dépourvue de marquage. La moyenne d'intensité de ces trois ROI est soustraite à l'image initiale, afin de mesurer l'intensité de fluorescence du marquage spécifique.

#### Quantification de l'astroglie :

La quantification de l'activation astrocytaire dans le MBH est basée sur le traitement des images du marquage GFAP (cf. Traitement des images confocales). Deux ROI sont définies : une pour l'ARC et une pour l'EM. Celle de l'ARC est toujours placée de manière à être située dans le 3V et à la base de l'ARC, tandis que celle de l'EM englobe toute cette région. Les moyennes d'intensité de fluorescence sont mesurées dans chacune de ces régions, puis additionnées pour refléter celle du MBH entier.

#### Quantification de la microglie :

La quantification de l'activation microgliale dans le MBH est réalisée par le traitement des images du marquage IBA1 (cf. Traitement des images confocales). L'intensité de fluorescence est mesurée de manière identique à celle de GFAP. Le nombre de cellules IBA1 positives est défini en comptant le nombre de corps cellulaires exprimant IBA1 (à l'aide d'un marquage DAPI marquant les noyaux et permettant de repérer chaque cellule). Chaque cellule est numérotée. Pour chacune, le corps cellulaire est délimité, afin de mesurer son aire. On considère que le corps cellulaire s'arrête à la première ramification de chaque prolongement. Ensuite, dix cellules dans chaque ARC et cinq dans l'EM sont sélectionnées, la longueur de l'ensemble de leurs

prolongements est mesurée, ainsi que le nombre d'extrémités, reflétant le nombre de prolongements total émis par la cellule microgliale. Deux conditions sont appliquées. La première est que la mesure débute là où le corps cellulaire s'arrête. La deuxième est qu'un seul saut peut être fait entre deux brins ayant l'air d'appartenir au même filament. Tous ces paramètres de quantification ont été définis en se basant sur trois publications (Heindl & al. de 2018<sup>56</sup>, de Fernandez-Arjona & al. de 2017<sup>233</sup> et de Althammer & al. de 2020<sup>55</sup>).

#### Quantification des expressions de FGF21 dans les tanocytes :

A partir du marquage Vimentine, cinq ROI, le long du 3V, sont définies et transposées sur les marquages d'intérêts (ARNm ou protéine FGF21). L'intensité moyenne de fluorescence a été relevée pour chaque ROI et additionnée.

#### Quantification des expressions de FGF21 dans les neurones :

Une fois les images traitées, une ROI carrée est disposée au centre de chaque noyau ARC. A l'intérieur de cette région le nombre de neurones est compté, en superposant le marquage neuronal nucléaire NeuN à celui du DAPI. Ensuite, le marquage NeuN est superposé à celui d'intérêt (ARNm ou protéine FGF21), afin d'identifier les neurones exprimant FGF21 et d'évaluer leur nombre. Enfin, l'intensité de fluorescence de chaque corps neuronal identifié est mesurée individuellement (100-200 cellules par ARC).

### **Culture cellulaire**

#### Préparation des solutions de stimulations cellulaires :

Le FGF21 humain recombinant (Prospec ; 25µg) est suspendu à 100µg/mL dans 0.1% *bovine serum albumin* (BSA) et conservé à -20°C. La solution mère d'insuline est préparée à 1000nM dans de l'eau *RNAse free* filtrée et conservée à 4°C.

La solution mère de palmitate à 32 mM est préparée dans de l'éthanol absolu, puis conservée à -20°C. Pour préparer le palmitate à 10 mM, l'alcool de la solution mère est évaporé sous un flux d'azote. Les acides gras sont ensuite re-suspendus par trois cycles de sonication et agitation, dans un volume de BSA 13,6%, calculé selon un rapport palmitate/BSA égal à 5:1. La solution obtenue est alors chauffée à 37°C jusqu'à devenir limpide puis elle est conservée à -20°C.

### Culture des différentes lignées cellulaires :

Toutes les cellules utilisées sont cultivées dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup>, à 37°C dans une atmosphère humide (5% de CO<sub>2</sub>, 95% air). La lignée neuronale humaine, SHSY5Y (*human neuroblastoma cell line*), nécessite un milieu de culture RPMI supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal inactivé (65°C pendant trente minutes), 1% de glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine. La lignée neuronale hypothalamique murine mHYPO (*embryonic mouse hypothalamic cell line*) est entretenue dans un milieu de culture DMEM (4,5g/L D-Glucose) supplémenté avec 10% sérum de veau fœtal inactivé, 1% de glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine. La lignée cellulaire microgliale Sima9 nécessite quant à elle un mélange de milieux de culture DMEM (4,5g/L D-Glucose) et F-12 dans des proportions équivalentes. Ce mélange est supplémenté avec 15% de sérum de veau fœtal inactivé, 1% de glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine. Une fois à confluence, toutes ces lignées cellulaires sont ensemencées dans des boîtes de six puits pour le Western Blot, et dans des boîtes de douze puits pour la RTqPCR. La nuit précédant les stimulations cellulaires, les cellules sont rincées avec du PBS1X et sevrées avec leur milieu de culture respectif sans sérum (seize heures).

### Cultures primaires et expériences sur les lignées cellulaires.

#### Cultures primaires de tanocytes.

Les tanocytes ont été isolés à partir des éminences médianes (EM) de l'hypothalamus de rats âgés de dix jours et cultivés (Prevot & al. 2003). Après décapitation et ablation du cerveau, les éminences médianes ont été disséquées et les cellules dissociées ont été cultivées dans un milieu DMEM supplémenté par 10% de SVF, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline/streptomycine ; sous une atmosphère humide de 5% CO<sub>2</sub> à 37°C. Le milieu de culture a été changé tous les deux jours. Une fois la confluence atteinte, les tanocytes ont été isolés des autres types cellulaires par agitation, pendant une nuit à 250 r.p.m. à 37 °C, et ont été ensemencés.

Traitements des tanocytes : Les cellules privées de sérum ont été incubées avec ou sans Palmitate (200µM), FGF21 (10nM) et avec Palmitate + FGF21 pendant seize heures. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS glacé avant l'extraction de l'ARN.

#### Cultures d'astrocytes primaires

Des cultures d'astrocytes primaires hypothalamiques ont été préparées à partir de souris C57BL/6J adultes comme décrit précédemment (Sun & al. 2017). En bref, les hypothalami ont été disséqués, hachés et incubés dans du HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) contenant 0,05% de trypsine, pendant quinze minutes à 37°C. Le tissu digéré par l'enzyme a ensuite été dissocié mécaniquement pendant quinze minutes à l'aide d'une pipette Pasteur et centrifugé à 300g pendant cinq minutes. Le culot a été mis en suspension dans le milieu d'Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) complété par 10% de sérum de veau foetal inactivé, 1% de L-glutamine et 1% de pénicilline-streptomycine. Les cellules ont étéensemencées sur une flasque recouverte de poly-L-lysine et cultivées à 37°C dans un incubateur à 5% de CO<sub>2</sub>, le milieu étant changé tous les trois jours. Après sept jours, les astrocytes ont été isolés des autres types cellulaires par agitation (une nuit à 240 tours/min pendant huit heures), afin d'éliminer les cellules contaminantes. Les astrocytes adhérents ont été maintenus dans un milieu spécifique aux astrocytes jusqu'à confluence. Les cellules ont ensuite été détachées et placées dans des plaques de vingt-quatre puits, recouvertes de poly-L-lysine. Vingt-quatre heures avant les expériences, les cellules ont été privées de sérum et stimulées pendant seize heures avec ou sans FGF21 (10nM), Palmitate (300µM) et Palmitate+FGF21. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS glacé avant l'extraction de l'ARN.

#### Stimulations cellulaires :

Les cellules sont stimulées en présence ou en absence de FGF21 (10nM), d'insuline (100nM) ou de palmitate (0.5mM). Avant chaque stimulation, la solution mère de palmitate doit être chauffée une heure à 37°C. Les cellules stimulées sont ensuite incubées à 37°C pendant seize heures (étude du dialogue entre le palmitate et le FGF21), ou pendant quatre heures (étude du dialogue entre l'insuline et le FGF21) suivies d'une stimulation de dix minutes par l'insuline. Les stimulations (trois puits par condition) sont toutes stoppées par aspiration du milieu. Les cellules sont rincées avec du PBS1X, puis celles destinées à l'analyse de l'expression protéique par Western Blot reçoivent 100µL de bleu de lyse, tandis que celles destinées à l'analyse de l'expression génique par RTqPCR reçoivent 150µL de TRIzol. Les boîtes ont ensuite été stockées au -80°C jusqu'à utilisation.

#### Western Blot

##### Préparation des échantillons :

Les cellules SHSY5Y sont grattées dans 100µL de tampon de lyse, composé de NP40 1X, de glycérol 10X, Triton 1X, d'un tampon (Tris HCL 20mM, NaCl 137mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 100µM), d'anti-protéases et d'anti-phosphatases. Les suspensions obtenues sont homogénéisées par sonication dans de la glace. Les homogénats résultants sont bouillis à 95°C pendant trois minutes.

#### Electrophorèse SDS Page et Western Blot :

Cette technique permet de déterminer l'expression de protéines d'intérêt en fonction des conditions de stimulation cellulaire. Les protéines des échantillons (20µL) sont séparées selon leur poids moléculaire, par électrophorèse en condition dénaturante. La migration sur gel de polyacrylamide 8% (Acrylamide, Tris-HCL 1,5M pH8,8, Tris-HCL 1M 6,8pH, APS, SDS, eau miliQ, Temed) est effectuée dans un tampon de migration (Tris/Glycine, 20% SDS), à 60V dans le gel de concentration, et à 90V dans celui de séparation. La migration terminée, les protéines sont transférées sur des membranes PVDF (activées préalablement avec du méthanol), à la suite de l'application d'un courant électrique (20V, 200mA pendant une heure). Le tampon de transfert est un tampon Tris Glycine 10% méthanol. Après le transfert, les membranes sont saturées avec une solution de blocage (5% BSA dans TBS1X 0.1%Tween20) pendant une heure à température ambiante. La solution de blocage est éliminée puis les membranes sont incubées une nuit à 4°C sous agitation avec des anticorps primaires dilués dans de la BSA (p-AKT 1/2000, p-ERK1/2 1/2000, α-Tubulin 1/10000 : tableau des matériaux expérimentaux).

Le lendemain, les membranes sont rincées avec du TBS-Tween 0.1% et incubées une heure avec des anticorps secondaires (*anti-mouse* (1/2000) ou *anti-rabbit* (1/15000)). Les protéines ont été révélées par ECL et visualisées à l'aide de films photographiques ou du *Carestream Molecular Imaging System 4000MM Pro* (Health Inc., CT, USA). Une analyse semi-quantitative de l'intensité des bandes dans les *blots* a été réalisée en utilisant ImageJ. Les expressions protéiques sont normalisées par rapport aux expressions de l'α-tubuline.

#### RTqPCR

##### Extraction d'ARN à partir de cellules :

Les cellules stimulées sont grattées et lysées dans le 150µL de TRIzol. L'extraction des ARN est réalisée par ajout de 40µL de chloroforme et d'une centrifugation (quinze minutes à 12000g à 4°C). Le surnageant contenant les ARN est alors récupéré. Les ARN sont ensuite précipités,

grâce à l'ajout de 100µL d'isopropanol (une heure à 4°C) suivi d'une centrifugation (dix minutes à 12000g à 4°C). L'isopropanol est enlevé par retournement, les ARN culottés sont alors lavés avec de l'éthanol à 80%, centrifugés (cinq minutes à 7500g à 4°C) et séchés. Enfin, ils sont remis en suspension dans 20µL d'eau *RNAse free* et conservés à -20°C jusqu'à la réalisation de la RTqPCR.

#### Extraction d'ARN à partir de tissus :

Différents organes (hypothalamus, foie, TA, muscles) sont prélevés juste après la décapitation des animaux. Ils sont congelés directement dans de l'azote liquide et conservés à -80°C. Pour l'extraction des ARNm, ces échantillons de tissus sont décongelés, puis lysés et homogénéisés avec l'appareil Precellys 24/Cryolys, dans 750µL de TRIzol. La suite de l'extraction est identique à celle sur cellules (200µL de chloroforme, 500µL d'isopropanol).

#### Dosage des échantillons :

Avant de réaliser la RTqPCR, la concentration en ARN de nos échantillons a été évaluée par le Nanodrop, ainsi que leur qualité grâce à la mesure du rapport A260 sur A280nm inférieur à deux. En fonction des résultats du dosage, des dilutions ont été effectuées, afin de ramener les échantillons à des concentrations équivalentes.

#### La Rétrotranscription (RT) des ARN et la *quantitative real time polymerase chain reaction* (qPCR) : RTqPCR

La RTqPCR sert à l'étude de l'expression de gène d'intérêt en fonction des conditions de stimulation cellulaire. Elle se déroule en deux étapes, toujours sur de la glace pour éviter la dégradation des acides nucléiques. La première étape consiste à transformer les ARN issus d'extraits cellulaires en ADNc. Pour chaque échantillon, les ARN sont mélangés (2µg dans 7.5µL (qsp avec de l'eau *RNAse free*) avec 2.5µL de MIX (2µL *qScript reaction Mix 5X* (dNTP (*desoxy nucleotide tri-phosphate*), *RT Buffer*, oligo dT, magnésium, et *random primer*) puis 0.5µL de l'enzyme *qScript*). L'enzyme *qScript* est une reverse transcriptase, c'est une ADN polymérase ARN dépendante. Les tubes sont ensuite centrifugés puis disposés dans un appareil à PCR (thermal cycler) où s'effectue le programme suivant : 5 min à 22°C, 30 min à 42°C, 5 min à 85°C pour terminer à 4°C.

La seconde étape consiste à amplifier les ADNc obtenus en présence d'amorce ciblant les gènes cibles. Les produits de RT sont dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau *RNAse free*. A partir de ces dilutions, 2.5µL de chaque dilution sont déposés (en double) dans les puits, auxquels viennent s'ajouter 7.5µL de MIX PCR (5µL de *SYBER MIX 2X* (MgCl<sub>2</sub>, dNTP, *Taq DNA polymerase*, *SYBR Green I dye*, *ROX reference dye*) + 0.8 µL de *primer* sens et anti-sens + 0.9 µL d'eau). La plaque est alors placée dans l'appareil qPCR, où sont réalisés quarante cycles du programme suivant : 30s à 95°C (étape d'activation), 5s à 95°C (étape de dénaturation) et 20s à 60°C (étape d'amplification). Lorsqu'un signal est détecté cela reflète que le *SYBR Green* s'est intercalé de façon aléatoire dans les structures doubles brins pour émettre un signal fluorescent. Cela permet donc de suivre l'amplification de notre fragment d'intérêt au cours du temps. Les analyses PCR ont été réalisées avec le logiciel CFX Manager (BioRad) qui détermine les valeurs de Ct (ou Cq *quantitation cycle*) permettant d'estimer le niveau d'expression, l'efficacité de la réaction et les erreurs standards. Plus un Ct est faible, plus l'amplification est importante.

### Analyses statistiques

Pour les études *in vivo*, le "n" indiqué dans les légendes des figures correspond au nombre d'animaux par groupe. Pour les études *in vitro*, le "N" indique le nombre d'expériences indépendantes réalisées et le « n » indique le nombre d'échantillons par condition. Pour comparer les différences entre le groupe témoin et un groupe expérimental, les résultats sont analysés avec le test Mann-Whitney. Pour les comparaisons multiples entre les groupes, le test Kruskal-Wallis est utilisé. Les valeurs \*p < 0,5 ont été considérées comme significatives et celles entre 0.05 <# p < 0,1 ont été stipulées à titre informatif. Les données sont présentées sous forme de moyenne ±SEM pour les histogrammes, et de boxplot incluant les médianes et les valeurs aberrantes.

### Produits expérimentaux

Produits	Fournisseur	Référence
Anticorps		
Alexa Fluor 488 <i>anti-chicken</i>	Life technologies	A11039
Alexa Fluor 488 <i>anti-mouse</i>	Life technologies	A21202
Alexa Fluor 488 <i>anti-rabbit</i>	Life technologies	A21206



Alexa Fluor 555 <i>anti-mouse</i>	Life technologies	A31570
Alexa Fluor 555 <i>anti-rabbit</i>	Life technologies	A31572
Alexa Fluor 647 <i>anti-chicken</i>	Life technologies	AB2535866
Alexa Fluor 647 <i>anti-mouse</i>	Invitrogen	A31571
Alexa Fluor 647 <i>anti-rabbit</i>	Invitrogen	A21245
Anti-Digoxigenin-POD (anti-DIG)	Roche	11207733910
Anti-mouse IgG peroxidase	Sigma-Aldrich	A5906
Anti-phospho Akt (Ser473) (D9E) XP	Ozyme	Cat#4060
<i>Chicken</i> anti-Vimentin	Millipore	Cat#AB5733
<i>Mouse</i> anti-GFAP	Sigma-Aldrich	Cat#3893
<i>Mouse</i> anti-NeuN A488	Millipore	Cat#MAB377X
Phospho-p44/42 MAPK (T202/Y204) (D13.14.4E) XP	Ozyme	Cat#4370
<i>Rabbit</i> anti-FGF21	Abcam	Cat# ab171941
<i>Rabbit</i> anti-FGFR1	Abcam	Cat#ab10646
<i>Rabbit</i> anti-IBA1	Biocare medicals	Cat#CP290A
<i>Rabbit</i> anti-KLB	Thermofisher	Cat#PA5-44023
$\alpha$ - <i>rabbit</i> HRP	Sigma-Aldrich	A9159
$\alpha$ -tubulin	Sigma-Aldrich	Cat#T9026
Peptides et protéines recombinantes		
<i>BAMH1</i> restriction enzym	Biolabs	#R3136S
<i>EcoR1</i> restriction enzym	Biolabs	R0101S
<i>human FGF21</i>	Prospec	cyt-474
<i>Insulin</i>	Actrapid	YS64485
<i>Palmitate</i>	Sigma-Aldrich	N/A
Oligonucléotides		
<i>Primer SP6</i>	Eurofins Genomics	H675 38-4051-1/2
<i>Primer T7</i>	Eurofins Genomics	H675 38-4051-2/2
Amorses - RTqPCR		
<b>gènes</b>	<b>sens</b>	<b>anti-sens</b>
<i>mouse</i> FGF21	TACCAAGCATACCCCATCCC	TGTCCTTGGTCGTCATCTGTGT
<i>mouse</i> FGFR1	TGTTTGACCGGATCTACACACA	CTCCCACAAGAGCACTCCAA

<i>mouse</i> GAPDH	ATGATGACCCGTTTGGCTCC	GCCATCAACGACCCCTTCAT
<i>mouse</i> IL-1 $\beta$	CCAACAAGTGATATTCTCCATGAGC	TGCCGTCTTTCATTACACAGGA
<i>mouse</i> IL-6	GCCTTCTTGGGACTGATGCTGGT	TCCTCTGTGAAGTCTCCTCTCCG
<i>mouse</i> KLB	CTCTGTGCTTGGATGGTTCG	CCTCACCTCCTCCTTCTCTG
<i>mouse</i> RPL19	GGGCAGGCATATGGGCATA	GGCGGTCAATCTTCTTGGATT
<i>mouse</i> TNF $\alpha$	AAGTCAACCTCTCTGCC	TCCAAAGTAGACCTGCCCCG
<i>mouse</i> $\beta$ -actin	TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC	GCTCGTTGCCAATAGTGATGACC
Produits et kits		
2-Methylbutane	Sigma-Aldrich	270342-1L
Acrylamide	Euromedex	EU0073-B
APS	Euromedex	EU0009-C
BSA	PAA	K41-012-500
Chloroforme	Sigma-Aldrich	C2432-1L
Citrate de sodium	Sigma-Aldrich	S-4641
Denhardt's 100X	Qbiogene	cat#DENH1003
<i>DIG RNA labeling kit (SP6/T7)</i>	Roche	11175025910
<i>DNA grade agarose</i>	VWR	EC232-731-8
<i>Donkey Serum</i>	Sigma	D9663-10ML
EDTA	Millipore	25102-12-9 8 19040.0100
Ethanol 98%	VWR	20821,31
Formamide	Sigma	47671-250ML-F
<i>Gelatin fish skin</i>	Sigma	G7765
D-Glucose (poudre)	Euromedex	UG3050-A
Glycérol	Sigma-Aldrich	G5516-500ml
Glycine	Qbiogene	#GINE01KG
Isopentane	Sigma-Aldrich	270342-1L
Isopropanol	Sigma-Aldrich	CI9516-500mL
Lame Superfrost	Thermo scientific	J1800AMNZ
Marqueur de poids moléculaire Western Blot	Euromedex	#06P-0111
<i>Maxiprep kit : PureLink HiPure Plasmid Filter DNA Purification kit</i>	Invitrogen	K210017
<i>MEGAclear kit</i>	Invitrogen	AM1908
Membrane PVDF	Millipore	IPVH00010

Méthanol	VWR	20846,292
NH4Cl (poudre)	Sigma-Aldrich	A-0171
<i>OmniPur Dextran Sulfate</i>	Millipore	3730-100ML - 1PCX100ML
Paraformaldéhyde 36%	Analab NORMAPUR	UN2209
PBS 10X	Life technologies	14200-067
<i>Phusion Mix</i>	Biolabs	m0531s
<i>QIAquick gel extraction kit</i>	Qiagen	28704
<i>QIAquick Purification kit</i>	Qiagen	28104
<i>qScript cDNA synthesis kit</i>	Quantabio	95047-100
<i>RNA from Yeast</i>	Roche	109 223
<i>RNAse-free Water</i>	Invitrogen	10977-035
SDS 20%	Euromedex	EU0460-B
<i>Sheep Serum</i>	Sigma	52263
<i>SSC buffer (20X)</i>	Alfa Aesar	J60839
Sucrose	Fisher science	S/8560/60 1084645
<i>SYBR green FastMix</i>	Quantabio	95073-05K
TBE 10X	Invitrogen	15581-044
Temed	Sigma-Aldrich	T-8133
Tris base	Euromedex	200923-A
Tris-HCl	Euromedex	EU0011
TritonX100	Sigma	T8989-100ML
<i>TRIzol reagent</i>	Ambion by Life technologies	15596018
<i>TSA Plus Cy3 system</i>	Akoya Biosciences	NEL744001KT
<i>TSA Plus Cy5 system</i>	Akoya Biosciences	NEL745001KT
Tween	Millipore	8,221841,000
Vectashield	Diagomics	E18-18
<i>WesternBright ECL</i>	Advansta	K-12045-D50
Produits de culture cellulaire		
Ampicilline	Sigma-Aldrich	A9518
DMEM 4,5g/L glucose	Gibco	11965-092 (500ml)
<i>F-12 medium Nut Miw (1X)</i>	Gibco	21765-029
<i>Fetal Bovine Serum</i>	Sigma	F7524
<i>LB medium</i>	Production at home	N/A
L-Glutamine 200mM (100X)	Gibco	25030-081
<i>Eagle medium</i>	Dulbecco	
Pénicilline-Streptomycine	Gibco	15140-122

RPMI medium 1549 (1X)	Gibco	21875-09
Modèles et organismes expérimentaux		
Mouse C57BL/6J	Janvier Labs	Cat#C57Bl/6RJ mice
<i>Escherichia coli</i> DH5α	STRATAGEME	N/A
Molécules pharmacologiques		
Isoflurane	Iso Vet	N/A
Kétamine 100mg/mL	Imalgène 1000	Boehringer
Médétomidine 0,85mg/mL	Domitor	Orion pharma
Méloxicam	Métacam	Boehringer Ingelheim animal
NaCl injectable	Lavoisier	34009 3057897 1
Régimes alimentaires		
Chow diet (CD)	SAFE	A04
High Fat Diet (HFD)	SAFE	U8954P version 0205 - 292HF
AAV-ShRNA-GFP		
AAV-shFGF21-GFP	VectorBuilder	VB191122-5441cvh
AAV-scramble mRNA-GFP	VectorBuilder	VB180117-1020znr
Logiciels		
ImageJ	Schneider & al 2012	
Zen Software	Zeiss	

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Renaud, J., Thérien, H.-M., Plouffe, M. & Martinoli, M.-G. La neuro-inflammation: Dr Jekyll ou Mr Hyde, *Med Sci (Paris)* **31**, 979–988 (2015).
2. Chow, B. W. & Gu, C. The Molecular Constituents of the Blood–Brain Barrier. *Trends in Neurosciences* **38**, 598–608 (2015).
3. Dorfman, M. D. & Thaler, J. P. Hypothalamic inflammation and gliosis in obesity: *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* **22**, 325–330 (2015).
4. Berthoud, H.-R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* **26**, 393–428 (2002).
5. Cerri, M. The Central Control of Energy Expenditure: Exploiting Torpor for Medical Applications. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 167–186 (2017).
6. Brobeck, J. R., Tepperman, J. & Long, C. N. H. Experimental hypothalamic hyperphagia in the albino rat. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 25.
7. Anand, B. K., Dua, S. & Shoenberg, K. Hypothalamic control of food intake in cats and monkeys. *The Journal of Physiology* **127**, 143–152 (1955).
8. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J. & Baskin, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661–671 (2000).
9. Elizondo-Vega, R. *et al.* The role of tanycytes in hypothalamic glucosensing. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 1471–1482 (2015).
10. Dragano, N. R., Monfort-Pires, M. & Velloso, L. A. Mechanisms Mediating the Actions of Fatty Acids in the Hypothalamus. *Neuroscience* **447**, 15–27 (2020).
11. Prevot, V. *et al.* The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocrine Reviews* **39**, 333–368 (2018).
12. Mullier, A. Etude des interfaces sang/cerveau dans la région tubérale de l’hypothalamus médiobasal: rôle des tanycytes de l’éminence médiane. 162.
13. Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V. & Dehouck, B. 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 (2010).
14. Balland, E. *et al.* Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain. *Cell Metabolism* **19**, 293–301 (2014).
15. Prevot, V., Dutoit, S., Croix, D., Tramu, G. & Beauvillain, J. C. Semi-quantitative ultrastructural analysis of the localization and neuropeptide content of gonadotropin releasing hormone nerve terminals in the median eminence throughout the estrous cycle of the rat. *Neuroscience* **84**, 177–191 (1998).
16. Giacobini, P. *et al.* Brain Endothelial Cells Control Fertility through Ovarian-Steroid-Dependent Release of Semaphorin 3A. *PLoS Biol* **12**, e1001808 (2014).
17. Toda, C., Santoro, A., Kim, J. D. & Diano, S. POMC Neurons: From Birth to Death. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 209–236 (2017).
18. Sternson, S. M., Atasoy, D., Betley, J. N., Henry, F. E. & Xu, S. An Emerging Technology Framework for the Neurobiology of Appetite. *Cell Metabolism* **23**, 234–253 (2016).
19. Koch, M. *et al.* Hypothalamic POMC neurons promote cannabinoid-induced feeding. *Nature* **519**, 45–50 (2015).
20. Diano, S. New aspects of melanocortin signaling: A role for PRCP in  $\alpha$ -MSH degradation. *Frontiers in Neuroendocrinology* **32**, 70–83 (2011).

21. Jackson, R. S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nature genetics* **16(3)**, 303–306 (1997).
22. Bouret, S. G. Formation of Projection Pathways from the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus to Hypothalamic Regions Implicated in the Neural Control of Feeding Behavior in Mice. *Journal of Neuroscience* **24**, 2797–2805 (2004).
23. Bouret, S. G. Trophic Action of Leptin on Hypothalamic Neurons That Regulate Feeding. *Science* **304**, 108–110 (2004).
24. Malik, S. A. *et al.* Neuroendocrine regulation of autophagy by leptin. *Cell Cycle* **10**, 2917–2923 (2011).
25. Breton, C. *et al.* Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **296**, E462–E472 (2009).
26. Delahaye, F. *et al.* Maternal Perinatal Undernutrition Drastically Reduces Postnatal Leptin Surge and Affects the Development of Arcuate Nucleus Proopiomelanocortin Neurons in Neonatal Male Rat Pups. *Endocrinology* **149**, 470–475 (2008).
27. Fuente-Martín, E. *et al.* Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J. Clin. Invest.* **122**, 3900–3913 (2012).
28. Sun, B. *et al.* Maternal High-Fat Diet During Gestation or Suckling Differentially Affects Offspring Leptin Sensitivity and Obesity. 9.
29. Hu, J., Jiang, L., Low, M. J. & Rui, L. Glucose Rapidly Induces Different Forms of Excitatory Synaptic Plasticity in Hypothalamic POMC Neurons. *PLoS ONE* **9**, e105080 (2014).
30. Krashes, M. J. *et al.* An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature* **507**, 238–242 (2014).
31. van den Top, M., Lee, K., Whyment, A. D., Blanks, A. M. & Spanswick, D. Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat Neurosci* **7**, 493–494 (2004).
32. Clark, J. T., Kalra, P. S., Crowley, W. R. & Kalra, S. P., Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. *Endocrinology* **115**, 427–429 (1984).
33. Ollmann, M. M. Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* **278(5335)**, 135–138 (1997).
34. Krashes, M. J., Shah, B. P., Koda, S. & Lowell, B. B. Rapid versus Delayed Stimulation of Feeding by the Endogenously Released AgRP Neuron Mediators GABA, NPY, and AgRP. *Cell Metabolism* **18**, 588–595 (2013).
35. Aponte, Y., Atasoy, D. & Sternson, S. M. AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nat Neurosci* **14**, 351–355 (2011).
36. Waise, T. M. Z. *et al.* One-day high-fat diet induces inflammation in the nodose ganglion and hypothalamus of mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **464**, 1157–1162 (2015).
37. Thaler, J. P. *et al.* Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J. Clin. Invest.* **122**, 153–162 (2012).
38. De Souza, C. T. *et al.* Consumption of a Fat-Rich Diet Activates a Proinflammatory Response and Induces Insulin Resistance in the Hypothalamus. *Endocrinology* **146**, 4192–4199 (2005).
39. Zhang, X. *et al.* Hypothalamic IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity. *Cell* **135**, 61–73 (2008).
40. Kreutzberg, G. W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences* **19**, 312–318 (1996).

41. Jastroch, M., Morin, S., Tschöp, M. H. & Yi, C.-X. The hypothalamic neural–glial network and the metabolic syndrome. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **28**, 661–671 (2014).
42. Harrison, L., Pfuhlmann, K., Schriever, S. C. & Pfluger, P. T. Profound weight loss induces reactive astrogliosis in the arcuate nucleus of obese mice. *Molecular Metabolism* **24**, 149–155 (2019).
43. Poskanzer, K. E. & Molofsky, A. V. Dynamism of an Astrocyte In Vivo: Perspectives on Identity and Function. *Annu. Rev. Physiol.* **80**, 143–157 (2018).
44. Haydon, P. G. & Carmignoto, G. Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling. *Physiological Reviews* **86**, 1009–1031 (2006).
45. Wolf, S. A. Microglia in Physiology and Disease. 28 (2017).
46. Hoeffel, G. & Ginhoux, F. Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
47. Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W. & Rossi, F. M. V. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* **10**, 1538–1543 (2007).
48. Valdearcos, M. and *al.* Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function. *Cell Reports* **9**, 2124–2138 (2014).
49. Kwon, Y.-H. *et al.* Hypothalamic lipid-laden astrocytes induce microglia migration and activation. *FEBS Lett* **591**, 1742–1751 (2017).
50. Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.-A., Ceyzériat, K. & Escartin, C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, (2015).
51. Horvath, T. L. *et al.* Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 14875–14880 (2010).
52. Müller, F.-J., Snyder, E. Y. & Loring, J. F. Gene therapy: can neural stem cells deliver? *Nat Rev Neurosci* **7**, 75–84 (2006).
53. Reis, W. L., Yi, C.-X., Gao, Y., Tschöp, M. H. & Stern, J. E. Brain Innate Immunity Regulates Hypothalamic Arcuate Neuronal Activity and Feeding Behavior. *Endocrinology* **156**, 1303–1315 (2015).
54. Bilimoria, P. M. Microglia function during brain development\_ New insights from animal models. *brain research* 11.
55. Althammer, F. *et al.* Three-dimensional morphometric analysis reveals time-dependent structural changes in microglia and astrocytes in the central amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus of heart failure rats. *J Neuroinflammation* **17**, 221 (2020).
56. Heindl, S. *et al.* Automated Morphological Analysis of Microglia After Stroke. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 106 (2018).
57. Buckman, L. B. *et al.* Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. *Brain, Behavior, and Immunity* **35**, 33–42 (2014).
58. Berkseth, K. E. *et al.* Hypothalamic Gliosis Associated with High-Fat Diet Feeding Is Reversible in Mice: A Combined Immunohistochemical and Magnetic Resonance Imaging Study. *Endocrinology* **155**, 2858–2867 (2014).
59. Lim, S.-H. *et al.* Neuronal Synapse Formation Induced by Microglia and Interleukin 10. *PLoS ONE* **8**, e81218 (2013).
60. Basco, E., Woodhams, P. L., Hajos, F., & Balazs, R. (1981). Immunocytochemical demonstration of glial fibrillary acidic protein in mouse tanycytes. *Anatomy and embryology*, 162(2), 217-222.

61. Kameda, Y., Arai, Y. & Nishimaki, T. Ultrastructural localization of vimentin immunoreactivity and gene expression in tanycytes and their alterations in hamsters kept under different photoperiods. *Cell and Tissue Research* **314**, 251–262 (2003).
62. Bennett, L., Yang, M., Enikolopov, G. & Iacovitti, L. Circumventricular organs: A novel site of neural stem cells in the adult brain. *Molecular and Cellular Neuroscience* **41**, 337–347 (2009).
63. Mirzadeh, Z. *et al.* Bi- and unciliated ependymal cells define continuous floor-plate-derived tanycytic territories. *Nat Commun* **8**, 13759 (2017).
64. Coppola, A. *et al.* A Central Thermogenic-like Mechanism in Feeding Regulation: An Interplay between Arcuate Nucleus T3 and UCP2. *Cell Metabolism* **5**, 21–33 (2007).
65. Langlet, F. *et al.* Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in Response to Fasting. *Cell Metabolism* **17**, 607–617 (2013).
66. García, M. de los A. *et al.* Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing: GLUT2 expression in hypothalamic glial tanycytes. *Journal of Neurochemistry* **86**, 709–724 (2003).
67. Salgado, M. *et al.* Dynamic Localization of Glucokinase and Its Regulatory Protein in Hypothalamic Tanycytes. *PLoS ONE* **9**, e94035 (2014).
68. Thomzig, A., Laube, G., Prüss, H. & Veh, R. W. Pore-forming subunits of K-ATP channels, Kir6.1 and Kir6.2, display prominent differences in regional and cellular distribution in the rat brain: K-ATP Channel Subunits in the Rodent Brain. *J. Comp. Neurol.* **484**, 313–330 (2005).
69. Bolborea, M., Pollatzek, E., Benford, H., Sotelo-Hitschfeld, T. & Dale, N. Hypothalamic tanycytes generate acute hyperphagia through activation of the arcuate neuronal network. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**, 14473–14481 (2020).
70. Müller-Fielitz, H. *et al.* Tanycytes control the hormonal output of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Nat Commun* **8**, 484 (2017).
71. Parkash, J. *et al.* Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic median eminence. *Nat Commun* **6**, 6385 (2015).
72. Caro, J. F. *et al.* Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *The Lancet* **348**, 159–161 (1996).
73. Van Heek, M. *et al.* Diet-induced obese mice develop peripheral, but not central, resistance to leptin. *J. Clin. Invest.* **99**, 385–390 (1997).
74. El-Haschimi, K., Pierroz, D. D., Hileman, S. M., Bjørnbæk, C. & Flier, J. S. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **105**, 1827–1832 (2000).
75. Myers, M. G., Leibel, R. L., Seeley, R. J. & Schwartz, M. W. Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **21**, 643–651 (2010).
76. Collden, G. *et al.* Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Molecular Metabolism* **4**, 15–24 (2015).
77. Kharitononkov, A. *et al.* FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J. Clin. Invest.* **115**, 1627–1635 (2005).
78. Kharitononkov, A. *et al.* The Metabolic State of Diabetic Monkeys Is Regulated by Fibroblast Growth Factor-21. *Endocrinology* **148**, 774–781 (2007).
79. Coskun, T. *et al.* Fibroblast Growth Factor 21 Corrects Obesity in Mice. *Endocrinology* **149**, 6018–6027 (2008).
80. Kharitononkov, A. & Adams, A. C. Inventing new medicines: The FGF21 story. *Molecular Metabolism* **3**, 221–229 (2014).
81. Ornitz, D. M. & Itoh, N. Fibroblast growth factors. 12.



82. Owen, B. M., Mangelsdorf, D. J. & Kliewer, S. A. Tissue-specific actions of the metabolic hormones FGF15/19 and FGF21. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **26**, 22–29 (2015).
83. Donate-Correa, J. *et al.* Implications of Fibroblast growth factor/Klotho system in glucose metabolism and diabetes. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **28**, 71–77 (2016).
84. Murata, Y., Konishi, M. & Itoh, N. FGF21 as an Endocrine Regulator in Lipid Metabolism: From Molecular Evolution to Physiology and Pathophysiology. *Journal of Nutrition and Metabolism* **2011**, 1–8 (2011).
85. Fon Tacer, K. *et al.* Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Molecular Endocrinology* **24**, 2050–2064 (2010).
86. Beenken, A. & Mohammadi, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 235–253 (2009).
87. Inagaki, T. *et al.* Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metabolism* **2**, 217–225 (2005).
88. Itoh, N. FGF21 as a Hepatokine, Adipokine, and Myokine in Metabolism and Diseases. *Front. Endocrinol.* **5**, (2014).
89. Rydén, M. Fibroblast growth factor 21: an overview from a clinical perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 2067–2073 (2009).
90. Hondares, E. *et al.* Thermogenic Activation Induces FGF21 Expression and Release in Brown Adipose Tissue. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 12983–12990 (2011).
91. Izumiya, Y. *et al.* FGF21 is an Akt-regulated myokine. *FEBS Letters* **582**, 3805–3810 (2008).
92. Nishimura, T., Nakatake, Y., Konishi, M. & Itoh, N. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochimica et Biophysica Acta* **4**.
93. Gälman, C. *et al.* The Circulating Metabolic Regulator FGF21 Is Induced by Prolonged Fasting and PPAR $\alpha$  Activation in Man. *Cell Metabolism* **8**, 169–174 (2008).
94. Zhang, X. *et al.* Serum FGF21 Levels Are Increased in Obesity and Are Independently Associated With the Metabolic Syndrome in Humans. *Diabetes* **57**, 1246–1253 (2008).
95. Mai, K. *et al.* Physiological modulation of circulating FGF21: relevance of free fatty acids and insulin. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **299**, E126–E130 (2010).
96. Gimeno, R. E. & Moller, D. E. FGF21-based pharmacotherapy – potential utility for metabolic disorders. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **25**, 303–311 (2014).
97. Ogawa, Y., Kurosu, H., Yamamoto, M., Nandi, A., Rosenblatt, K. P., Goetz, R., ... & Kuro-o, M. (2007).  $\beta$ Klotho is required for metabolic activity of fibroblast growth factor 21. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(18), 7432-7437.
98. Dai, S., Zhou, Z., Chen, Z., Xu, G. & Chen, Y. Fibroblast Growth Factor Receptors (FGFRs): Structures and Small Molecule Inhibitors. *Cells* **8**, 614 (2019).
99. Zhang, X. *et al.* Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 15694–15700 (2006).
100. Kharitonov, A. *et al.* FGF-21/FGF-21 receptor interaction and activation is determined by  $\beta$ Klotho. *J. Cell. Physiol.* **215**, 1–7 (2008).
101. Yang, C. *et al.* Differential Specificity of Endocrine FGF19 and FGF21 to FGFR1 and FGFR4 in Complex with KLB. *PLoS ONE* **7**, e33870 (2012).
102. Ito, S. *et al.* Molecular cloning and expression analyses of mouse  $\beta$ klotho, which encodes a novel Klotho family protein. *Mechanisms of Development* **5** (2000).
103. Lee, S. *et al.* Structures of  $\beta$ -klotho reveal a 'zip code'-like mechanism for endocrine FGF signalling. *Nature* **553**, 501–505 (2018).

104. Moyers, J. S. *et al.* Molecular determinants of FGF-21 activity—synergy and cross-talk with PPAR $\gamma$  signaling. *J. Cell. Physiol.* **210**, 1–6 (2007).
105. Ding, X. *et al.*  $\beta$ Klotho Is Required for Fibroblast Growth Factor 21 Effects On Growth and Metabolism. 16 (2013).
106. Inagaki, T. *et al.* Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR $\alpha$ -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. *Cell Metabolism* **5**, 415–425 (2007).
107. Badman, M. K. *et al.* Hepatic Fibroblast Growth Factor 21 Is Regulated by PPAR $\alpha$  and Is a Key Mediator of Hepatic Lipid Metabolism in Ketotic States. *Cell Metabolism* **5**, 426–437 (2007).
108. Hui, X., Feng, T., Liu, Q., Gao, Y. & Xu, A. The FGF21–adiponectin axis in controlling energy and vascular homeostasis. *J Mol Cell Biol* **8**, 110–119 (2016).
109. Fisher, f. M. *et al.* Obesity Is a Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21)-Resistant State. *Diabetes* **59**, 2781–2789 (2010).
110. Markan, K. R. *et al.* FGF21 resistance is not mediated by downregulation of beta-klotho expression in white adipose tissue. *Molecular Metabolism* **6**, 602–610 (2017).
111. Hale, C. *et al.* Lack of Overt FGF21 Resistance in Two Mouse Models of Obesity and Insulin Resistance. *Endocrinology* **153**, 69–80 (2012).
112. Lin, Z. *et al.* Adiponectin Mediates the Metabolic Effects of FGF21 on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity in Mice. *Cell Metabolism* **17**, 779–789 (2013).
113. Holland, W. L. *et al.* An FGF21-Adiponectin-Ceramide Axis Controls Energy Expenditure and Insulin Action in Mice. *Cell Metabolism* **17**, 790–797 (2013).
114. BonDurant, L. D. *et al.* FGF21 Regulates Metabolism Through Adipose-Dependent and -Independent Mechanisms. *Cell Metabolism* **25**, 935–944.e4 (2017).
115. Véniant, M. M. *et al.* FGF21 Promotes Metabolic Homeostasis via White Adipose and Leptin in Mice. *PLoS ONE* **7**, e40164 (2012).
116. Adams, A. C., Cheng, C. C., Coskun, T., & Kharitonov, A. (2012). FGF21 requires  $\beta$ klotho to act in vivo. *PloS one*, 7(11), e49977.
117. Adams, A. C. *et al.* The breadth of FGF21's metabolic actions are governed by FGFR1 in adipose tissue. *Molecular Metabolism* **2**, 31–37 (2013).
118. Dutchak, P. A. *et al.* Fibroblast Growth Factor-21 Regulates PPAR $\gamma$  Activity and the Antidiabetic Actions of Thiazolidinediones. *Cell* **148**, 556–567 (2012).
119. Arner, P. *et al.* FGF21 attenuates lipolysis in human adipocytes - A possible link to improved insulin sensitivity. *FEBS Letters* **582**, 1725–1730 (2008).
120. Li, K. *et al.* The effects of fibroblast growth factor-21 knockdown and over-expression on its signaling pathway and glucose–lipid metabolism in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology* **348**, 21–26 (2012).
121. Li, X. *et al.* Inhibition of lipolysis may contribute to the acute regulation of plasma FFA and glucose by FGF21 in *ob / ob* mice. *FEBS Letters* **583**, 3230–3234 (2009).
122. Badman, M. K., Koester, A., Flier, J. S., Kharitonov, A. & Maratos-Flier, E. Fibroblast Growth Factor 21-Deficient Mice Demonstrate Impaired Adaptation to Ketosis. *Endocrinology* **150**, 4931–4940 (2009).
123. Hotta, Y. *et al.* Fibroblast Growth Factor 21 Regulates Lipolysis in White Adipose Tissue But Is Not Required for Ketogenesis and Triglyceride Clearance in Liver. *Endocrinology* **150**, 4625–4633 (2009).
124. Owen, B. M. *et al.* FGF21 Acts Centrally to Induce Sympathetic Nerve Activity, Energy Expenditure, and Weight Loss. *Cell Metabolism* **20**, 670–677 (2014).
125. Douris, N. *et al.* Central Fibroblast Growth Factor 21 Browns White Fat via Sympathetic Action in Male Mice. *Endocrinology* **156**, 2470–2481 (2015).

- 126.Véniant, M. M. *et al.* Pharmacologic Effects of FGF21 Are Independent of the “Browning” of White Adipose Tissue. *Cell Metabolism* **21**, 731–738 (2015).
- 127.Samms, R. J. *et al.* Discrete Aspects of FGF21 In Vivo Pharmacology Do Not Require UCP1. *Cell Reports* **11**, 991–999 (2015).
- 128.Camporez, J. P. G. *et al.* Hepatic insulin resistance and increased hepatic glucose production in mice lacking Fgf21. *Journal of Endocrinology* **226**, 207–217 (2015).
- 129.Camporez, J. P. G. *et al.* Cellular Mechanisms by Which FGF21 Improves Insulin Sensitivity in Male Mice. *Endocrinology* **154**, 3099–3109 (2013).
- 130.Xu, J. *et al.* Fibroblast Growth Factor 21 Reverses Hepatic Steatosis, Increases Energy Expenditure, and Improves Insulin Sensitivity in Diet-Induced Obese Mice. *Diabetes* **58**, 250–259 (2009).
- 131.Berglund, E. D. *et al.* Fibroblast Growth Factor 21 Controls Glycemia via Regulation of Hepatic Glucose Flux and Insulin Sensitivity. *Endocrinology* **150**, 4084–4093 (2009).
- 132.Bernardo, B. *et al.* FGF21 does not require interscapular brown adipose tissue and improves liver metabolic profile in animal models of obesity and insulin-resistance. *Sci Rep* **5**, 11382 (2015).
- 133.Muise, E. *et al.* Adipose fibroblast growth factor 21 is up-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and altered metabolic states. *Mol Pharmacol* **74(2)**, 403–412 (2008).
- 134.Emanuelli, B. *et al.* Interplay between FGF21 and insulin action in the liver regulates metabolism. *J. Clin. Invest.* **124**, 515–527 (2014).
- 135.Kurosu, H. *et al.* Tissue-specific Expression of  $\beta$ Klotho and Fibroblast Growth Factor (FGF) Receptor Isoforms Determines Metabolic Activity of FGF19 and FGF21. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 26687–26695 (2007).
- 136.Zhang, J. *et al.* Chronic Over-expression of Fibroblast Growth Factor 21 Increases Bile Acid Biosynthesis by Opposing FGF15/19 Action. *EBioMedicine* **15**, 173–183 (2017).
- 137.Bookout, A. L. *et al.* FGF21 regulates metabolism and circadian behavior by acting on the nervous system. *Nat Med* **19**, 1147–1152 (2013).
- 138.Liang, Q. *et al.* FGF21 Maintains Glucose Homeostasis by Mediating the Cross Talk Between Liver and Brain During Prolonged Fasting. *Diabetes* **63**, 4064–4075 (2014).
- 139.Singhal, G. *et al.* Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) Protects against High Fat Diet Induced Inflammation and Islet Hyperplasia in Pancreas. *PLoS ONE* **11**, e0148252 (2016).
- 140.So, W. Y. *et al.* High Glucose Represses  $\beta$ -Klotho Expression and Impairs Fibroblast Growth Factor 21 Action in Mouse Pancreatic Islets. *Diabetes* **62**, 3751–3759 (2013).
- 141.Coate, K. C. *et al.* FGF21 Is an Exocrine Pancreas Secretagogue. *Cell Metabolism* **25**, 472–480 (2017).
- 142.Wente, W. *et al.* Fibroblast Growth Factor-21 Improves Pancreatic  $\beta$ -Cell Function and Survival by Activation of Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Akt Signaling Pathways. *Diabetes* **55**, 2470–2478 (2006).
- 143.Xu, J. *et al.* Acute glucose-lowering and insulin-sensitizing action of FGF21 in insulin-resistant mouse models—association with liver and adipose tissue effects. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **297**, E1105–E1114 (2009).
- 144.Gaich, G. *et al.* The Effects of LY2405319, an FGF21 Analog, in Obese Human Subjects with Type 2 Diabetes. *Cell Metabolism* **18**, 333–340 (2013).
- 145.Talukdar, S. *et al.* A Long-Acting FGF21 Molecule, PF-05231023, Decreases Body Weight and Improves Lipid Profile in Non-human Primates and Type 2 Diabetic Subjects. *Cell Metabolism* **23**, 427–440 (2016).

146. Kim, A. M. *et al.* Once-weekly administration of a long-acting fibroblast growth factor 21 analogue modulates lipids, bone turnover markers, blood pressure and body weight differently in obese people with hypertriglyceridaemia and in non-human primates. *Diabetes Obes Metab* **19**, 1762–1772 (2017).
147. Maeda, N. *et al.* PPAR $\gamma$  Ligands Increase Expression and Plasma Concentrations of Adiponectin, an Adipose-Derived Protein. **50**, 6 (2001).
148. Wolf, A. M., Wolf, D., Rumpold, H., Enrich, B. & Tilg, H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **323**, 630–635 (2004).
149. Mandal, P., Pratt, B. T., Barnes, M., McMullen, M. R. & Nagy, L. E. Molecular Mechanism for Adiponectin-dependent M2 Macrophage Polarization. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 13460–13469 (2011).
150. Yamauchi, T. *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* **7**, 941–946 (2001).
151. Tan, B. K. *et al.* Fibroblast Growth Factor 21 (FGF21) in Human Cerebrospinal Fluid: Relationship With Plasma FGF21 and Body Adiposity. *Diabetes* **60**, 2758–2762 (2011).
152. Lin, Z. *et al.* Fibroblast Growth Factor 21 Prevents Atherosclerosis by Suppression of Hepatic Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 and Induction of Adiponectin in Mice. *Circulation* **131**, 1861–1871 (2015).
153. Minard, A. Y. *et al.* mTORC1 Is a Major Regulatory Node in the FGF21 Signaling Network in Adipocytes. *Cell Reports* **17**, 29–36 (2016).
154. Li, G. *et al.* FGF21 deficiency is associated with childhood obesity, insulin resistance and hypoadiponectinaemia: The BCAMS Study. *Diabetes & Metabolism* **43**, 253–260 (2017).
155. Olefsky, J. M. & Glass, C. K. Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 219–246 (2010).
156. Kotas, M. E. & Medzhitov, R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell* **160**, 816–827 (2015).
157. Murray, P. J. Macrophage Polarization. *Annu. Rev. Physiol.* **79**, 541–566 (2017).
158. Wang, P., Mariman, E., Renes, J. & Keijer, J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J. Cell. Physiol.* **216**, 3–13 (2008).
159. Halberg, N., Wernstedt-Asterholm, I. & Scherer, P. E. The Adipocyte as an Endocrine Cell. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* **37**, 753–768 (2008).
160. Weisberg, S. P. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation* **112(12)**, 1789–1808 (2003).
161. Xu, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* **112(12)**, 1821–1830 (2003).
162. Weisberg, S. P. *et al.* CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest.* **116**, 115–124 (2006).
163. Schenk, S., Saberi, M. & Olefsky, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J. Clin. Invest.* **118**, 2992–3002 (2008).
164. Rocha, V. Z. *et al.* Interferon- $\gamma$ , a Th1 Cytokine, Regulates Fat Inflammation: A Role for Adaptive Immunity in Obesity. *Circulation Research* **103**, 467–476 (2008).
165. Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. & Saltiel, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* **117**, 175–184 (2007).
166. Nguyen, M. T. A. *et al.* 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. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 35279–35292 (2007).

167. Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* **32**, 593–604 (2010).
168. Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C. K., Rose, D. W. & Rosenfeld, M. G. A Corepressor/Coactivator Exchange Complex Required for Transcriptional Activation by Nuclear Receptors and Other Regulated Transcription Factors. *Cell* **116**, 511–526 (2004).
169. Ogawa, S. *et al.* A nuclear receptor corepressor transcriptional checkpoint controlling activator protein 1-dependent gene networks required for macrophage activation. *6*.
170. Hoffmann, A. The I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B signaling module: temporal control and selective gene activation. *science* **298(5596)**, 1241–1245 (2002).
171. Huang, J. T. Interleukin-4-dependent production of PPAR- $\gamma$  ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* **400(6742)**, 378–382 (1999).
172. Odegaard, J. I. Macrophage-specific PPAR $\gamma$  controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* **447(7148)**, 1116–1120 (2007).
173. Odegaard, J. I. Alternative M2 activation of Kupffer cells by PPAR $\delta$  ameliorates obesity-induced insulin resistance. *Cell Metabolism* **7(6)**, 496–507 (2008).
174. Vats, D. Oxidative metabolism and PGC-1 $\beta$  attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metabolism* **4(1)**, 13–24 (2006).
175. Hevener, A. L. Macrophage PPAR $\gamma$  is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones. *The Journal of clinical investigation* **117(6)**, 1658–1669 (2007).
176. Wang, N. *et al.* Improving hyperglycemic effect of FGF-21 is associated with alleviating inflammatory state in diabetes. *International Immunopharmacology* **56**, 301–309 (2018).
177. Bao, L. *et al.* A long-acting FGF21 alleviates hepatic steatosis and inflammation in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis partly through an FGF21-adiponectin-IL17A pathway: PsTag600-FGF21 alleviates hepatic steatohepatitis. *British Journal of Pharmacology* **175**, 3379–3393 (2018).
178. Feingold, K. R. *et al.* FGF21 Is Increased by Inflammatory Stimuli and Protects Leptin-Deficient ob/ob Mice from the Toxicity of Sepsis. *Endocrinology* **153**, 2689–2700 (2012).
179. Li, J. *et al.* FGF-21 Elevated IL-10 Production to Correct LPS-Induced Inflammation. *Inflammation* **41**, 751–759 (2018).
180. Yu, Y. *et al.* Fibroblast growth factor 21 (FGF21) inhibits macrophage-mediated inflammation by activating Nrf2 and suppressing the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *International Immunopharmacology* **38**, 144–152 (2016).
181. Zheng, Q. *et al.* Lack of FGF21 promotes NASH-HCC transition *via* hepatocyte-TLR4-IL-17A signaling. *Theranostics* **10**, 9923–9936 (2020).
182. Choubey, L., Collette, J. C., & Smith, K. M. (2016). Quantitative assessment of Fgfr1 expression in neurons and glia. *PeerJ Preprints*, *4*, e2343v1.
183. Fon Tacer, K. *et al.* Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Molecular Endocrinology* **24**, 2050–2064 (2010).
184. He, J.-L. *et al.* FGF21 ameliorates the neurocontrol of blood pressure in the high fructose-drinking rats. *Sci Rep* **6**, 29582 (2016).
185. Benomar, Y. *et al.* Central Resistin/TLR4 Impairs Adiponectin Signaling, Contributing to Insulin and FGF21 Resistance. *Diabetes* **65**, 913–926 (2016).
186. Kuroda, M. *et al.* Peripherally derived FGF21 promotes remyelination in the central nervous system. *Journal of Clinical Investigation* **127**, 3496–3509 (2017).
187. Jensen-Cody, S. O. *et al.* FGF21 Signals to Glutamatergic Neurons in the Ventromedial Hypothalamus to Suppress Carbohydrate Intake. *Cell Metabolism* **32**, 273–286.e6 (2020).

188. Flippo, K. H., Jensen-Cody, S. O., Claflin, K. E. & Potthoff, M. J. FGF21 signaling in glutamatergic neurons is required for weight loss associated with dietary protein dilution. *Sci Rep* **10**, 19521 (2020).
189. Amiri, M., Braidy, N. & Aminzadeh, M. Protective Effects of Fibroblast Growth Factor 21 Against Amyloid-Beta1–42-Induced Toxicity in SH-SY5Y Cells. *Neurotox Res* **34**, 574–583 (2018).
190. Geller, S. *et al.* Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metabolism* **30**, 833–844.e7 (2019).
191. Mutsnaini, L. *et al.* Fibroblast growth factor 21 deficiency aggravates obesity-induced hypothalamic inflammation and impairs thermogenic response. *Inflamm. Res.* **68**, 351–358 (2019).
192. Shahrour, R. A. *et al.* Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Fibroblast Growth Factor 21 Facilitates Cognitive Recovery and Enhances Neurogenesis in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* **37**, 14–26 (2020).
193. Fang, X. *et al.* FGF21 Protects Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease Models Via Repression of Neuroinflammation. *Neurotox Res* **37**, 616–627 (2020).
194. Hsuchou, H., Pan, W. & Kastin, A. J. The fasting polypeptide FGF21 can enter brain from blood. *Peptides* **28**, 2382–2386 (2007).
195. Liu, Y. *et al.* Negative correlation between cerebrospinal fluid FGF21 levels and BDI scores in male Chinese subjects. *Psychiatry Research* **252**, 111–113 (2017).
196. Haddad-Tóvolli, R., Dragano, N. R. V., Ramalho, A. F. S. & Velloso, L. A. Development and Function of the Blood-Brain Barrier in the Context of Metabolic Control. *Front. Neurosci.* **11**, 224 (2017).
197. Stamatovic, S. M., Johnson, A. M., Keep, R. F. & Andjelkovic, A. V. Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers* **4**, e1154641 (2016).
198. Liu, W.-Y., Wang, Z.-B., Zhang, L.-C., Wei, X. & Li, L. Tight Junction in Blood-Brain Barrier: An Overview of Structure, Regulation, and Regulator Substances: Tight Junction in Blood-Brain Barrier. *CNS Neurosci Ther* **18**, 609–615 (2012).
199. Hawkins, B. T., Lundeen, T. F., Norwood, K. M., Brooks, H. L. & Egleton, R. D. Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases. *Diabetologia* **50**, 202–211 (2006).
200. Pooja Naik, L. C. Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview. *J Pharmacovigilance* **02**, (2014).
201. Wang, X.-M. *et al.* FGF21 represses cerebrovascular aging via improving mitochondrial biogenesis and inhibiting p53 signaling pathway in an AMPK-dependent manner. *Experimental Cell Research* **346**, 147–156 (2016).
202. Yu, Z. *et al.* Recombinant FGF21 Protects Against Blood-Brain Barrier Leakage Through Nrf2 Upregulation in Type 2 Diabetes Mice. *Mol Neurobiol* **56**, 2314–2327 (2019).
203. Jiang, Y. *et al.* FGF21 Protects against Aggravated Blood-Brain Barrier Disruption after Ischemic Focal Stroke in Diabetic db/db Male Mice via Cerebrovascular PPAR $\gamma$  Activation. *IJMS* **21**, 824 (2020).
204. Chen, J. *et al.* FGF21 Protects the Blood-Brain Barrier by Upregulating PPAR $\gamma$  via FGFR1/ $\beta$ -klotho after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma* **35**, 2091–2103 (2018).

205. Migdal, C. & Serres, M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Med Sci (Paris)* **27**, 405–412 (2011).
206. Mäkelä, J. *et al.* Fibroblast growth factor-21 enhances mitochondrial functions and increases the activity of PGC-1 $\alpha$  in human dopaminergic neurons via Sirtuin-. 12 (2014).
207. Yu, Y. *et al.* Fibroblast growth factor 21 protects mouse brain against d-galactose induced aging via suppression of oxidative stress response and advanced glycation end products formation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **133**, 122–131 (2015).
208. Kang, K. *et al.* FGF21 attenuates neurodegeneration through modulating neuroinflammation and oxidant-stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **129**, 110439 (2020).
209. Chen, S. *et al.* Fibroblast growth factor 21 ameliorates neurodegeneration in rat and cellular models of Alzheimer's disease. *Redox Biology* **22**, 101133 (2019).
210. Sa-nguanmoo, P. *et al.* FGF21 improves cognition by restored synaptic plasticity, dendritic spine density, brain mitochondrial function and cell apoptosis in obese-insulin resistant male rats. *Hormones and Behavior* **85**, 86–95 (2016).
211. Ye, L. *et al.* FGF21 promotes functional recovery after hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats by activating the PI3K/Akt signaling pathway via FGFR1/ $\beta$ -klotho. *Experimental Neurology* **317**, 34–50 (2019).
212. Wang, Q. *et al.* FGF21 Attenuates High-Fat Diet-Induced Cognitive Impairment via Metabolic Regulation and Anti-inflammation of Obese Mice. *Mol Neurobiol* **55**, 4702–4717 (2018).
213. Wang, X. *et al.* FGF21 Attenuated LPS-Induced Depressive-Like Behavior via Inhibiting the Inflammatory Pathway. *Front. Pharmacol.* **11**, 154 (2020).
214. Rühlmann, C. *et al.* Long-term caloric restriction in ApoE-deficient mice results in neuroprotection via Fgf21-induced AMPK/mTOR pathway. *Aging* **8**, 2777–2789 (2016).
215. Wang, D. *et al.* FGF21 alleviates neuroinflammation following ischemic stroke by modulating the temporal and spatial dynamics of microglia/macrophages. *J Neuroinflammation* **17**, 257 (2020).
216. Shahrer, R. A., Ali, A. A. A., Wu, C.-C., Chiang, Y.-H. & Chen, K.-Y. Enhanced Homing of Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Fibroblast Growth Factor 21 to Injury Site in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *IJMS* **20**, 2624 (2019).
217. Lan, T. *et al.* FGF19, FGF21, and an FGFR1/ $\beta$ -Klotho-Activating Antibody Act on the Nervous System to Regulate Body Weight and Glycemia. *Cell Metabolism* **26**, 709–718.e3 (2017).
218. Sarruf, D. A. *et al.* Fibroblast Growth Factor 21 Action in the Brain Increases Energy Expenditure and Insulin Sensitivity in Obese Rats. *Diabetes* **59**, 1817–1824 (2010).
219. Forney, L. A. *et al.* Dietary Methionine Restriction Signals to the Brain Through Fibroblast Growth Factor 21 to Regulate Energy Balance and Remodeling of Adipose Tissue. *Obesity* **28**, 1912–1921 (2020).
220. Carrière, A., Jeanson, Y., Cousin, B., Arnaud, E. & Casteilla, L. Le recrutement et l'activation d'adipocytes bruns et/ou BRITE: Une perspective réelle pour le traitement des maladies métaboliques? *Med Sci (Paris)* **29**, 729–735 (2013).
221. Hill, C. M. *et al.* FGF21 Signals Protein Status to the Brain and Adaptively Regulates Food Choice and Metabolism. *Cell Reports* **27**, 2934–2947.e3 (2019).
222. Morrison, C. D. & Laeger, T. Protein-dependent regulation of feeding and metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **26**, 256–262 (2015).
223. Blais, A. *et al.* Low-protein diet-induced hyperphagia and adiposity are modulated through interactions involving thermoregulation, motor activity, and protein quality in mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* **314**, E139–E151 (2018).

- 224.von Holstein-Rathlou, S. *et al.* FGF21 Mediates Endocrine Control of Simple Sugar Intake and Sweet Taste Preference by the Liver. *Cell Metabolism* **23**, 335–343 (2016).
- 225.Matsui, S. *et al.* Neuronal SIRT1 regulates macronutrient-based diet selection through FGF21 and oxytocin signalling in mice. *Nat Commun* **9**, 4604 (2018).
- 226.Santoso, P. *et al.* Fibroblast growth factor 21, assisted by elevated glucose, activates paraventricular nucleus NUCB2/Nesfatin-1 neurons to produce satiety under fed states. *Sci Rep* **7**, 45819 (2017).
- 227.Ishida, N. Role of PPAR $\alpha$  in the Control of Torpor through FGF21-NPY pathway from circadian clock to seasonal change in mammals.pdf. *PPAR research* **2009**, (2009).
- 228.Owen, B. M. *et al.* FGF21 contributes to neuroendocrine control of female reproduction. *Nat Med* **19**, 1153–1156 (2013).
- 229.Xu, C. *et al.* *KLB*, encoding  $\beta$ -Klotho, is mutated in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *EMBO Mol Med* **9**, 1379–1397 (2017).
- 230.Yilmaz, U., Tekin, S., Demir, M., Cigremis, Y. & Sandal, S. Effects of central FGF21 infusion on the hypothalamus–pituitary–thyroid axis and energy metabolism in rats. *J Physiol Sci* **68**, 781–788 (2018).
- 231.Lee, Y. S. *et al.* Inflammation Is Necessary for Long-Term but Not Short-Term High-Fat Diet-Induced Insulin Resistance. *Diabetes* **60**, 2474–2483 (2011).
- 232.Grandl, G. *et al.* Short-term feeding of a ketogenic diet induces more severe hepatic insulin resistance than an obesogenic high-fat diet: A short-term ketogenic diet induces hepatic insulin resistance. *J Physiol* **596**, 4597–4609 (2018).
- 233.Fernández-Arjona, M. del M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P. & López-Ávalos, M. D. Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front. Cell. Neurosci.* **11**, 235 (2017).



## ANNEXES

- **Etude 1 - publiée** : La résistine maternelle prédispose la descendance à l'inflammation hypothalamique et à la prise de poids.

Poizat, G., Alexandre, C., Al Rifai, S., Riffault, L., Crepin, D., Benomar, Y., & Taouis, M. (2019). Maternal resistin predisposes offspring to hypothalamic inflammation and body weight gain. *Plos one*, 14(3), e0213267.

- **Etude 2 – en cours de préparation/soumission** : La consommation de HFD à court et à long terme augmente l'expression de l'ARNm de la résistine dans les tanocytes hypothalamiques et les neurones POMC : Nouveau mécanisme de régulation reliant l'inflammation hypothalamique à la résistance à l'insuline.

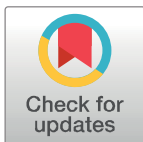
## RESEARCH ARTICLE

# 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<sup>ID</sup>\*

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 20 $\mu$ g/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 20 $\mu$ g/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

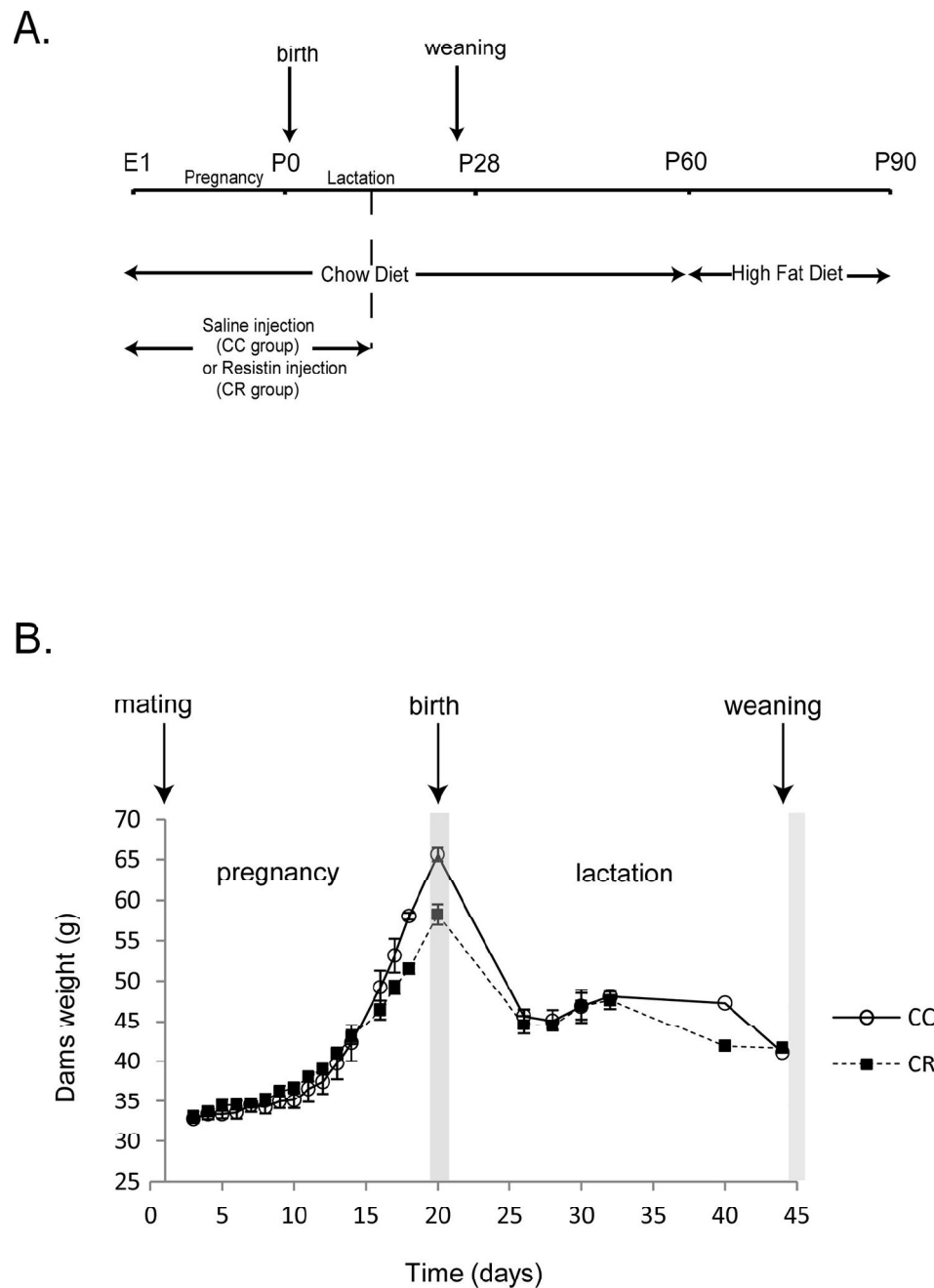
Mice were rapidly decapitated and then blood was collected immediately in tubes containing 12U/mL of heparin, plasma was prepared after blood centrifugation at 2000 g at 4°C during 15 minutes and then stored at -20°C until assayed for ELISA experiments. Brain was extracted and the hypothalamus was immediately 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 (EZRM1-13K) 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  $\mu$ g/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  $\pm$  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' CTGGGAGGCACATCTTCTGG3', antisense: 5' TGCCGTTTCTTGTTCCTCCTCTGCT3'), 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' GAAAGGGGAGTGTGAG A3', antisense: 5' TGGCTCATGGCTCCTCA G3'), CD68 (sense: 5' GGGGCTCTTGGGAACCTACA3', antisense: 5' GAGAGAGACAGGTGGGGATG3'), ICAM1 (sense: 5' GACACCCCTGACCTCC TG3', antisense: 5' CTGCTGGTTTGTGCTCTCCTG3'), IR (sense: 5' GCCGCTCCTATGCT CTGGTATC3', antisense: 5' GAGTGATGGTGAGTTGTGTTTGC3'), PTP1B (sense: 5' CTCTTCTCCAGCCACCAGT3', antisense: 5' CCACCATCCGTCTCCTAACT3'), SOCS3 (sense: 5' CCAGCTCCAGCTTCTTTCAAGTG3', 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/endocrine 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.

## 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).

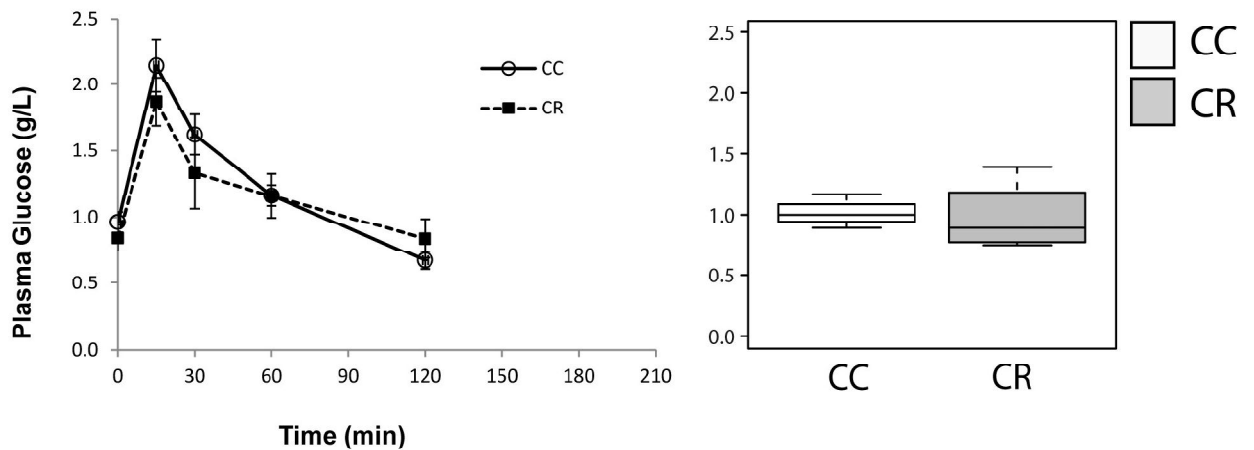
Moreover, the plasma levels of pro-inflammatory markers IL6 and TNF $\alpha$  were measured in dams and offspring. In dams plasma levels of IL6 (15.96 ± 5.95 pg/mL vs 18.91 ± 16 pg/mL for CC and CR, respectively) and TNF $\alpha$  (11.49 ± 3.25 pg/mL vs 11.81 ± 5.35 pg/mL for CC and CR, respectively) 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

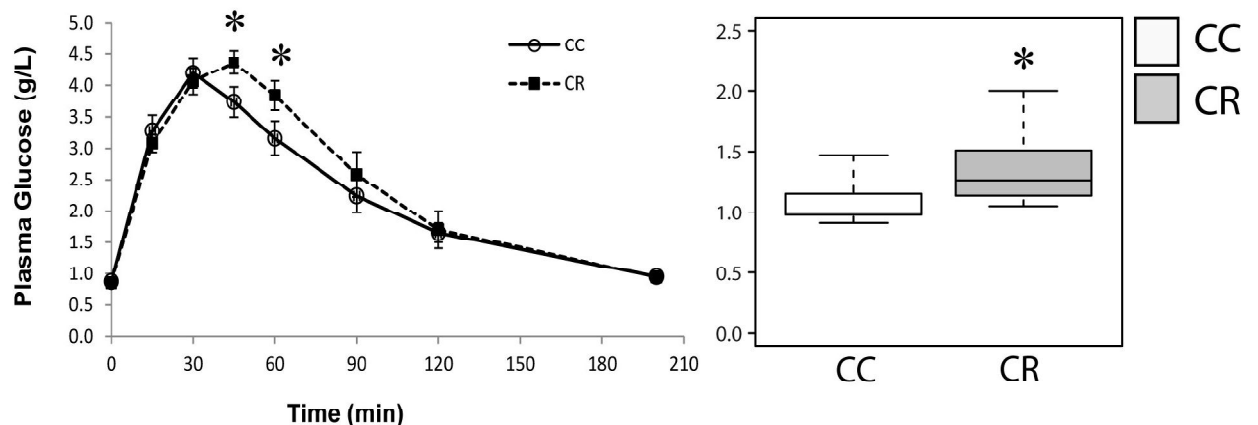
To determine the long-term effect of maternal resistin treatment on glucose tolerance of offspring, we have performed glucose tolerance test (GTT) at p28 and p90 in both CC and CR groups. At p28, GTT was similar in CC and CR groups and in both groups glycemia returned to basal levels within 120 min after 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 on 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

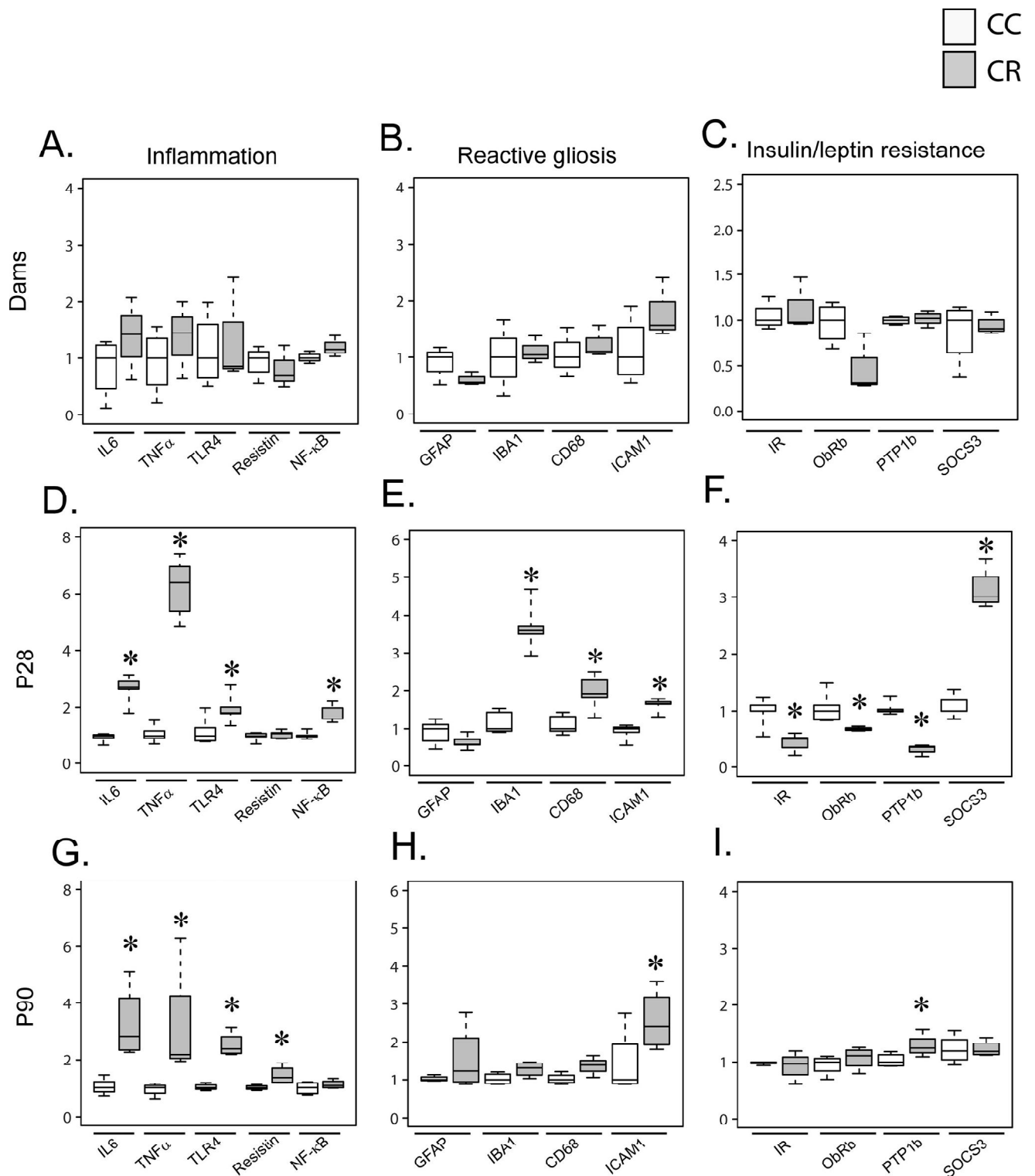
To determine whether maternal resistin has also impacted peripheral tissues we measured the expression of proinflammatory markers in adipose tissue, liver and muscle.

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



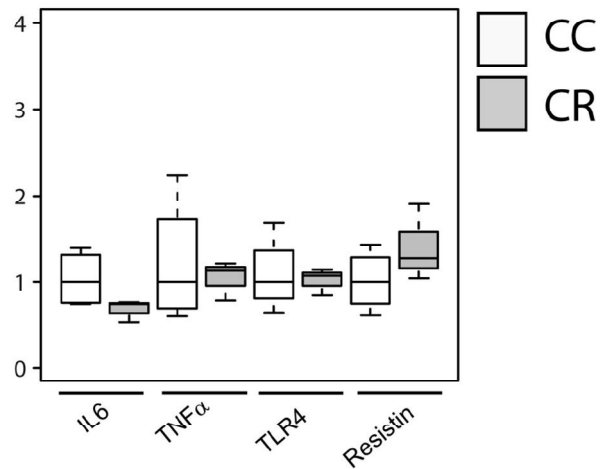
**Fig 3. Maternal resistin increases offspring hypothalamic inflammation and reactive gliosis markers.** Total mRNA prepared from the hypothalamus of dams and offspring (p28 and p90) were used to determine gene expression of different markers using RT-qPCR. Gene expression was normalized to GAPDH and 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.

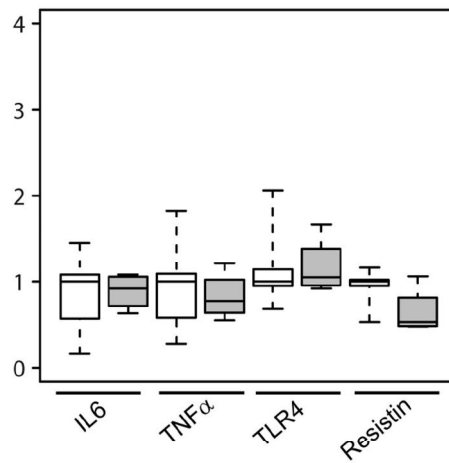
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213267.g003>

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

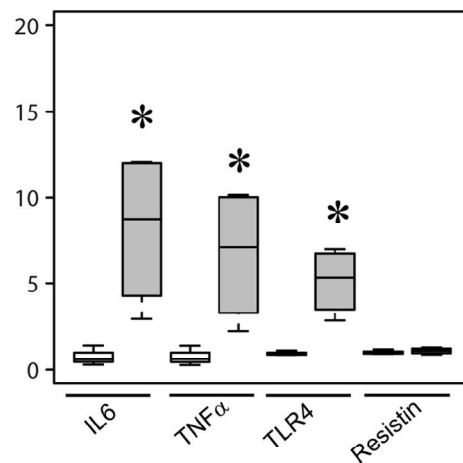
### A. Dams



### B. P28



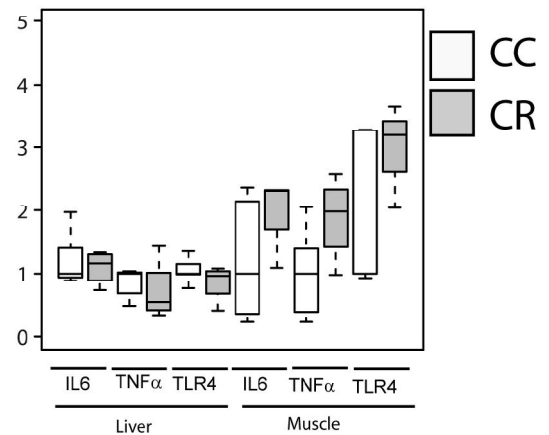
### C. P90



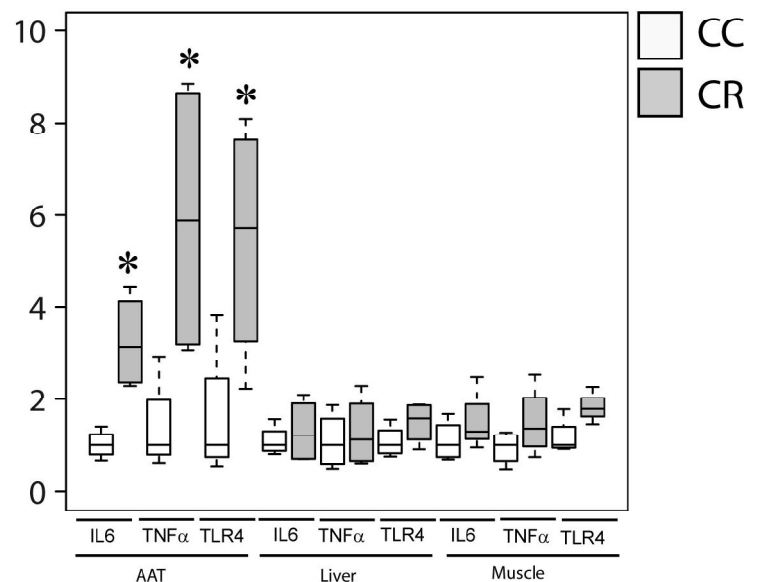
**Fig 4. Maternal resistin increases cortical inflammation markers of offspring at p90.** Total mRNA prepared from the cortex of dams and offspring (p28 and p90) were used to determine gene expression of different markers using RT-qPCR. Gene expression was normalized to GAPDH, 18S and Actin. Cortex inflammatory 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 & Kanneganti 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, Schwartzer 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. 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, 307–12. <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, Audikovszky 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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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. Hendlar 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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29077836/)