



HAL
open science

L'aggrecan : un modulateur pour la détection des hormones périphériques par les neurones de l'hypothalamus

Laura Kuczynski-Noyau

► **To cite this version:**

Laura Kuczynski-Noyau. L'aggrecan : un modulateur pour la détection des hormones périphériques par les neurones de l'hypothalamus. Neurosciences. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS051 . tel-04873611

HAL Id: tel-04873611

<https://theses.hal.science/tel-04873611v1>

Submitted on 8 Jan 2025

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

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

Université de Lille

Ecole doctorale Biologie-Santé (ED446)

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Spécialité : Neurosciences

Présentée par

Laura KUCZYNSKI-NOYAU

L'aggreccan : un modulateur pour la détection des hormones périphériques par les neurones de l'hypothalamus

Soutenue le 02 Décembre 2022 devant le jury composé de :

Dr. Clémence BLOUET
Dr. Romain VIVES
Dr. Julie DAM
Pr. Sylvie RICARD-BLUM
Dr. Vincent PREVOT
Dr. Virginie MATTOT

Rapportrice
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Président du jury
Directrice de thèse

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé sous la direction du Docteur Virginie Mattot au sein de l'unité de recherche UMRS1172 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche (INSERM), au Centre de Recherche Lille Neurosciences et Cognition, dans l'équipe Développement et plasticité du cerveau neuroendocrine dirigée par le Docteur Vincent Prévot.

Remerciements

Je tiens à adresser tous mes remerciements...

A mesdames le docteur Julie Dam, madame le professeur Sylvie Ricard-Blum et monsieur Vincent Prévot pour votre présence en tant qu'examineur, et surtout madame le docteur Clémence Blouet et monsieur le docteur Romain Vivès d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Je vous remercie pour le temps que vous avez consacré à sa critique et son évaluation.

A ma directrice de thèse, Virginie Mattot. Je te remercie pour la qualité de ton encadrement, et j'ai été heureuse de travailler avec une personne aussi dynamique sur le plan scientifique. Merci de m'avoir donné l'opportunité de présenter lors de congrès internationaux et de m'avoir toujours poussée à me dépasser. Merci enfin pour ton soutien durant ces trois années de thèses qui ont été riches d'expériences (dans tous les sens du terme).

A l'ensemble des personnes ayant pris part à l'élaboration de mon article. Merci à tous pour le temps que vous y avez consacré, que ce soit pour des expériences, des analyses, des idées, des corrections... merci de nous avoir aidé à faire avancer ce projet.

Aux plateformes microscopie et histologie de Bichel. Merci à Solène Audry, Marie-Hélène Gevaert et Brenda Lammens de la plateforme histologie, et plus particulièrement à Antonino, Meryem et Sara de la plateforme microscopie.

A l'ensemble des membres du secrétariat, Céline Brand, Sophie Lesage, Nathalie Perrais et Marion Desmet-Creton, pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Au personnel de soutien à la recherche : Karim, Laïfa et Thomas, pour votre aide au quotidien, et pour toutes les discussions que nous avons pu avoir au cours de ces quelques années.

Au personnel animalier DHURE et EOPS.

A l'université de Lille pour avoir financé ces trois années de recherche.

Je voudrais également adresser mes plus sincères remerciements...

A l'ensemble des personnes du laboratoire, pour vos conseils, votre disponibilité et votre gentillesse. Je vous souhaite à chacun d'entre vous d'avoir un futur aussi épanoui que possible.

A Florent, Gaëtan, l'ensemble de la Crypte (Ophélie, Fatima, Amandine, Gaspard, Pierre-Yves), Leti, Laurine, Ludovica, Alicia, Adrian, Amine, Julie, Nabil... pour votre soutien sans faille, les discussions et les bons moments passés ensemble. La thèse s'arrête ici pour moi mais j'espère que nous aurons l'occasion de nous retrouver de nouveau ! Petite dédicace à Adrian : je te souhaite toute la réussite possible pour ta soutenance à venir !!

A Tori. Merci à toi tout particulièrement, sans qui la thèse n'aurait définitivement pas été la même. J'ai été très heureuse de pouvoir passer ces 3 années au labo à tes côtés. Tu

m'as toujours énormément aidée et soutenue tout au long de la thèse alors merci pour tout. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite !

Enfin, je tiens à remercier du fond du cœur...

L'ensemble de mes amis. Vous êtes, pour la plupart, loin géographiquement, ce qui ne vous a pas empêché de suivre de plus ou moins près mes mésaventures. En particulier, je tiens à remercier Thomas, Romain & Many, Micka, Mathilde, Julie, Gabriel, Clément, Yann & Mélanie, Yohann, Lilian et toute l'équipe de la campagne de jdr : Gaël, Arnaud et Elie. A tour de rôle, vous avez su me soutenir, me changer les idées, me faire rire... aux moments où j'en avais le plus besoin. Alors merci encore à vous tous.

Ma famille, qui a toujours cru en moi quoi que je fasse et qui m'a toujours accompagnée par la pensée malgré la distance. En particulier, merci à ma petite sœur Mélodie, avec qui j'ai beaucoup échangé ces derniers mois et qui m'a aidée à rester motivée, surtout vers la fin !

Gaëtan. Merci pour ton sourire et ta bonne humeur quotidienne qui m'ont aidée à tenir le coup dans les périodes creuses. Merci pour ton soutien pendant ces 3 ans et pour tout ce que tu m'as apporté. Merci tout simplement d'être à mes côtés.

Résumé

L'aggrecan : un modulateur pour la détection des hormones périphériques par les neurones de l'hypothalamus

La prise alimentaire est régulée au niveau central par l'activation ou la désactivation des neurones NPY/AgRP orexigènes situés dans le noyau arqué de l'hypothalamus (ARH), un centre majeur de la régulation du métabolisme. L'implication des neurones NPY dans le contrôle de la prise alimentaire dépend largement de leur capacité à détecter les hormones métaboliques circulantes, telles que la ghréline et la leptine, qui sont libérées dans la circulation par les organes périphériques. Les neurones NPY sont situés à la frontière entre l'ARH et l'éminence médiane (EM), un organe circumventriculaire qui facilite l'entrée des molécules périphériques circulantes à côté de l'ARH via un réseau dense de capillaires fenêtrés. Cependant, les molécules circulantes qui atteignent l'EM se heurtent à une barrière de diffusion, située exactement à la frontière entre l'EM et l'ARH et dont les propriétés et la nature sont inconnues. Les neurones à NPY sont encastrés dans une matrice extracellulaire spécifique du cerveau appelée réseau péri-neuronal (PNN). Ce réseau dense et complexe de protéines extracellulaires pourrait expliquer la barrière de diffusion qui empêche le libre accès des molécules circulantes aux neurones à NPY. L'objectif de cette étude était de déterminer le rôle joué par le PNN entourant les neurones à NPY dans la restriction de la diffusion des molécules circulantes vers l'ARH et d'évaluer son impact sur la réponse neuronale aux hormones métaboliques véhiculées par le sang.

Mots-clés : aggrecan ; réseau peri-neuronal ; neurones NPY ; noyau arqué ; prise alimentaire ; éminence médiane.

Abstract

Agrecan : a modulator of peripheral hormone detection by hypothalamic neurons

Food intake is centrally regulated by the activation or deactivation of orexigenic NPY/AgRP neurons located in the arcuate nucleus of the hypothalamus (ARH), a major regulatory center of metabolism. The involvement of NPY neurons in the control of food intake depends largely on their ability to detect circulating metabolic hormones, such as ghrelin and leptin, which are released into the circulation by peripheral organs. NPY neurons are located at the border between the ARH and the median eminence (ME), a circumventricular organ that facilitates the entry of circulating peripheral molecules next to the ARH via a dense network of fenestrated capillaries. However, circulating molecules reaching the ME collide to a diffusion barrier, located exactly at the ME/ARH boundary and whose properties and nature are unknown. NPY neurons are embedded in a brain-specific extracellular matrix called peri-neuronal network (PNN). This dense and complex network of extracellular proteins could account for the diffusion barrier which prevents the free access of circulating molecules to NPY neurons. The goal of this study was to determine the role played by the extracellular matrix surrounding NPY neurons in the restriction of circulating molecule diffusion to the ARH and to evaluate its impact on the neuronal response to blood-borne metabolic hormones.

Key words : agrecan ; perineuronal net ; NPY neurons ; arcuate nucleus ; food intake ; median eminence.

Communications scientifiques

Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont abouti à plusieurs communications scientifiques :

- Communications affichées :
 - **Laura Kuczynski-Noyau**, Paolo Alberton, Inès Martinez-Corral, Florent Sauvé, Suneel Apte, Attila Aszodi, Julie Dam, Vincent Prévot and Virginie Mattot. *The extracellular matrix, a new player in the central response to blood-borne metabolic hormones*. The International Congress of Neuroendocrinology, 7 Août 2022, Glasgow, Ecosse.
 - **Laura Kuczynski-Noyau**, Sixtine Karmann, Paolo Alberton, Inès Martinez-Corral, Florent Sauvé, Tori Lhomme, Suneel Apte, Sébastien Bouret, Attila Aszodi, Julie Dam, Vincent Prévot and Virginie Mattot. *Aggrecan is a new key player of appetite regulation by controlling the central response to blood-borne metabolic hormones*. Gordon Research Conference on Proteoglycans, Andover, 7 Juillet 2022, Andover, Etats-Unis. **Prix poster**
 - **L. Kuczynski-Noyau**, I. Martinez-Corral, G. Ternier, S. Nampoothiri, S. Janel, F. Lafont, V. Prevot, V. Mattot. *Characterization of the biophysical properties of the frontier between the median eminence (ME) and the arcuate nucleus (ARH) by atomic force microscopy*. Congrès international NeuroFrance, 20 Mai 2021.
- Communications orales (flash talks) :
 - **L. Kuczynski-Noyau**, I. Martinez-Corral, S. Nampoothiri, V. Prévot and V. Mattot. *Properties, nature and function of the lateral frontier between the median eminence and the arcuate nucleus*. Journée Andre Verbert, 11th of October 2021, Lille, France.
 - **Laura Kuczynski-Noyau**, Sixtine Karmann, Paolo Alberton, Inès Martinez-Corral, Florent Sauvé, Tori Lhomme, Suneel S. Apte, Sébastien Bouret, Attila Aszodi, Julie Dam, Vincent Prévot and Virginie Mattot. *Aggrecan is a new key player of appetite regulation by controlling the central response to blood-borne metabolic hormones*. Gordon Research Conference on Proteoglycans, 7 Juillet 2022, Andover, Etats-Unis.
- Article scientifique :
 - **Laura Kuczynski-Noyau**, Sixtine Karmann, Paolo Alberton, Inès Martinez-Corral, Sreekala Nampoothiri, Florent Sauvé, Tori Lhomme, Suneel S. Apte, Sébastien Bouret, Attila Aszodi, Julie Dam, Vincent Prévot and Virginie Mattot. *Aggrecan-gated hypothalamic access of blood-borne metabolic hormones dynamically controls food intake. (en soumission)*

Table des matières

Remerciements	4
Résumé	6
Abstract	7
Communications scientifiques	8
Table des matières	9
Liste des abréviations	13
Liste des figures	15
Liste des tableaux	17
Introduction	18
1. Structures et molécules impliquées dans la prise alimentaire	18
1.1. Les grandes étapes de la régulation de la prise alimentaire.....	19
1.1.1. Régulation à court terme de la prise alimentaire	20
1.1.1.1. L'initiation de la prise alimentaire.....	21
1.1.1.2. L'étape de satiété de la prise alimentaire à court terme	22
1.1.2. Régulation à long terme de la prise alimentaire.....	23
1.2. Les régions du système nerveux central impliquées dans la perception des signaux régulateurs de la prise alimentaire	28
1.2.1. Le tronc cérébral : un centre intégrateur à part entière dans la régulation de la prise alimentaire.....	28
1.2.2. L'hypothalamus : un centre intégrateur majeur dans la régulation de la prise alimentaire.....	31
1.2.3. Le noyau arqué.....	33
2. Communication entre cerveau et périphérie	37
2.1. La barrière hémato-encéphalique	37
2.1.1. Structure de la barrière hémato-encéphalique.....	38
2.1.2. Rôles de la barrière hémato-encéphalique.....	39
2.2. Les organes circumventriculaires : une porte d'accès directe vers le SNC.....	40
2.2.1. Caractéristiques des organes circumventriculaires.....	40
2.2.2. L'area postrema	41
2.2.3. L'éminence médiane	42
2.3. Les barrières physiologiques permettant de contrôler l'accès des molécules circulantes au noyau arqué.....	43
2.3.1. La barrière à l'interface entre l'éminence médiane et le liquide céphalo- rachidien ..	44
2.3.2. La barrière à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué	45
2.3.2.1. Mise en évidence de la barrière entre l'éminence médiane et le noyau arqué....	45
2.3.2.2. Quelques propriétés de la barrière de diffusion à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué.....	46
2.3.2.3. Hypothèses suggérées sur le mécanisme moléculaire conduisant au blocage des molécules circulantes à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué .-	48
3. Le réseau peri-neuronal : une matrice extracellulaire particulière au cerveau . -	51
3.1. Structure et composition du réseau peri-neuronal	52

3.1.1.	L'acide hyaluronique.....	- 53 -
3.1.2.	Les protéines de liaison hyaluronane et protéoglycane	- 54 -
3.1.3.	Les protéoglycanes.....	- 54 -
3.1.3.1.	Les glycosaminoglycanes	- 54 -
3.1.3.2.	Le core protéique	- 55 -
3.2.	Quelques rôles connus pour le réseau peri-neuronal	- 56 -
3.2.1.	Le PNN et l'homéostasie ionique	- 56 -
3.2.2.	Le PNN et la période critique	- 57 -
3.2.3.	Le PNN : une barrière peri-neuronale.....	- 57 -
3.2.4.	Le réseau peri-neuronal à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué.....	- 57 -
3.3.	L'aggrecan : un protéoglycane de haut poids moléculaire aux multiples fonctions.....	- 58 -
3.3.1.	Généralités sur l'aggrecan.....	- 58 -
3.3.2.	Structure de l'aggrecan	- 59 -
3.3.3.	L'aggrecan et le cartilage.....	- 61 -
3.3.3.1.	Importance de l'aggrecan dans le cartilage	- 61 -
3.3.3.2.	Propriétés de l'aggrecan dans le cartilage	- 61 -
3.3.3.3.	Le clivage de l'aggrecan	- 62 -
3.3.3.4.	Implication de la ghréline et de la leptine dans le remodelage de l'aggrecan	- 63 -
3.3.4.	Importance de l'aggrecan dans le cerveau	- 64 -

Objectifs et stratégies de recherche..... - 66 -

Résultats..... - 67 -

Partie 1 : Propriétés et nature de la barrière de diffusion pour les molécules circulantes à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué..... - 67 -

1. Quelques propriétés de la barrière de diffusion localisée à l'interface entre l'éminence médiane et le noyau arqué..... - 67 -

2. Nature de la barrière de diffusion à l'interface de l'éminence médiane et du noyau arqué..... - 68 -

2.1.	Implication du réseau peri-neuronal dans le blocage des molécules à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué.....	- 69 -
2.2.	Composition du réseau peri-neuronal à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué	- 71 -
2.3.	Identification du rôle majeur de l'aggrecan dans la barrière latérale de diffusion.....	- 72 -
2.3.1.	Corrélation entre le dépôt de l'aggrecan et le blocage de la diffusion des molécules	- 72 -
2.3.2.	Impact de la réduction du dépôt de l'ACAN sur la diffusion de l'albumine	- 73 -
2.3.2.1.	Apport des modèles génétiques d'hypomorphisme et de recombinaison homologue	- 73 -
2.3.2.2.	Impact de la destruction enzymatique de l'aggrecan chez l'animal adulte.....	- 76 -

Partie 2 : Etude du rôle physiologique de la barrière latérale de diffusion..... - 80 -

1. Importance et remodelage de l'aggrecan pour la régulation de la prise alimentaire

2. Impact de la dégradation de l'aggrecan sur la réponse centrale à la ghréline ... - 84 -

2.1.	Impact de la dégradation de l'aggrecan sur l'effet orexigène de la ghréline	- 84 -
2.2.	Impact de la dégradation de l'aggrecan sur l'activation neuronale dans l'ARH suite à l'injection de ghréline.....	- 84 -
2.3.	Identification des neurones activés dans la partie dorsale de l'ARH après dégradation de l'aggrecan et injection de ghréline.....	- 85 -

3. Impact de la dégradation de l'aggrecan sur la réponse centrale à la leptine.....	- 88 -
3.1. Analyse de l'impact de la dégradation de l'aggrecan sur la réponse centrale à la leptine chez les animaux nourris	- 88 -
3.2. Analyse de l'impact de la dégradation de l'aggrecan sur la réponse centrale à la leptine chez les animaux préalablement mis à jeun	- 90 -
3.2.1. Impact de la dégradation de l'aggrecan sur l'effet anorexigène de la leptine	- 90 -
3.2.2. Impact de la dégradation de l'aggrecan sur l'activation des neurones du noyau arqué par la leptine	- 91 -
Partie 3 : Analyses préliminaires de la barrière latérale de diffusion dans un contexte pathologique en lien avec la prise alimentaire.....	- 94 -
1. Mise en place et description du modèle sélectionné.....	- 94 -
1.1. Choix de la nourriture	- 94 -
1.2. Caractérisation du modèle	- 95 -
2. Analyse du modèle d'obésité après 5 semaines de régime riche en gras, fructose et cholestérol	- 96 -
2.1. Impact du régime enrichi en gras, fructose et cholestérol sur la périphérie	- 96 -
2.2. Impact du régime enrichi en gras, fructose et cholestérol sur l'hypothalamus médio-basal....	- 98 -
3. Analyse du modèle d'obésité après plusieurs mois de régime alimentaire riche en gras, fructose et cholestérol.....	- 99 -
3.1. Impact du régime riche en gras, fructose et cholestérol sur les paramètres métaboliques	- 99 -
3.2. Impact du régime riche en gras, fructose et cholestérol sur l'hypothalamus médio-basal	- 102 -
Discussion.....	- 104 -
Conclusion générale.....	- 111 -
Matériel et méthodes.....	- 112 -
1. Les animaux.....	- 112 -
2. Mise à jeun pour l'étude de la plasticité.....	- 112 -
3. Cohorte High fat diet (HFD).....	- 113 -
3.1. Régime enrichi en gras.....	- 113 -
3.2. Test de tolérance au glucose (GTT).....	- 113 -
3.3. Test de tolérance à l'insuline (ITT).....	- 114 -
3.4. ELISA insuline.....	- 114 -
4. Injections.....	- 114 -
4.1. Injections intracérébrales (Stéréotaxie).....	- 114 -
4.2. Injections par voie rétro-orbitale	- 115 -
4.3. Injections intrapéritonéales	- 115 -
5. Les challenges ghréline et leptine sur animaux.....	- 116 -
5.1. Challenges ghréline et leptine sans mise à jeun	- 116 -
5.2. Challenge leptine avec mise à jeun	- 116 -
6. Préparation des tissus.....	- 116 -
6.1. Préparation des cerveaux	- 117 -
6.1.1. Tissu frais	- 117 -
6.1.2. Tissu fixé	- 117 -
6.1.3. Microdissections.....	- 117 -

6.2.	Préparation des organes périphériques	- 117 -
7.	Coupe des cerveaux congelés	- 118 -
8.	Immunohistochimie	- 118 -
8.1.	Immunohistochimie sur coupes flottantes de cerveau	- 118 -
8.2.	Immunohistochimie sur coupes de cerveau adhérentes	- 119 -
9.	Hybridation <i>in situ</i> par RNAscope	- 120 -
10.	Analyses par RT-qPCR	- 120 -
11.	Mesure de la surface occupée par l'aggrecan sur les coupes de cerveau après immunomarquage	- 121 -
12.	Comptage des neurones activés.....	- 122 -
13.	Analyses statistiques	- 122 -
	<i>Bibliographie</i>.....	- 124 -

Liste des abréviations

3V : troisième ventricule	DS : dermatane sulfate
4V : quatrième ventricule	EGF : facteur de croissance épidermique
ACAN : aggrecan	ELISA : technique d'immuno-absorption par enzyme liée
ADAMTS : Une désintégrine et une métalloprotéinase à motifs thrombospondines	EM : éminence médiane
ADAMTS-5 ^{ARH} : injection de l'ADAMTS-5 dans l'ARH	G1/2/3 : domaine globulaire 1/2/3
ADNc : ADN complémentaire	GAG : glycosaminoglycane
AgRP : peptide associé à l'agouti	Gal : galactose
AH : acide hyaluronique	GalNAc : N-acetylgalactosamine
ARH : noyau arqué de l'hypothalamus	GFP : protéine fluorescente verte
ARNm : ARN messager	GHS-R : récepteur du sécrétagogue de l'hormone de croissance
BCAN : brevican	GI : gastro-intestinal
BHE : barrière hémato-encéphalique	GlcA : acide glucuronique
BLD : barrière latérale de diffusion	GlcNAc : N-acétyl-glucosamine
CART : transcrite régulé par la cocaïne et l'amphétamine	GLP-1 : Glucagon- Like-Peptide-1
CBP : protéine de liaison du complément	GOAT : ghréline O-acyltransferase
CCK : cholécystokinine	GTT : test de tolérance au glucose
CCK A/B : récepteur A/B de la cholécystokinine	HAPLN : petite protéine de liaison hyaluronane et protéoglycane
ChABC : chondroïtinase ABC	HAS : hyaluronane synthase
CRD : domaine de reconnaissance des lectines	HE : hématoxyline/éosine
CRH : hormone de libération de la corticotropine	HFD : régime enrichi en gras
CS : chondroïtine sulfate	HFD-FC : régime enrichi en gras, fructose et cholestérol
CSPG : chondroïtine sulfate protéoglycan	HFHFD : régime enrichi en gras et en fructose
DMH : noyau dorso-médian de l'hypothalamus	HFHSD : régime enrichi en gras et en sucre
	HRP : peroxydase de raifort
	IdoA : acide iduronique

IGD : domaine inter-globulaire

IgG : immunoglobuline G

IHC : immuno-histo-chimie

ITT : test de tolérance à l'insuline

kDa : kiloDalton

KS : kératane sulfate

LCR : liquide céphalo-rachidien

LepR : récepteur à la leptine

LHA : aire latérale de l'hypothalamus

MCH : hormone de concentration de la mélanine

MEC : matrice extra-cellulaire

MMP : métalloprotéinases

MSH : hormone stimulant les mélanocytes

mTOR : cible à la rapamycine

NCAN : neurocan

NPY : neuropeptide Y

NTS : noyau du tractus solitaire

OCT : composé à température de coupe optimale

OCV : organe circumventriculaire

PBS^{ARH} : injection du PBS dans l'ARH

PFA : paraformaldéhyde

PG : protéoglycane

pmTOR : cible à la rapamycine phosphorylée

PNN : réseau peri-neuronal

POMC : pro-opiomélanocortine

PVH : noyau paraventriculaire

PYY₃₋₃₆ : peptide YY₃₋₃₆

qPCR : réaction de polymérisation en chaîne quantitative

RT-PCR : réaction de polymérisation en chaîne rétro-transcrite

SNC : système nerveux central

SPRR1a : petite protéine riche en proline 1a (cornifine A)

STAT3 : transducteur de signal et activateur de transcription 3

TenR : tenascine R

TH : tyrosine hydroxylase

TIMP : inhibiteurs de protéases

TRH : thyrotropine

UNVG : unité neuro-glio-vasculaire

VCAN : versican

VMH : noyau ventro-médian de l'hypothalamus

WFA : *Wisteria Floribunda Agglutinin*

ZO : zonula occludens

Liste des figures

Figure 1 : Les principaux acteurs impliqués dans la prise alimentaire	- 19 -
Figure 2 : Représentation des trois grandes étapes du cycle de la prise alimentaire	- 21 -
Figure 3 : Circuits principaux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire	- 30 -
Figure 4 : Les noyaux hypothalamiques impliqués dans la prise alimentaire	- 31 -
Figure 5 : Principaux circuits hypothalamiques impliqués dans l'induction d'une réponse centrale aux signaux d'adiposité.....	- 33 -
Figure 6 : Comparaison de la structure d'un vaisseau sanguin de la barrière hémato-encéphalique et d'un vaisseau fenêtré	- 39 -
Figure 7 : Les barrières physiologiques de l'éminence médiane	- 43 -
Figure 8 : Visualisation de la barrière de diffusion à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH)	- 44 -
Figure 9 : Microscopie électronique à transmission d'un faisceau de processus de tanycytes $\beta 1$	- 49 -
Figure 10 : Expression de la protéine SPRR1a par les tanycytes $\beta 1$	- 49 -
Figure 11 : Variation de la densité de la vimentine tanycytaire en fonction du rythme circadien	- 50 -
Figure 12 : Visualisation d'un dépôt de réseau peri-neuronal à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué	- 51 -
Figure 13 : Organisation tridimensionnelle du réseau peri-neuronal	- 53 -
Figure 14 : Présentation des différentes classes d'unités disaccharidiques en fonction de leurs motifs de sulfatation	- 55 -
Figure 15 : Localisation chromosomale et structure protéique de l'aggrecan (ACAN).-	60
-	-
Figure 16 : Les différents sites de clivage de l'aggrecan par les metallo-protéinases et les ADAMTS	- 63 -
Figure 17 : Blocage de la diffusion des molécules entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH).....	- 68 -
Figure 18 : Le réseau peri-neuronal (PNN) est responsable du blocage de l'albumine à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH)	- 71 -
Figure 19 : Composition du réseau peri-neuronal (PNN) à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH)	- 72 -
Figure 20 : Altération de l'expression de l'aggrecan (ACAN) dans les modèles génétiques murins	- 75 -
Figure 21 : L'aggrecan (ACAN) est responsable du blocage des molécules à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH)	- 77 -
Figure 22 : L'aggrecanase ADAMTS-5 est spécifique pour l'aggrecan (ACAN)	- 78 -
Figure 23 : La chondroïtinase ABC (ChABC) déstabilise l'ensemble du réseau peri-neuronal (PNN).....	- 79 -
Figure 24 : Plasticité de la barrière latérale de diffusion en fonction du statut métabolique alimentaire de l'animal ; Importance de cette barrière dans la prise alimentaire	- 83 -
Figure 25 : Rôle de la barrière latérale de diffusion à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH) dans la réponse de la ghréline.....	- 86 -
	- 15 -

Figure 26 : Les neurones activés par la ghréline dans la partie ventrale du noyau arqué (ARH) sont les neurones à NPY	- 87 -
Figure 27 : La destruction de la barrière de diffusion des molécules ne semble pas modifier l'activation des neurones à POMC suite à une injection de leptine	- 89 -
Figure 28 : Rôle de la barrière latérale de diffusion (BLD) à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH) dans la signalisation de la leptine après mise à jeun.....	- 92 -
Figure 29 : Effet de l'efficacité de la dégradation de l'aggrecan (ACAN) sur la réponse centrale à la leptine chez des animaux préalablement mis à jeun.....	- 93 -
Figure 30 : Suivi du poids des animaux suivant un régime enrichi en gras, en fructose et en cholestérol (HFD-FC)	- 96 -
Figure 31 : Impact du régime HFD-FC sur le tissu adipeux peri-viscéral et le foie après 5 semaines de traitement	- 97 -
Figure 32 : Impact du régime enrichi en gras, en fructose et en cholestérol (HFD-FC) sur le cerveau après 5 semaines de traitement.....	- 99 -
Figure 33 : Impact d'un régime enrichi en gras (HFD) sur le tissu adipeux peri-viscéral et le foie après 31.5 semaines de traitement.....	- 101 -
Figure 34 : Tests métaboliques après 26 semaines de traitement	- 102 -
Figure 35 : Impact du régime HFD sur le cerveau après 31.5 semaines de traitement	- 103 -
Figure 36 : Zones de comptage pour les challenges ghréline et leptine	- 122 -

Liste des tableaux

Tableau 1 : Aperçu des différents traceurs utilisés pour évaluer les propriétés de diffusion des molécules en fonction de leur taille à travers la barrière à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué	- 47 -
Tableau 1 : Liste des différents produits injectés.....	- 115 -
Tableau 2 : Liste des anticorps primaires	- 119 -
Tableau 3 : Liste des anticorps secondaires.....	- 120 -
Tableau 4 : Liste des sondes RNAscope.....	- 120 -
Tableau 5 : Liste des sondes TaqMan pour la qPCR	- 121 -

Introduction

En 1878, Claude Bernard introduit le concept de « milieu intérieur » dans son ouvrage « *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale* ». Cette notion sera précisée en 1929 par Walter Bradford Cannon qui la définira par le terme « d'homéostasie » : les êtres vivants constituent un milieu fermé à l'intérieur duquel des constantes clés (pH, température, pression, glycémie...) sont maintenues à un équilibre malgré les variations extérieures (Cannon 1929). Ainsi, la notion d'homéostasie énergétique se réfère à la capacité de l'organisme de maintenir un état d'équilibre entre les apports énergétiques fournis par la prise alimentaire et les dépenses énergétiques de cet organisme.

Max Kleiber a été le premier à établir le lien entre la dépense énergétique quotidienne et le poids corporel (Kleiber 1932). Le maintien de cet équilibre est finement régulé par une communication constante entre la périphérie et le système nerveux central (SNC), permettant ainsi de minimiser l'impact des variations quotidiennes de la balance énergétique sur la masse grasse et le poids corporel (Woods et al. 1998). Un déséquilibre de ces apports énergétiques peut amener à des états pathologiques tels que l'obésité. La régulation de la prise alimentaire est essentielle au maintien de l'homéostasie énergétique et les mécanismes mis en jeu sont largement étudiés.

1. Structures et molécules impliquées dans la prise alimentaire

Les signaux métaboliques produits par les organes périphériques gastro- intestinaux (GI), le foie, le pancréas, et le tissu adipeux sont intégrés au niveau du SNC qui induira en retour une réponse adaptée pour maintenir l'homéostasie énergétique (*Figure 1*).

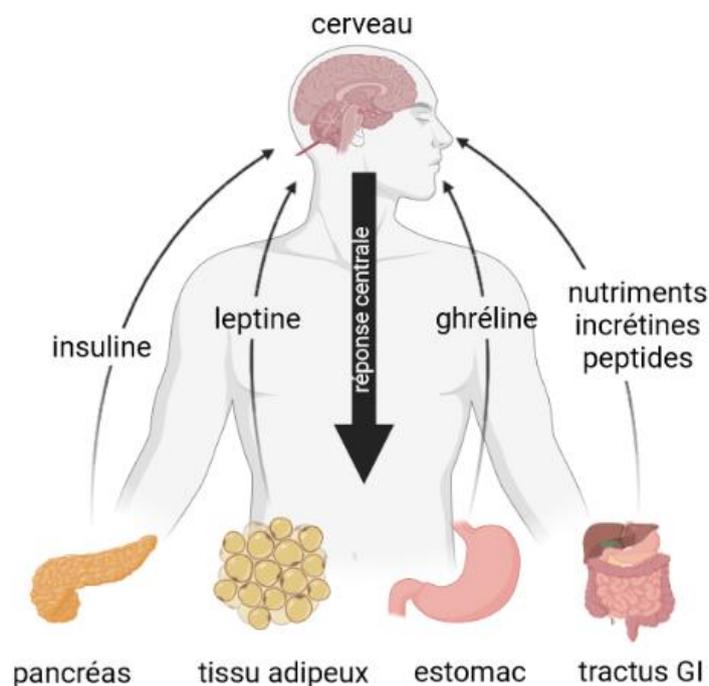


Figure 1 : Les principaux acteurs impliqués dans la prise alimentaire

Le système nerveux central intègre les signaux métaboliques périphériques, et met en place en retour une réponse adaptée dans le but de maintenir l'homéostasie énergétique. Ces différents signaux peuvent être de nature hormonale (insuline, leptine, ghréline), peptidique, ou encore être des nutriments issus de la digestion (glucose, acides aminés, acides gras...). Ils sont produits par le pancréas, le tissu adipeux et tractus gastro-intestinal (GI) dont fait partie l'estomac.

1.1. Les grandes étapes de la régulation de la prise alimentaire

Différents facteurs environnementaux comme le stress, la quantité de nourriture disponible, les propriétés organoleptiques des aliments ou encore des événements sociaux peuvent influencer notre consommation de nourriture. Dans les années 50, deux grandes théories sur la régulation de la prise alimentaire s'opposent : la théorie glucostatique de Mayer (Mayer 1953), et la théorie lipostatique de Kennedy (Kennedy 1953). Alors que Mayer établit un lien entre la glycémie et la prise alimentaire, proposant ainsi que les réserves glucidiques soient le seul informateur du statut énergétique de l'organisme, Kennedy établit quant à lui qu'afin d'assurer l'équilibre de la balance énergétique, le SNC se tient informé en permanence de l'état de ses réserves *via* des molécules anorexigènes, nommées « signaux d'adiposité » et exprimées proportionnellement au tissu adipeux. Si la théorie de Kennedy est aujourd'hui vérifiée expérimentalement, les signaux d'adiposité étant considéré comme les facteurs de

régulation à long terme de l'homéostasie énergétique, la variation de la glycémie pourrait également jouer un rôle dans l'initiation de la prise alimentaire, et donc la régulation à court terme de celle-ci. En effet, bien que des études aient montré que l'injection périphérique de glucose, avec ou sans insuline ne modifiait pas temporellement le début de la prise alimentaire, ni la taille du repas (BERNSTEIN and GROSSMAN 1956; Nicolaidis and Rowland 1976), d'autres études montrent en revanche une induction de la prise alimentaire suite à l'injection d'insuline (Epstein and Teitelbaum 1967; Larue-Achagiotis and Le Magnen 1979; MacKay, Callaway, and Barnes 1940) ou d'analogues non métabolisables du glucose (Likuski, Debons, and Cloutier 1967; Smith and Epstein 1969; Stricker and Rowland 1978). De plus, des techniques plus récentes permettant la mesure continue de la glycémie chez des rats libres de leurs mouvements, en contraste avec les expériences précédentes nécessitant des mesures discrètes de la glycémie à des intervalles fixés, ont montré une brève diminution de la glycémie juste avant l'initiation de la prise alimentaire (Campfield, Brandon, and Smith 1985; Louis-Sylvestre and Le Magnen 1980; Steffens 1969). Cette partie présente ces deux types de signaux et comment ils régulent la prise alimentaire.

1.1.1. Régulation à court terme de la prise alimentaire

La régulation de la prise alimentaire à court terme permet le contrôle de la fréquence (satiété), mais surtout de la taille (satiété) des repas. Celle-ci peut être vue comme un cycle, dont les étapes principales sont l'initiation de la prise alimentaire, médiée par des signaux orexigènes comme la baisse de la glycémie ou la sécrétion de ghréline, hormone orexigène majoritairement sécrétée par l'estomac (Cummings et al. 2001; Mayer 1953), la satiété, médiée par des signaux satiétogènes et permettant le contrôle de la taille des repas par l'arrêt de l'ingestion de nourriture, et la satiété, médiée par des signaux anorexigènes permettant le contrôle de la fréquence des repas en déterminant le temps passé entre chaque repas sans manger (Wilde 2009) (*Figure 2*).

De façon générale, les signaux permettant la régulation à court terme de la prise alimentaire informant le SNC du statut nutritionnel de l'organisme sont intégrés au niveau du complexe vagal dorsal localisé dans le tronc cérébral grâce au nerf vague (Ritter 2004). Le nerf vague innerve l'ensemble des organes gastro-intestinaux (GI), le foie et le pancréas et permet de recueillir les signaux, satiétogènes pour la plupart, produits par ces différents organes en réponse à la prise alimentaire. Les signaux hormonaux

sécrétés par ces organes peuvent également gagner l'area postrema, un organe circumventriculaire appartenant au complexe vagal dorsal, via la circulation sanguine.

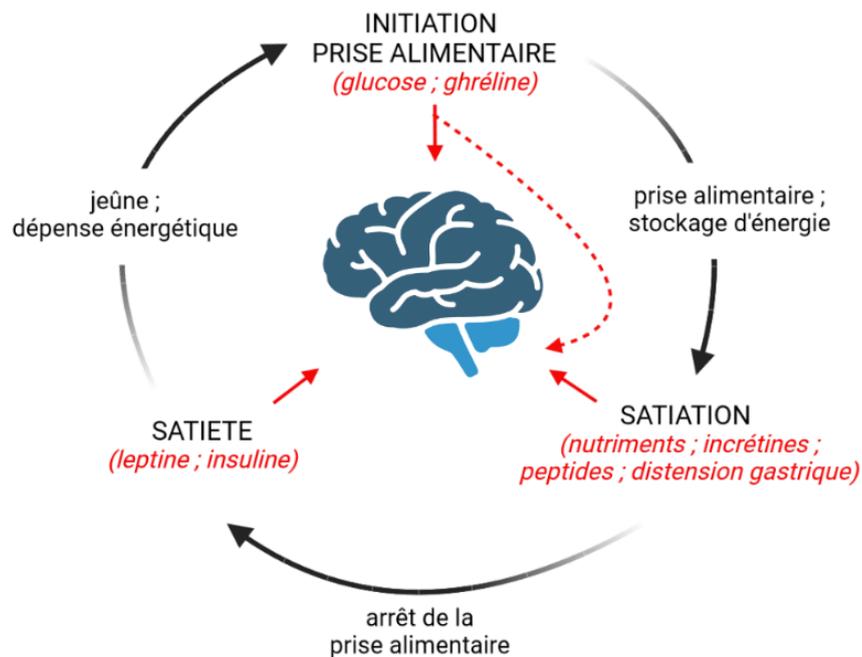


Figure 2 : Représentation des trois grandes étapes du cycle de la prise alimentaire

La prise alimentaire peut être envisagée comme un cycle, démarrant par une phase d'initiation provoquée par la diminution de la glycémie et l'augmentation du taux de ghréline plasmatique. Ces signaux informent le système nerveux central (SNC) soit via le tronc cérébral (flèche pointillée rouge vers tronc cérébral bleu clair) soit directement au niveau du cerveau (flèche rouge pleine vers cerveau bleu foncé). L'initiation de la prise alimentaire est suivie par la satiété qui consiste en l'arrêt de la prise alimentaire. Elle détermine la taille des repas. Les signaux satiétogènes permettent la régulation de la prise alimentaire à court terme (nutriments issus de la digestion, les hormones sécrétées en réponse à ces nutriments et la distension gastrique) et sont principalement intégrés au niveau du tronc cérébral (flèche rouge pleine vers tronc cérébral bleu clair). Enfin, la satiété est régie par les signaux permettant la régulation de la prise alimentaire à long terme et détermine le temps passé entre chaque repas sans manger (et donc le nombre de repas).

1.1.1.1. L'initiation de la prise alimentaire

Des études ont montré une diminution transitoire de la glycémie avant chaque repas, et qu'une injection de glucose suffisamment rapide permet de reporter le repas de plusieurs heures (Campfield et al. 1985; Louis-Sylvestre and Le Magnen 1980). L'hypoglycémie préprandiale contribue donc à l'initiation de la prise alimentaire. Cette information est intégrée au niveau du SNC, et plus précisément dans l'hypothalamus et le complexe vagal dorsal. Il existe en effet dans l'hypothalamus et le complexe vagal dorsal des neurones dits gluco-senseurs, c'est à dire sensibles aux variations de glucose (Mizuno and Oomura 1984; Wang et al. 2004). En particulier, certaines zones cérébrales telles que la région hypothalamique proche de l'éminence médiane ou l'area postrema

sont directement informées des variations de glucose circulant parce que la barrière hémato-encéphalique (BHE) n'y est pas fonctionnelle (cf. « La barrière hémato-encéphalique ») (Mayer et al. 2006; Silver and Erecińska 1998). Ces neurones gluco-senseurs, connectés entre eux, sont donc capables de détecter rapidement une variation de la glycémie et de mettre en place une réponse adaptée.

L'augmentation de la concentration plasmatique de ghréline, une hormone orexigène produite par les cellules de l'estomac, joue également un rôle dans l'initiation de la prise alimentaire. Cette hormone est décrite ci-dessous (cf. « Régulation à long terme de la prise alimentaire »).

1.1.1.2. L'étape de satiété de la prise alimentaire à court terme

- ***Les signaux directs informant le système nerveux central de la satiété***

La distension de l'estomac, causée par l'arrivée du bol alimentaire dans cet organe, est un premier signal mécanique dont l'effet satiétogène – se traduisant par l'arrêt de l'ingestion - est médié par l'activation du nerf vague *via* les mécanorécepteurs présents à ses terminaisons (Phillips and Powley 1996; Ritter 2004). En effet, après une vagotomie totale, la distension gastrique n'entraîne plus la satiété (Phillips and Powley 1998). En parallèle, les différents nutriments résultant de la digestion mécanique et enzymatique des aliments - tels que des sucres, des acides gras, des acides aminés ou des peptides – sont des signaux informant les structures cérébrales de l'état métabolique de la périphérie directement *via* le nerf vague (en activant les récepteurs couplés aux protéines G présents aux terminaisons afférentes) ou *via* la circulation sanguine (Schwartz et al. 2000; Zheng and Berthoud 2008).

- ***Les signaux indirects informant le système nerveux central de la satiété***

Les nutriments issus de la digestion peuvent également induire la satiété de façon indirecte en stimulant la production par d'autres organes périphériques de peptides ou d'hormones satiétogènes tels que le peptide YY₃₋₃₆ (PYY₃₋₃₆), le Glucagon-Like-Peptide-1 (GLP-1) ou la cholécystokinine (CCK) (Chaudhri, Wynne, and Bloom 2008).

La sécrétion de la CCK par l'intestin grêle est déclenchée par les acides aminés et acides gras résultant de la digestion du bol alimentaire (Gibbons et al. 2016). Ce peptide a un effet satiétogène car son injection périphérique diminue la taille des repas de façon

dose-dépendante (Gibbs, Young, and Smith 1973). Cet effet est médié majoritairement par le nerf vague (Moran et al. 1997; Raybould 2007). Il existe deux récepteurs de la CCK : CCK-A et CCK-B. Cependant, l'effet satiétogène de la CCK semble être sous-tendu par le récepteur CCK-A. En effet, le blocage pharmacologique de CCK-A entraîne l'augmentation de la prise alimentaire chez la souris (Hirosue et al. 1993) et l'injection d'un antagoniste de CCK-A entraîne l'augmentation de la taille des repas chez le rat (Moran et al. 1992). De plus, une étude portant sur des rats n'exprimant pas ce récepteur montre que ceux-ci sont obèses, et que la taille ainsi que la fréquence de leur repas sont augmentées. Ces résultats montrent également le rôle satiétogène (taille des repas) de la CCK (Marco, Schroeder, and Weller 2009). Outre la stimulation du nerf vague, la CCK prévient la vidange gastrique, et stimule la sécrétion de l'insuline (cf. « Régulation à long terme de la prise alimentaire ») de la même manière que l'augmentation de la glycémie.

Le PYY₃₋₃₆ et le GLP-1 sont deux peptides satiétogènes co-synthétisés par l'intestin au cours de la phase post-prandiale (Dumoulin et al. 1995). A l'instar de la CCK, leur concentration plasmatique augmente rapidement après le début de la prise alimentaire, et ils sont produits proportionnellement à l'apport énergétique consommé (Adrian et al. 1985; Elliott et al. 1993). Leurs effets sont majoritairement médiés par le nerf vague (Koda et al. 2005) mais le PYY₃₋₃₆ est également capable d'agir au niveau central en inhibant les neurones exprimant le neuropeptide Y (NPY) situés dans le noyau arqué de l'hypothalamus (ARH) *via* sa fixation sur des récepteurs exprimés par les neurones à NPY (Abbott et al. 2005).

Il est à noter que la régulation de la prise alimentaire au niveau de l'hypothalamus est principalement médiée par les signaux « d'adiposité » (cf. « Régulation à long terme de la prise alimentaire »), impliqués dans son contrôle à long terme. Dans le paragraphe suivant, nous nous attacherons à décrire les différents signaux impliqués dans la régulation à long terme de la prise alimentaire.

1.1.2. Régulation à long terme de la prise alimentaire

L'ensemble des mécanismes décrits ci-dessus sont suffisants pour réguler la sensation de faim d'un repas à l'autre, mais ne permettent pas une action durable sur le maintien de l'équilibre de la balance énergétique ou du poids global de l'individu. Ce rôle revient aux signaux d'adiposité (Bauer, Hamr, and Duca 2016; Cummings and Overduin 2007; Woods et al. 1998). Plusieurs critères doivent être respectés pour qu'une hormone

puisse être considérée comme un signal d'adiposité. En particulier, une telle hormone doit être produite proportionnellement à la quantité de tissu adipeux présent dans l'organisme, provoquer une perte de poids due à leur effet anorexigène au niveau central, et amener à une prise de poids due à une augmentation de l'alimentation en étant inhibée. Seules l'insuline et la leptine, hormones produites respectivement par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas et par le tissu adipeux blanc ont été reconnues comme étant des signaux d'adiposité (Figlewicz 2003; Morton et al. 2006).

- **L'insuline**

L'insuline, hormone hypoglycémisante codée par le gène *Ins*, est la première hormone à avoir été définie comme signal d'adiposité (Woods et al. 1979). Bien qu'elle ne soit pas sécrétée directement par le tissu adipeux, sa concentration plasmatique est proportionnelle à la quantité de masse grasse (Polonsky et al. 1988). L'insuline est également capable d'informer le SNC de l'état de réserve de l'organisme. En effet, son récepteur – INSR, un hétéro-tétramère transmembranaire – est présent au niveau de l'hypothalamus et du complexe vagal dorsal (Havrankova, Roth, and Brownstein 1978; Unger, Moss, and Livingston 1991). De plus, cette hormone a la capacité de rejoindre le SNC *via* un transport saturable impliquant un processus de transport médié par le récepteur de l'insuline (Baura et al. 1993). L'injection intracérébrale d'insuline mène à une diminution de la prise alimentaire ainsi que du poids corporel (Woods et al. 1979). D'autre part, l'inactivation du gène codant le récepteur à l'insuline par une approche Cre/loxP dans les cellules souches neuro-épithéliales, conduisant à l'absence du récepteur à l'insuline spécifiquement dans le cerveau, induit une hyperphagie et une obésité chez le rat (Bruning et al. 2000).

- **La leptine**

La leptine a été la seconde hormone d'adiposité découverte et est aujourd'hui considérée comme le signal d'adiposité majeur puisque produit par le tissu adipeux blanc (Masuzaki et al. 1995; Zhang et al. 1994). Il s'agit d'une hormone anorexigène codée par le gène *Ob* et très conservée au cours de l'évolution (Denver, Bonett, and Boorse 2011). La leptine est sécrétée proportionnellement à la quantité de triglycérides présents dans le tissu adipeux blanc (Frederich et al. 1995). D'ailleurs, une diminution du poids corporel due à la fonte des réserves adipeuses entraîne une chute de la concentration

plasmatique de leptine, et inversement (Ahrén et al. 1997; Havel et al. 1996; Keim, Stern, and Havel 1998). La leptinémie varie aussi en fonction du statut métabolique (Saladin et al. 1995). Elle diminue lorsque le statut énergétique de l'individu baisse, par exemple lors d'une mise à jeun. En revanche, l'accès à la nourriture après une mise à jeun restaure le niveau initial de leptine (Ahlma et al. 1996; Becker et al. 1995; Trayhurn et al. 1995). La leptine est capable d'informer le SNC, et plus précisément l'ARH où son récepteur est exprimé par les neurones à NPY et à pro-opiomélanocortine (POMC), de l'état des réserves périphériques.

Des signaux nutritionnels, mais également hormonaux modulent l'expression de la leptine en réponse à une variation de l'équilibre énergétique. Alors que l'insuline et les glucocorticoïdes favorisent la production de leptine, (Dagogo-Jack 2001) la lipolyse engendrée par les catécholamines régule négativement la transcription de la leptine (Trayhurn et al. 1998). De plus, la leptine elle-même régule négativement son expression génique. Une fois sécrétée, la leptine peut circuler dans le sang sous forme libre, sous laquelle elle sera active, ou sous forme liée, en particulier à une forme soluble de son récepteur la rendant inactive. En effet, une étude a montré qu'elle se lie principalement à la forme soluble du récepteur à la leptine LepRe (Myers, Cowley, and Münzberg 2008). Il existe six isoformes du récepteur à la leptine (LepRa-f), résultant de l'épissage alternatif du gène *Db (Lepr)*. L'ensemble des isoformes du récepteur à la leptine possèdent un domaine commun de fixation de la leptine. Ils diffèrent au niveau de leur domaine intracellulaire. L'isoforme LepRe est le seul ne possédant pas de domaine transmembranaire et donc présent sous forme soluble, ce qui lui permet de se lier à la leptine circulante (voir ci-dessus). L'isoforme LepRb, aussi connu sous l'appellation « forme longue du récepteur à la leptine », est la forme responsable de l'action de la leptine dans le maintien de l'homéostasie énergétique (Bjørnbæk et al. 1998).

La fixation de la leptine sur LepRb permet le recrutement et l'activation de JAK2, qui en retour va s'auto-phosphoryler et phosphoryler trois tyrosines différentes du domaine intracellulaire de LepRb : Y985, Y1077 et Y1138. Chacun de ces sites de phosphorylation déclenche une voie de signalisation différente, et donc des réponses physiologiques distinctes. C'est la phosphorylation de l'acide aminé Y1138 qui sous-tend l'effet de la leptine dans la régulation de l'homéostasie énergétique en activant la voie de signalisation STAT3 (Transducteur de signal et activateur de transcription 3) (Myers et al. 2008).

Comme évoqué précédemment, la diminution de la leptinémie induit une augmentation de la prise alimentaire. Des injections intracérébrales et intrapéritonéales de leptine chez des rats conduisent à une diminution de la prise alimentaire (Campfield et al. 1995; Halaas et al. 1995; Rentsch, Levens, and Chiesi 1995; Seeley et al. 1996). Une mutation ponctuelle du gène *Ob* mène à l'expression d'une forme non fonctionnelle de la leptine. Les souris portant la double mutation du gène *Ob*, dites *Ob/Ob*, deviennent hyperphagiques et obèses, appuyant de ce fait l'importance de l'effet anorexigène de la leptine dans le cadre du maintien de l'équilibre de la balance énergétique (Zhang et al. 1994). Enfin, le traitement chronique de souris *Ob/Ob* âgées de 5 semaines par de la leptine exogène permet d'éviter le développement d'une obésité (Pelleymounter et al. 1995).

- **La ghréline**

Contrairement à l'insuline et à la leptine, la ghréline est libérée de façon inversement proportionnelle à la quantité de tissu adipeux. En effet, la concentration plasmatique de ghréline est corrélée négativement avec le poids de rats non obèses (Sugiishi et al. 2013), et avec l'indice de masse grasse chez l'Homme (Wadden et al. 2012).

Décrite pour la 1^{ère} fois en 1999, la ghréline a été identifiée comme ligand pour le récepteur GHS-R (Growth Hormone Secretagogue Receptor). Sécrétée principalement par les cellules de la sous-muqueuse de l'estomac (Date et al. 2000; Kojima et al. 1999), la ghréline est la seule hormone métabolique périphérique ayant un effet orexigène (Tschop, Smiley, and Heiman 2000). Cette petite protéine de 3 kDa requiert d'être n-octanoylée sur la 3^{ème} sérine pour être active et pouvoir se lier à son récepteur (Bednarek et al. 2000; Kojima et al. 1999). En effet, la forme désacylée non active de la ghréline ne se lie pas au récepteur à la ghréline, et ses effets physiologiques potentiels ne sont pas encore totalement déterminés (Delhanty, Neggers, and Van Der Lely 2014). Cette modification post-traductionnelle de la ghréline est médiée par l'enzyme GOAT (ghréline O-acyltransferase), qui transfère un groupe acyl provenant des acides gras sur la 3^{ème} sérine de la ghréline (Gutierrez et al. 2008; Trivedi et al. 2017; Wellman and Abizaid 2015). Ce processus se déroule dans le reticulum endoplasmique, avant que la ghréline n'atteigne l'appareil de Golgi (Li, Mulholland, and Zhang 2016). Le blocage de la GOAT réduit l'impact de la ghréline sur la prise alimentaire, ce qui se traduit par une diminution de la prise alimentaire et du gain de poids corporel (Wellman and Abizaid 2015).

Il existe deux formes du récepteur à la ghréline : le GHS-R1a et le GHS-R1b. Le GHS-R1b correspond à une forme tronquée non fonctionnelle de la protéine, donc seule la forme GHS-R1a est fonctionnelle. Ce récepteur est exprimé majoritairement dans l'hypothalamus, même si on le retrouve également dans le complexe vagal dorsal, aux terminaisons des afférences du nerf vague, et est également faiblement exprimé dans d'autres organes périphériques tels que l'intestin ou le pancréas (Zigman et al. 2006). Toutefois, parmi tous les organes exprimant le GHS-R1a, l'hypothalamus et le complexe vagal dorsal semblent jouer un rôle prépondérant car ce sont les seuls organes dont les neurones sont activés suite à l'injection intrapéritonéale de ghréline (Nakazato et al. 2001; Tschop et al. 2000). Si la forme GHS-R1b ne lie pas directement la ghréline, elle peut néanmoins se dimériser avec la forme GHS-R1a, et ainsi diminuer l'activité basale du récepteur à la ghréline. En effet, des études ont montré que la forme GHS-R1a présente une activité constitutive, indépendamment de la présence d'agoniste (Holst and Schwartz 2004).

Le GHS-R1a possède les mêmes caractéristiques que les récepteurs couplés aux protéines G, à savoir 7 segments transmembranaires et est couplé avec la protéine $G\alpha_{q/11}$. La protéine $G\alpha_{q/11}$ active la phospholipase C, elle-même activant le phosphoinositol menant à la mobilisation des stocks intracellulaires de calcium. Des données récentes mettent cependant en évidence que l'action de la ghréline dans la régulation de l'énergie homéostatique est sous-tendue par la voie de signalisation de la cible à la rapamycine (mTOR), aussi bien dans l'hypothalamus que le complexe vagal dorsal (Martins et al. 2012; Zhang et al. 2013). Le rôle pivot de mTOR pour l'effet orexigène de la ghréline dans les neurones de l'hypothalamus est aujourd'hui clairement admis, et le marquage de la protéine mTOR phosphorylée (pmTOR) peut être utilisé pour identifier les neurones activés par la ghréline (Martins et al. 2012).

La concentration plasmatique de ghréline varie en fonction de la prise alimentaire. En effet, peu de temps avant la prise alimentaire – environ 20 à 30 minutes -, le taux de ghréline circulant est élevé ce qui informe le système nerveux de la baisse du niveau énergétique. Cela entraîne la sensation de faim, et par conséquent la consommation de nourriture. La concentration circulante de ghréline chute dans l'heure qui suit la prise alimentaire (Cummings et al. 2001). De même, alors que la concentration plasmatique de ghréline augmente chez des animaux mis à jeun, elle revient à son niveau basal lorsqu'ils sont renourris (Tschop et al. 2000). Ces données suggèrent que tout comme

l'hypoglycémie transitoire pré-prandiale, le pic de sécrétion de ghréline joue un rôle dans l'initiation de la prise alimentaire.

Pour cela, de la même manière que l'insuline et la leptine, la ghréline va agir au niveau des neurones de l'ARH. Nous nous attacherons à montrer dans la suite de cette partie comment ces différents signaux sont intégrés au niveau central pour la régulation de la balance énergétique.

1.2. Les régions du système nerveux central impliquées dans la perception des signaux régulateurs de la prise alimentaire

Comme décrit précédemment, il existe une multitude de signaux périphériques participant au contrôle à court et à long terme de la prise alimentaire, et donc au maintien de l'homéostasie énergétique et du poids corporel. C'est Mohr qui pour la première fois établira un lien entre le poids corporel et le SNC en 1840 (Brobeck 1946). Quelques années plus tard, Bailey et Bremer iront plus loin en observant que des chiens devenaient obèses après une lésion hypothalamique, établissant ainsi un lien entre l'obésité et l'hypothalamus (Bailey and Bremer 1921).

L'hypothèse de l'hypothalamus comme centre régulateur métabolique semble se confirmer avec la découverte du rôle majeur de deux noyaux hypothalamiques dans les années 40-50 (cf. « L'hypothalamus, un centre intégrateur majeur dans la régulation de la prise alimentaire »). Il faudra attendre encore 30 ans avant la première mise en évidence expérimentale du rôle du tronc cérébral dans l'intégration des signaux métabolique périphériques satiétogènes à partir d'un modèle de rats décérébrés chroniques, i.e. dont les parties antérieure et postérieure du cerveau sont dissociées de façon chirurgicale (Grill and Kaplan 1992; Grill and Norgren 1978). En effet, le tronc cérébral n'était jusque-là considéré que comme un relais permettant d'acheminer les informations périphériques jusqu'au « véritable » centre intégrateur, l'hypothalamus. En particulier, au sein du tronc cérébral, le complexe vagal dorsal évoqué précédemment joue un rôle crucial dans l'intégration des signaux périphériques.

1.2.1. *Le tronc cérébral : un centre intégrateur à part entière dans la régulation de la prise alimentaire*

La transmission des signaux métaboliques de la périphérie vers le complexe vagal dorsal, où l'information sera intégrée, est médiée par le nerf vague (Crespo et al. 2014;

Keesey and Powley 2008). L'activation du nerf vague *via* les mécano/chémo-récepteurs présents à ses extrémités déclenche la libération d'acétylcholine qui va activer les neurones du noyau du tractus solitaire (NTS). L'importance du nerf vague pour la transmission de l'information au tronc cérébral a été montrée par Phillips et Powley (Phillips and Powley 1998) (cf. « Régulation à court terme de la prise alimentaire »). Plus précisément, le nerf vague transmet les informations périphériques au complexe vagal dorsal, composé de trois structures principales situées très proches les unes des autres : l'area postrema, le noyau moteur dorsal du nerf vague et le noyau du tractus solitaire (NTS). Globalement, les informations médiées par les métabolites circulants arrivent par l'area postrema, et les informations nerveuses atteignent le NTS. Le NTS lui-même est connecté à l'hypothalamus afin de coordonner la mise en place de réponses adaptées pour l'organisme.

Des données montrent une augmentation de l'activation neuronale dans le NTS, observée par la détection de l'expression de c-fos (marqueur de l'activation neuronale) dans ces neurones, suite à l'induction artificielle de la distension gastrique à l'aide d'un ballon placé dans l'estomac, confirmant l'intégration de l'information périphérique au niveau du complexe vagal dorsal (Vrang et al. 2003).

D'autres données mettent également en évidence l'intégration de l'information par le tronc cérébral médiée par des signaux d'adiposité, alors que ce rôle était auparavant uniquement attribué à l'hypothalamus. La découverte de la présence des récepteurs à l'insuline, à la leptine et à la ghréline (Faulconbridge et al. 2003; Mercer et al. 1998; Unger et al. 1991) à la surface des neurones du complexe vagal dorsal sont en accord avec ces observations.

Venant confirmer cette idée, l'augmentation de la prise alimentaire suivant l'injection dans le troisième et quatrième ventricule (3V et 4V respectivement) de ghréline montre l'action de la ghréline au niveau du tronc cérébral (Faulconbridge et al. 2003). De même, l'injection de leptine dans le 4V entraîne une diminution de la prise alimentaire chez le rat (Grill et al. 2002) alors que la délétion du récepteur à la leptine uniquement dans le complexe vagal dorsal entraîne une hyperphagie et une rapide augmentation du poids corporel (Garfield et al. 2012). De plus, la phosphorylation de STAT3 (voie de signalisation de la leptine) et l'expression de c-fos dans les neurones de l'hypothalamus et du complexe vagal dorsal après injection de leptine démontre une action directe de la leptine au niveau du tronc cérébral (Hosoi et al. 2002; Sachot et al. 2007). Enfin,

l'hypothalamus mais également le complexe vagal dorsal possèdent des neurones gluco-senseurs. Ces neurones peuvent être excités ou inhibés en présence de glucose et forment entre eux un réseau permettant la mise en place d'une réponse adaptée (Marty, Dallaporta, and Thorens 2007).

Il existe donc des connexions, directes et indirectes, entre le complexe vagal dorsal et l'hypothalamus, permettant un contrôle fin de la prise alimentaire. Notamment, l'ARH, le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVH) et l'aire latérale de l'hypothalamus (LHA) reçoivent les afférences directes des neurones du NTS et projettent vers eux en retour, ainsi que sur le noyau moteur dorsal du nerf vague (*Figure 3*). L'hypothalamus et le complexe vagal dorsal sont également indirectement connectés entre eux par l'intermédiaire du noyau parabrachial (Berthoud 2002).

Toutefois, bien que le complexe vagal dorsal commence à être reconnu comme un centre intégrateur, l'hypothalamus reste le centre principal de l'intégration des signaux métaboliques périphériques.

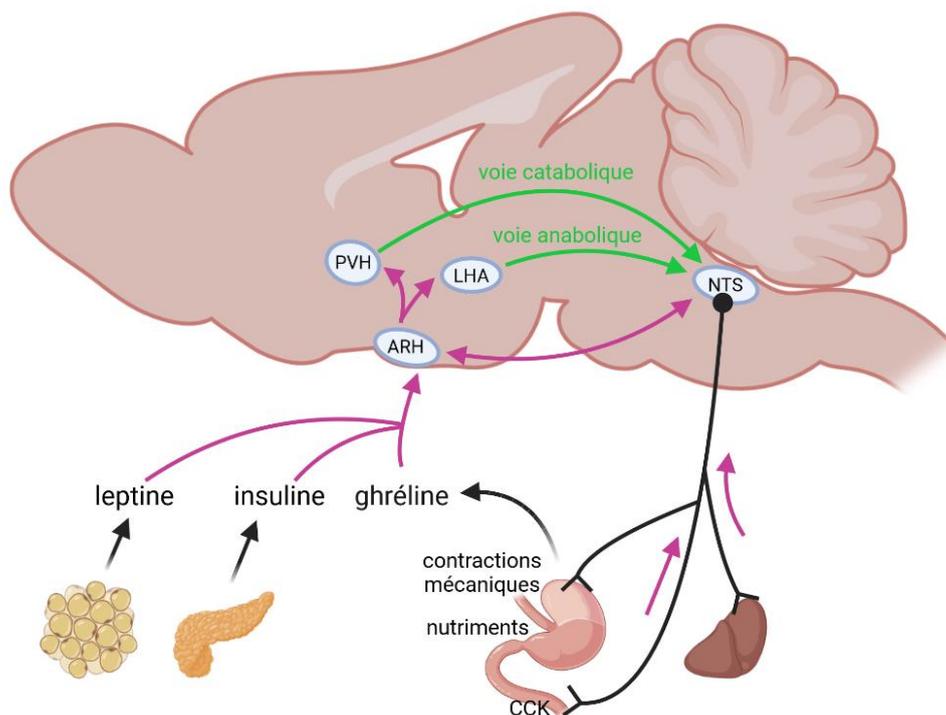


Figure 3 : Circuits principaux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire

Les signaux d'adiposité (leptine et insuline, respectivement sécrétée par le tissu adipeux et le pancréas) ainsi que la ghréline rejoignent le noyau arqué (ARH) dont les neurones expriment leurs récepteurs par la circulation sanguine. Les signaux satiétogènes (nutriments, contractions mécaniques de l'estomac, cholecystokinine...) mais aussi la ghréline sont des signaux intégrés au niveau du noyau du tractus solitaire (NTS) dans le complexe vagal dorsal via le nerf vague. Les noyaux hypothalamiques (ARH, noyau paraventriculaire (PVH), aire latérale de l'hypothalamus (LHA)) et le NTS communiquent entre eux afin de mettre en place une réponse adaptée pour le maintien de l'énergie homéostatique.

1.2.2. L'hypothalamus : un centre intégrateur majeur dans la régulation de la prise alimentaire

L'hypothalamus est une structure cérébrale localisée à la base du cerveau et composé de douze paires de noyaux hypothalamiques. Ces noyaux hypothalamiques sont disposés de façon symétrique de part et d'autre du 3V, une cavité cérébrale dans laquelle circule le liquide céphalo-rachidien (Figure 4).

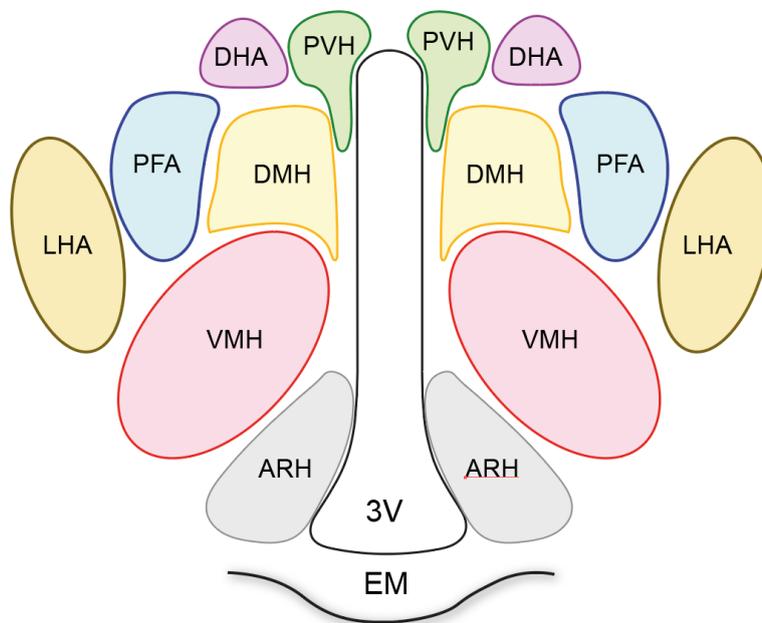


Figure 4 : Les noyaux hypothalamiques impliqués dans la prise alimentaire

Les noyaux hypothalamiques sont répartis de façon symétrique de part et d'autre du troisième ventricule (3V) dans lequel circule le liquide céphalo-rachidien (LCR). Les noyaux hypothalamiques sont le noyau paraventriculaire (PVH), l'aire hypothalamique dorsale (DHA), l'aire peri-fornicale (PFA), le noyau dorso-médian (DMH), le noyau ventro-médian (VMH), l'aire latérale de l'hypothalamus (LHA) et le noyau arqué (ARH). L'éminence médiane (EM) est un organe circumventriculaire qui délimite ventralement l'hypothalamus.

Dans les années 40, les travaux d'Hetherington et Ranson mettent en évidence le rôle de l'hypothalamus, et plus particulièrement du noyau ventro-médian de l'hypothalamus (VMH) dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

En effet, leurs travaux ont montré que seule une lésion du VMH entraîne une obésité et une hyperphagie chez le rat alors que la lésion des autres noyaux hypothalamiques n'a pas d'effet sur une prise de poids (Brobeck, Tepperman, and Long 1943; Hetherington 1944; Hetherington and Ranson 1940). Ces résultats suggèrent le rôle important du VMH dans le contrôle négatif de la balance énergétique, ce qui lui valut la dénomination de «

centre de la satiété » (Kennedy 1950).

A l'inverse, des lésions dans le noyau latéral hypothalamique (LHA) étaient associées à une diminution du poids et de la prise alimentaire alors que la stimulation de ce noyau hypothalamique induit un effet opposé, suggérant un rôle majeur du noyau latéral hypothalamique dans la régulation positive de la balance énergétique. En opposition au VMH, le LHA a donc été qualifié de « centre de la faim » (Anand and Brobeck 1951).

Même s'il n'est plus d'actualité, ce modèle a été un point de départ important pour les expériences ultérieures sur l'intégration centrale des informations métaboliques périphériques. Cinquante ans plus tard, une nouvelle carte des principaux noyaux hypothalamiques participant à l'homéostasie énergétique est apparue impliquant l'ARH, le VMH, le noyau dorso-médian de l'hypothalamus (DMH), le LHA et le PVH, (Elmqvist, Elias, and Saper 1999; Williams, Harrold, and Cutler 2000).

L'hypothalamus est un centre intégrateur majeur des signaux métaboliques circulants. Les neurones de l'ARH étant parmi les premiers au contact de ces signaux périphériques – tels que la leptine ou la ghréline -, ils sont dits de premier ordre (Ciofi et al. 2009). Ils projettent ensuite vers les noyaux hypothalamiques ou extra-hypothalamiques dits de second ordre, à savoir le VMH, le DMH, le PVH et la LHA. Toutefois, les projections de l'ARH établissent particulièrement des connections avec le PVH et la LHA (Cone 2005; Schwartz et al. 2000).

Avec le VMH, le PVH constituerait le 2^{ème} centre de la satiété. A l'instar du VMH, la stimulation du PVH entraîne une diminution de la prise alimentaire alors que sa destruction bilatérale augmente la prise alimentaire et provoque l'obésité (King et al. 1989). Le PVH exprime également des neuropeptides anorexigènes tels que l'hormone de libération de la corticotropine (CRH) (Glowa et al. 1992) ou l'hormone de libération de la thyrotropine (TRH) (Kow and Pfaff 1991). Il joue également un rôle dans la réponse efférente vers les organes périphériques, comme la lipolyse ou l'oxydation des acides gras (Foster, Song, and Bartness 2010). En opposition au VMH et au PVH, le LHA exprime quant à lui des neuropeptides orexigènes tels que les orexines ou l'hormone de concentration de la mélanine (MCH) (Williams et al. 2000). Ainsi, lorsque les signaux d'adiposité – ghréline, leptine, insuline - atteignent l'ARH, cela déclenche la sécrétion des neuropeptides orexigènes et anorexigènes qui vont activer les voies anaboliques ou cataboliques correspondantes (*Figures 3 et 5*).

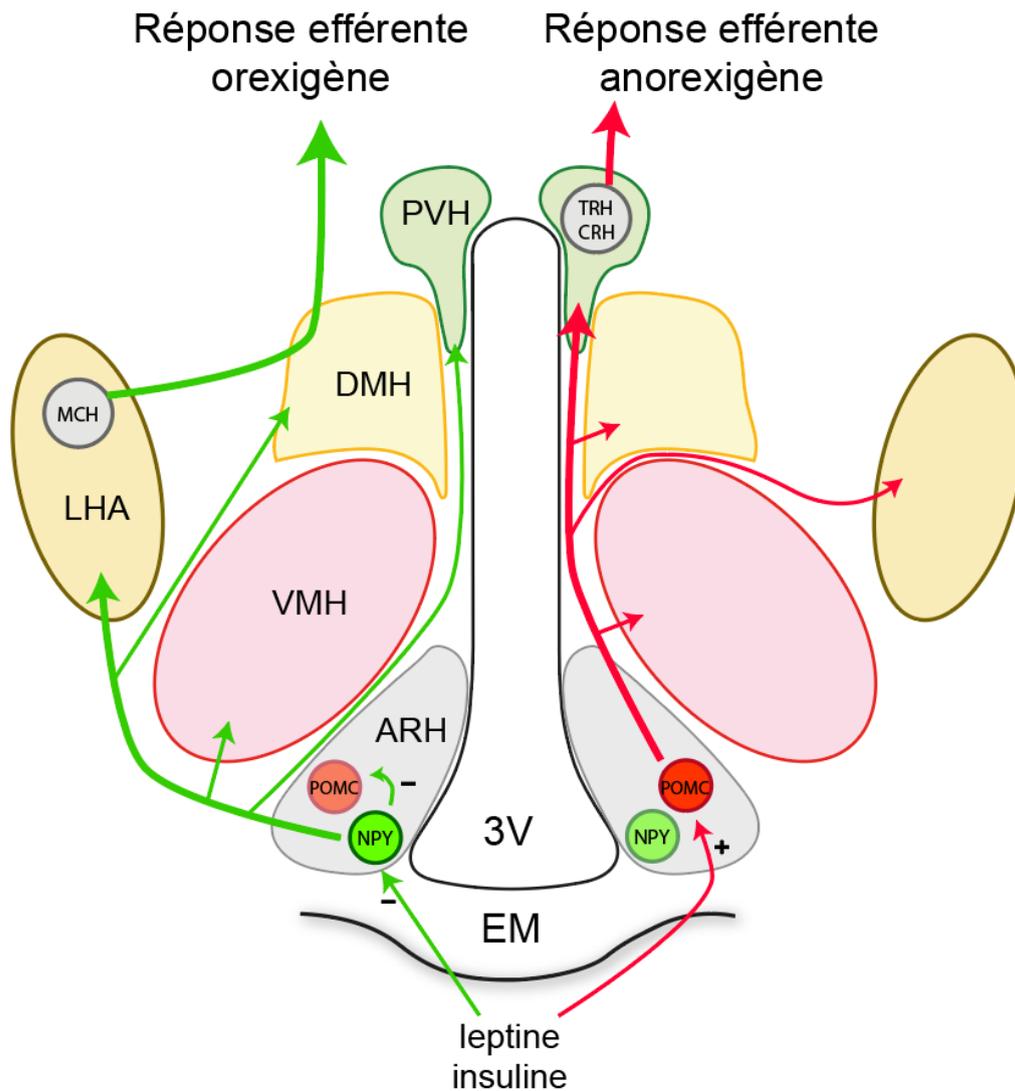


Figure 5 : Principaux circuits hypothalamiques impliqués dans l'induction d'une réponse centrale aux signaux d'adiposité

Les signaux d'adiposité (leptine ; insuline) atteignent le noyau arqué (ARH) via l'éminence médiane (EM) afin d'activer leurs récepteurs localisés sur les neurones exprimant le neuro-peptide Y (NPY) et la pro-opiomélanocortine (POMC). Ces neurones sont dits de premier ordre, et projettent vers les neurones de second ordre localisés dans les autres noyaux hypothalamiques (aire latérale de l'hypothalamus (LHA) ; noyau ventro-médian (VMH) ; noyau dorso-médian (DMH) ; noyau paraventriculaire (PVH)). Ces différents circuits permettent d'induire une réponse orexigène (flèches vertes) ou anorexigène (flèches rouges). Les signaux d'adiposité inhibent les circuits orexigènes et activent les circuits anorexigènes, menant à une diminution de la prise alimentaire et favorisant la dépense énergétique.

1.2.3. Le noyau arqué

La localisation stratégique de l'ARH à l'interface avec le LCR circulant dans le 3V et l'éminence médiane (EM) (cf. « Caractéristiques des organes circumventriculaires ») lui permet un accès privilégié aux hormones métaboliques circulantes telles que la leptine et la ghréline (Ciofi et al. 2009). Toutefois, L'accès des molécules périphériques à l'ARH est limité d'une part par la BHE et d'autre part par les barrières physiologiques présentes

aux interfaces EM/LCR et EM/ARH (cf. « 2.3. Les barrières physiologiques permettant de contrôler l'accès des molécules circulantes au noyau arqué »).

Il a été montré que l'ARH joue un rôle crucial dans la réponse anorexigène induite par la leptine. En effet, alors que des injections intra-cérébro-ventriculaires de leptine dans l'ARH conduisent à une diminution de la prise alimentaire (Satoh et al. 1997), des animaux chez qui l'ARH a été détruit ne perdent pas de poids malgré l'injection intra-cérébro-ventriculaires de leptine (Dawson et al. 1997; Tang-Christensen et al. 1999). Une étude a répertorié l'ensemble des neurones exprimés dans l'hypothalamus grâce à une technique de séquençage de cellule unique (Campbell et al. 2017). Parmi ces différentes populations neuronales, nous retrouvons tout particulièrement les neurones à NPY, les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC), et les neurones à tyrosine hydroxylase qui participent toutes les trois à la régulation de l'homéostasie énergétique.

Deux populations neuronales aux effets antagonistes ont été identifiées au sein de l'ARH : les neurones co-exprimant le NPY et le peptide associé à l'agouti (AgRP) (Hahn et al. 1998) et les neurones co-exprimant la POMC et le transcrit régulé par la cocaïne et l'amphétamine (CART) (Elias et al. 1998).

Ces neurones expriment des récepteurs pour les hormones métaboliques circulantes. En particulier, le récepteur à la ghréline est exprimé quasiment exclusivement par les neurones à NPY/AgRP de l'ARH. En effet, une étude basée sur la co-expression des neuropeptides NPY ou POMC avec l'ARNm codant pour le GHS-R1a montre que ce récepteur est exprimé dans $94 \pm 1\%$ des neurones NPY contre seulement $8 \pm 2\%$ des neurones POMC (Willesen, Kristensen, and Rømer 1999). Les récepteurs à l'insuline et à la leptine sont quant à eux exprimés à la fois par les neurones NPY/AgRP et POMC/CART (Baskin et al. 1999; Benoit et al. 2002; Cheung, Clifton, and Steiner 1997).

La leptine est largement décrite comme médiant son effet anorexigène *via* la fixation à son récepteur exprimé à la surface des neurones POMC/CART. La fixation de la leptine induit l'expression des neuropeptides CART et POMC, et le clivage de la POMC mène à la production de nombreux peptides, dont l'hormone stimulant les mélanocytes (α -MSH). Ce peptide se fixe sur le récepteur 4 de la mélanocortine (MC4R), présent à la surface des neurones POMC mais également des neurones du PVH, et active le circuit catabolique permettant la dépense énergétique et la diminution de la prise alimentaire

(voir le paragraphe « L'hypothalamus : un centre intégrateur majeur dans la régulation de la prise alimentaire).

La présence du récepteur à la leptine également à la surface des neurones NPY/AgRP suggère que cette hormone agit aussi sur cette population neuronale. Des expériences électrophysiologiques montrent effectivement que l'ajout de leptine dans la chambre d'enregistrement stimule l'entrée de calcium dans les neurones à POMC et la freine dans les neurones à NPY (Wang et al. 2008). L'ajout de leptine induit également la dépolarisation et l'augmentation de la fréquence de décharge de potentiels d'action des neurones à POMC alors qu'elle inhibe les neurones à NPY (Cowley et al. 2001; Van Den Top et al. 2004). Des données plus récentes viennent appuyer l'importance de l'inhibition des neurones à NPY par la leptine, et placent même les neurones à NPY comme première cible de la leptine (Xu et al. 2018).

Les neurones NPY/AgRP expriment aussi les récepteurs à la ghréline contrairement aux neurones POMC/CART qui ne l'expriment pas ou très peu (Willesen et al. 1999). Cela suggère que l'action de la ghréline est médiée principalement par les neurones à NPY. Notamment, il a été montré que la destruction ciblée des neurones AgRP/NPY de l'ARH par la toxine diphtérique injectée à des souris génétiquement modifiées exprimant le récepteur à cette toxine supprimait l'effet orexigène de la ghréline (Luquet, Phillips, and Palmiter 2007). De plus, la ghréline est à l'origine d'une augmentation de calcium intracellulaire dans les neurones NPY (Kohno et al. 2003) et stimule la production des neuropeptides NPY et AgRP par ces neurones (Kamegai et al. 2001). Cela suggère que ces deux neuropeptides médient l'action orexigène de la ghréline.

Cette hypothèse a été largement confirmée. En effet, l'expression ubiquitaire de l'ADN complémentaire (ADNc) de l'AgRP humain chez des souris transgéniques grâce au promoteur de l'actine bêta provoque l'hyperphagie et l'obésité chez ces animaux (Ollmann et al. 1997). Parallèlement, l'injection intra-cérébro-ventriculaire de vecteurs viraux induisant la surexpression des neuropeptides NPY et AgRP dans les neurones du PVH et de la LHA mène à une augmentation de la prise alimentaire et du poids corporel chez ces animaux (De Backer, La Fleur, and Adan 2011; Tiesjema et al. 2007). Il a également été observé que l'injection intra-cérébro-ventriculaire aigue d'AgRP (Rossi et al. 1998) ou de NPY (Glenn Stanley et al. 1986) augmente la prise alimentaire et que l'injection intra-cérébro-ventriculaire chronique de NPY entraîne l'obésité (Glenn Stanley

et al. 1986).

Les neuropeptides AgRP et NPY sous-tendent l'action orexigène de la ghréline de deux façons différentes. Alors que l'AgRP est un antagoniste du MC4R et bloque de ce fait la fixation de l' α -MSH sur celui-ci, le NPY induit l'expression des neuropeptides orexigènes MCH et les orexines par les neurones de la LHA.

Récemment, une population de neurones localisés dans l'ARH, les neurones à tyrosine hydroxylase (TH) ont été identifiés comme jouant un rôle dans la prise alimentaire. Notamment, ces neurones expriment le récepteur à la ghréline, et médient l'effet orexigène de la ghréline (Pirnik et al. 2014; Zhang and Van Den Pol 2016).

En résumé, l'initiation de la prise alimentaire est due à une baisse transitoire de l'hypoglycémie et un pic de sécrétion de ghréline précédant les repas. L'ensemble des signaux satiétogènes biochimiques et mécaniques générés par l'arrivée du bol alimentaire dans l'estomac informent le complexe vagal dorsal localisé dans le tronc cérébral *via* le nerf vague et induisent l'arrêt de l'alimentation, contrôlant ainsi la taille des repas à court terme. En parallèle, les signaux d'adiposité informent l'hypothalamus de l'état des réserves de l'organisme. Celui-ci communique avec le complexe vagal dorsal pour adapter les réponses métaboliques à court et long terme. Il a été démontré que l'action des molécules périphériques au niveau du SNC est nécessaire à la régulation fine de la balance énergétique et l'induction d'une réponse adaptée pour le maintien de cet équilibre. En particulier, les effets antagonistes de la ghréline et de la leptine se complètent, et leur signal est intégré au niveau de l'ARH, plus précisément par les neurones NPY/AgRP et POMC/CART. L'accès de ces hormones métaboliques circulantes aux neurones de l'ARH est donc un préalable essentiel au maintien de l'homéostasie énergétique. Nous nous attacherons dans la partie suivante à décrire les différentes voies d'accès possibles pour ces hormones à l'ARH. En particulier, nous décrirons la régulation stricte de l'entrée des molécules, au sein du cerveau, par la barrière hémato-encéphalique (BHE) et nous présenterons les portes d'accès spécifiques qui permettent de contourner la BHE.

2. Communication entre cerveau et périphérie

La régulation de la prise alimentaire, décrite dans la partie précédente, est un exemple illustrant l'importance majeure de la communication entre le cerveau et la périphérie pour la fine régulation des fonctions physiologiques. Pourtant, le cerveau est isolé du reste de la périphérie par BHE, et les échanges entre cerveau et périphérie sont fortement contrôlés.

2.1. La barrière hémato-encéphalique

Ce sont les travaux de Paul Ehrlich en 1885 qui mettent pour la première fois en évidence la notion d'une structure protectrice propre au cerveau. Il a constaté qu'après l'injection intrapéritonéale d'un colorant vital chez la souris, seuls les organes périphériques étaient colorés et non le cerveau. Il faudra cependant attendre les travaux d'Edwin Goldmann en 1909 et 1913 pour confirmer l'existence d'une barrière entre le cerveau et la périphérie grâce à l'injection de bleu Trypan dans un premier temps dans la circulation sanguine en périphérie puis dans le LCR. En effet, l'injection de ce colorant dans la circulation sanguine a induit la coloration de tous les organes à l'exception du cerveau, alors que lors de son injection dans le liquide cébrospinal, seul le cerveau a été coloré par le bleu Trypan.

Le terme de « barrière hémato-encéphalique » fait sa première apparition dans la littérature en 1900 avec Lewandowski, bien que la localisation plus précise des jonctions serrées à l'origine de la BHE au niveau des capillaires sanguins n'ait été découverte que des décennies plus tard (Reese and Karnovsky 1967).

La BHE est généralement décrite comme une interface dynamique permettant de préserver l'homéostasie du milieu cérébral et de protéger le SNC en contrôlant les échanges de la périphérie vers celui-ci et inversement. C'est pourquoi son intégrité structurale et fonctionnelle est fondamentale pour garantir le bon fonctionnement des neurones et cellules gliales. A l'appui de ce propos, il a été démontré que la disruption de la BHE est impliquée dans de nombreuses pathologies neurologiques, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson la sclérose en plaque ou encore la sclérose latérale amyotrophique (Zlokovic 2008).

2.1.1. Structure de la barrière hémato-encéphalique

Les capillaires cérébraux sont le support de la BHE. Toutefois, les cellules endothéliales de ces capillaires forment des interactions avec les cellules gliales et les neurones du SNC, et ces interactions sont cruciales pour la mise en place et le maintien de la BHE. En 2001 est né le concept d'unité neuro-glio-vasculaire (UNGV), dans le but de mettre en valeur cette relation unique entre ces acteurs vasculaires, gliaux et neuronaux (Stroke 2001). L'UNGV est composé successivement par les cellules endothéliales, les péricytes, la membrane basale, les astrocytes et les neurones (Zlokovic 2008) (*Figure 6*).

Les cellules endothéliales des capillaires sanguins cérébraux appartenant à la BHE possèdent certaines caractéristiques qui les différencient des autres cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins périphériques. Elles possèdent des complexes jonctionnels, permettant à la fois de limiter la diffusion paracellulaire des molécules, mais également de maintenir la polarisation de ces cellules endothéliales. Elles ne possèdent pas non plus de fenestrations (*Figure 6*). Le rôle de barrière physique de la BHE est de ce fait principalement assumé par ces jonctions. Il en existe plusieurs sortes, les principales étant les jonctions serrées et les jonctions adhérentes. Celles-ci se succèdent dans un ordre précis (Bazzoni and Dejana 2004) et font intervenir l'interaction entre des protéines transmembranaires et cytosoliques liées entre elles et au réseau d'actine composant le cytosquelette de la cellule (Hawkins and Davis 2005; Huber, Egleton, and Davis 2001; Wolburg et al. 1994).

Les jonctions serrées sont particulièrement importantes et font intervenir trois protéines intégrales, à savoir la claudine, l'occludine et les molécules d'adhésion de jonctions, ainsi que diverses protéines cytoplasmiques accessoires dont les zonula occludens (ZO). Il existe trois isoformes de ZO : ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Parmi elles, ZO-1 fut la première identifiée (Stevenson et al. 1986). De plus, elle est particulièrement importante pour l'intégrité du complexe jonctionnel de la BHE puisqu'en son absence, la perméabilité endothéliale est augmentée (Abbruscato et al. 2002; Fischer et al. 2002; Mark and Davis 2002).

Les péricytes entourant les cellules endothéliales ainsi que les cellules endothéliales produisent respectivement la membrane basale externe et interne. Principalement composé de collagène de type IV, laminine et fibronectine, ce dépôt de matrice extracellulaire (MEC) forme une structure tridimensionnelle fournissant un support aux cellules endothéliales. Ce rôle est d'une importance cruciale pour le maintien de

l'intégrité de la BHE, dans la mesure où la digestion de cette membrane basale par des métalloprotéases ou collagénases induit l'apparition de pathologies occasionnées par la disruption de la BHE, comme par exemple l'œdème cérébral (Gasche et al. 2006).

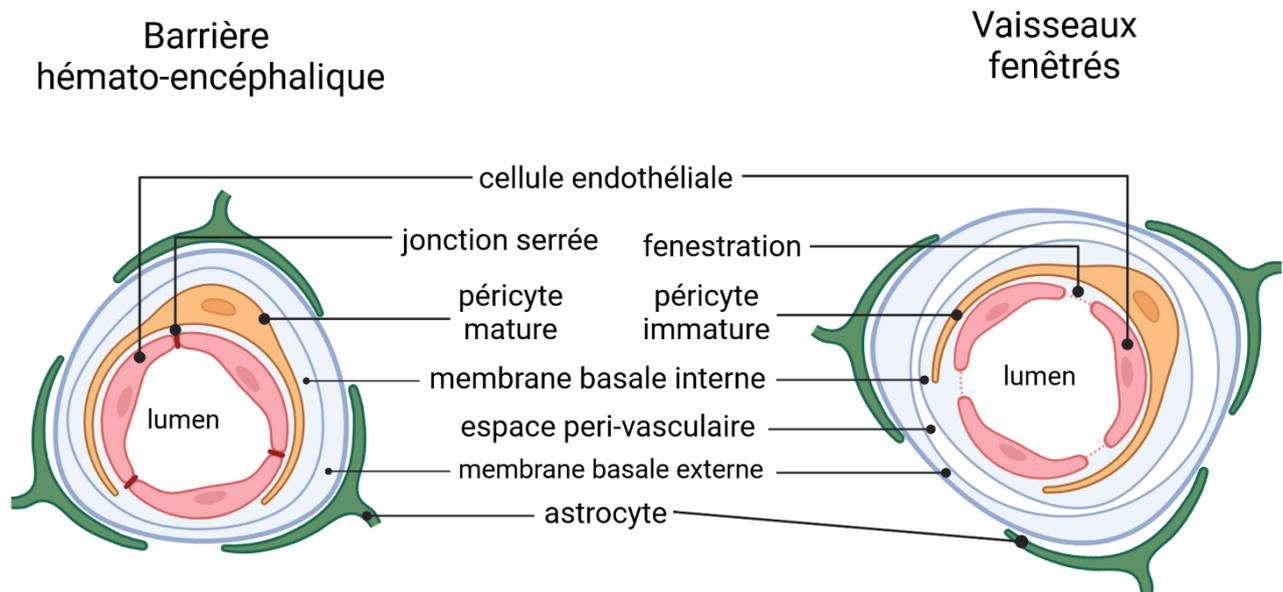


Figure 6 : Comparaison de la structure d'un vaisseau sanguin de la barrière hémato-encéphalique et d'un vaisseau fenêtré

La caractéristique principale des vaisseaux de la barrière hémato-encéphalique est l'expression de jonctions serrées entre les cellules endothéliales, empêchant la diffusion para-cellulaire des molécules circulantes du lumen du vaisseau vers l'extérieur du vaisseau. En revanche, les vaisseaux fenêtrés n'expriment pas ces jonctions serrées, et les fenestrations entre les cellules endothéliales favorisent la diffusion passive des molécules depuis le lumen vers l'extérieur du vaisseau.

2.1.2. Rôles de la barrière hémato-encéphalique

La BHE a donc un rôle de protection du SNC, notamment contre des neurotoxines provenant de la nourriture, de traitements pharmaceutiques ou de notre environnement et qui pourraient circuler en périphérie. Cette fonction est d'autant plus indispensable qu'à l'âge adulte, la capacité du SNC à se régénérer est limitée dans la mesure où la neurogenèse n'existe que dans de rares niches (Lim, Huang, and Alvarez-Buylla 2007).

La BHE permet donc de contrôler la diffusion des molécules. En effet, de nombreuses molécules sont communes au cerveau et à la périphérie. La BHE permet donc d'éviter un phénomène de diaphonie (Bernacki et al. 2008), i.e. d'interférence de deux signaux entre eux.

Enfin, la BHE permet de maintenir l'homéostasie ionique du SNC, mais permet également les échanges nécessaires à la survie des neurones comme le dioxygène ou

certains nutriments comme le glucose, principale source d'énergie neuronale. Cette diffusion peut se faire de façon passive pour certains nutriments. Pour les autres nutriments ou certains ions, des transporteurs ou canaux spécifiques assurent un approvisionnement adéquat au SNC. De plus, l'expression de ces transporteurs ou canaux aux surfaces basale (luminale) et apicale des cellules endothéliales contribue au maintien de leur polarité (Abbott, Rönnbäck, and Hansson 2006; Wolburg et al. 2009). Les hormones périphériques telles que la leptine, l'insuline ou la ghréline doivent rejoindre l'ARH où sont exprimés leurs récepteurs afin d'induire une réponse centrale permettant d'adapter le comportement de l'individu pour le maintien de l'équilibre énergétique. Bien que la BHE restreigne la libre diffusion des molécules afin de protéger le tissu cérébral, un système de transport saturable impliquant les récepteurs de la leptine (Banks et al. 1996), de l'insuline (Baura et al. 1993) ainsi que de la ghréline (Banks et al. 2002) permet le passage de ces hormones métaboliques vers l'ARH. Toutefois, ces mécanismes de transport permettant l'accès au cerveau de la leptine, l'insuline et la ghréline ne sont pas uniquement présents au niveau de l'ARH mais à travers l'ensemble du SNC (Banks 2008).

Il existe toutefois des régions cérébrales où la BHE est interrompue (*Figure 6*), facilitant ainsi les échanges entre la périphérie et le SNC indispensables à la régulation de nombreuses fonctions physiologiques : il s'agit de la plupart des organes circumventriculaires.

2.2. Les organes circumventriculaires : une porte d'accès directe vers le SNC

2.2.1. Caractéristiques des organes circumventriculaires

Les organes circumventriculaires (OCVs) sont des structures neuro-épithéliales spécialisées localisées à proximité des 3V et 4V, facilitant la communication entre le SNC et la périphérie. Ces structures partagent la particularité d'être richement vascularisées par un dense réseau de capillaires dont les cellules endothéliales n'expriment pas ZO-1 (Mullier et al. 2010; Petrov et al. 1994; Wislocki and King 1936; Wislocki and Leduc 1952), à l'exception de l'organe subcommissural (Rodriguez, Rodriguez, and Hein 1998). En revanche, ces vaisseaux expriment des marqueurs de fenestration endothéliales. Ces fenestrations endothéliales, qui facilitent la diffusion passive des molécules périphériques vers le SNC, ont valu aux OCVs la dénomination de « fenêtres du cerveau » (Gross and Weindl 1987).

Des cellules épendymogliales spécialisées – telles que les tanocytes ou les pituicytes – sont également présentes dans les OCVs et bordent les ventricules. Il s'agit de cellules bipolaires dont l'unique prolongement vient au contact des capillaires sanguins irriguant l'OCV (Krisch, Leonhardt, and Buchheim 1978) ainsi que des terminaisons neuronales présentes dans le parenchyme de l'EM (Clasadonte and Prevot 2018). Il a également été montré l'existence de jonctions serrées entre elles, notamment au niveau du corps cellulaire des tanocytes de l'EM (cf. La barrière à l'interface entre l'éminence médiane et le liquide céphalo-rachidien). Enfin, de par leur localisation, les OCVs forment une interface privilégiée à la fois entre le sang et le SNC, mais également entre le SNC et le LCR (Guerra et al. 2015; Joly et al. 2007).

Il existe 7 OCVs, dont l'area postrema et l'EM mentionnés précédemment. Selon leurs rôles, ils sont divisés en deux catégories : les OCVs sensoriels et les OCVs sécréteurs. Comme leur nom l'indique, les OCVs sensoriels – tels que l'area postrema - captent les molécules périphériques circulantes afin de transmettre l'information au sein du SNC qui induira alors une réponse appropriée, alors que les OCVs sécréteurs – tels que l'EM – assurent le transfert des protéines produites par les neurones dans la circulation sanguine. Toutefois, malgré sa classification, il a été montré que l'EM est également définie comme une porte d'accès de la périphérie vers le cerveau, permettant la diffusion passive des molécules circulantes périphériques vers le parenchyme de l'EM, facilitant de ce fait leur accès au cerveau (Prevot et al. 2018).

2.2.2. L'area postrema

L'area postrema est la première structure à avoir été définie comme un OCV (Wilson 1906). De tous les OCVs, l'area postrema est le seul localisé à proximité du 4V et non du 3V et se trouve au niveau du tronc cérébral. Classé parmi les OCVs sensoriels (Fry and Ferguson 2007), sa localisation très caudale lui fait jouer un rôle crucial dans le contrôle des fonctions autonomes par le SNC, dont le métabolisme (cf. « Régulation à court terme de la prise alimentaire »). La présence de corps cellulaires neuronaux dans le parenchyme de l'area postrema permet à ces derniers d'être en contact direct avec les molécules circulantes (Dempsey 1973). Longtemps considérée comme une structure capable de détecter des molécules périphériques toxiques, à l'origine du réflexe émétique et permettant simplement le relais de l'information vers d'autres structures plus intégrées du SNC (Borison and Brizzee 1951; Carpenter, Briggs, and Strominger 1983; Miller and Leslie 1994), des recherches plus récentes suggèrent également que

l'area postrema joue un rôle d'intégration des signaux métaboliques périphériques. Toutefois, comme détaillé précédemment (cf. « Le tronc cérébral : un centre intégrateur à part entière dans la régulation de la prise alimentaire »), les signaux intégrés par l'area postrema sont essentiellement satiétogènes, permettant le contrôle à court terme de la prise alimentaire. En ce qui concerne la régulation à long terme de la prise alimentaire et donc du maintien de l'équilibre de la balance énergétique, les signaux périphériques sont plutôt intégrés au niveau de l'hypothalamus (cf. « L'hypothalamus : un centre intégrateur majeur dans la régulation de la prise alimentaire » et « Le noyau arqué »).

L'EM, considérée comme une véritable porte de communication vers l'hypothalamus et plus précisément l'ARH, joue donc un rôle clé pour l'intégration de ces signaux.

2.2.3. L'éminence médiane

A l'interface entre l'ARH et le 3V, l'EM est située à un carrefour stratégique pour la régulation de nombreuses fonctions physiologiques, dont le contrôle de l'homéostasie énergétique. L'EM est limitée dorsalement par les tanocytes bordant le plancher du 3V. Elle présente latéralement une frontière commune avec l'ARH et est richement vascularisée dans sa partie ventrale (Green and Harris 1947). Ces capillaires expriment des marqueurs de fenestration, à savoir MECA-32 chez la souris (Schulz and Engelhardt 2005) et PV-1 chez le rat (Ciofi et al. 2009).

L'EM fait partie des OCVs sécréteurs (Fry and Ferguson 2007), et permet donc la libération dans la circulation sanguine des peptides sécrétés par les neurones de l'hypothalamus. Ainsi, de nombreuses terminaisons axonales de neurones sont retrouvées dans le parenchyme de l'EM et sont donc en contact direct avec les vaisseaux sanguins fenêtrés de l'EM. Les peptides sécrétés sont de ce fait directement pris en charge par le réseau vasculaire fenêtré. En revanche, les corps cellulaires de ces neurones sont localisés dans l'ARH, où les capillaires présentent les caractéristiques de la BHE et sont donc protégés des molécules périphériques circulantes.

La vascularisation par les capillaires fenêtrés bordant ventralement l'EM facilite également le passage des molécules de la périphérie vers le cerveau. Cette communication de la périphérie vers le cerveau est absolument indispensable pour la régulation fine de nombreuses fonctions physiologiques, dont la prise alimentaire comme décrit en première partie de cette introduction. Mais si les molécules périphériques circulantes peuvent librement diffuser dans le parenchyme de l'EM, les mécanismes permettant l'accès de ces molécules au cerveau, et plus particulièrement à l'ARH, ne

sont pas complètement élucidés.

2.3. Les barrières physiologiques permettant de contrôler l'accès des molécules circulantes au noyau arqué

Bien que les capillaires délimitant ventralement l'EM soient fenêtrés et ne présentent pas de jonctions serrées propres à la BHE, facilitant ainsi la diffusion des molécules de la périphérie vers le parenchyme de l'EM, d'autres mécanismes existent afin de contrôler l'accès de ces molécules au SNC.

Différentes expériences consistant en l'injection de traceurs colorés tels que le bleu Evans ou le bleu Trypan (Mullier et al. 2010; Rodriguez 1976) ou de la peroxydase de raifort (HRP) (Krisch et al. 1978) dans la circulation sanguine montrent que ces traceurs sont libres de diffuser largement dans le parenchyme de l'EM. Toutefois, ces mêmes marqueurs restent bloqués dans le parenchyme de l'EM, sans diffuser vers l'ARH. A l'inverse, lorsque le traceur est injecté dans le LCR du 3V ou directement dans l'ARH, il ne diffuse que dans l'ARH, sans atteindre l'EM ou d'autres noyaux hypothalamiques. Ces expériences mettent donc en évidence l'existence de deux barrières physiologiques, l'une séparant le parenchyme de l'EM et l'ARH, et l'autre à l'interface entre le LCR du 3V et le parenchyme de l'EM (Figure 7).

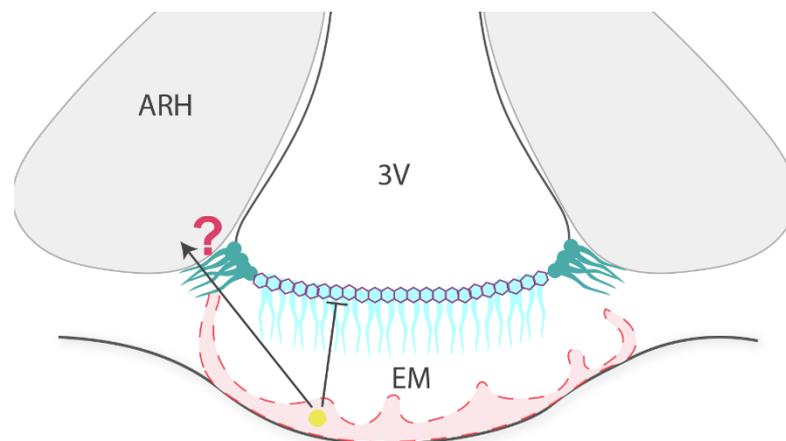


Figure 7 : Les barrières physiologiques de l'éminence médiane

La diffusion passive des molécules périphériques (disque jaune) dans le parenchyme de l'éminence médiane (EM) est facilitée par les fenestrations des capillaires fenêtrés bordant ventralement l'EM (schématisé en rouge clair, bordure rouge pointillée). Des études suggèrent que les jonctions serrées (hexagones violets) présents entre les cors cellulaires des tancocytes bordant le plancher du troisième ventricule (3V) (bleu clair) limitent la diffusion des molécules du parenchyme de l'EM vers le 3V. La nature de la barrière de diffusion à la frontière entre l'EM et le noyau arqué (ARH) n'est pas connue à ce jour. Quelques études proposent un rôle des tancocytes $\beta 1$ (bleu foncé) dans l'établissement de cette barrière.

2.3.1. La barrière à l'interface entre l'éminence médiane et le liquide céphalo-rachidien

L'injection intra-cérébro-ventriculaire de bleu Evans induit la diffusion de ce traceur au sein de l'ARH sans qu'il atteigne le parenchyme de l'EM, ce qui révèle l'existence d'une barrière entre le LCR circulant dans le 3V et l'EM (Mullier et al. 2010) (Figure 8).

Le mécanisme moléculaire à l'origine de cette barrière entre l'EM et le LCR repose sur l'existence de jonctions serrées entre les cellules à cette interface. En effet, dans les OCVs, la protéine ZO-1 a été détectée au niveau des cellules épendymaires (Petrov et al. 1994; Smith and Shine 1992). Plus particulièrement dans le cas de l'EM, l'expression de la protéine ZO-1 a été mise en évidence entre les corps cellulaires des tanocytes bordant le plancher du 3V (Langlet et al. 2013; Mullier et al. 2010). Ces jonctions serrées pourraient empêcher la diffusion paracellulaire des molécules entre les tanocytes (Figure 7) et parallèlement pourraient maintenir la polarité des tanocytes. Cette polarité tanocytaire permettrait une prise en charge des molécules par ces cellules et favoriserait leur transport orienté. En effet, il a été décrit que la leptine et la ghréline pouvaient accéder à l'ARH *via* transcytose par les tanocytes (Balland et al. 2014; Collden et al. 2015; Duquenne et al. 2021).

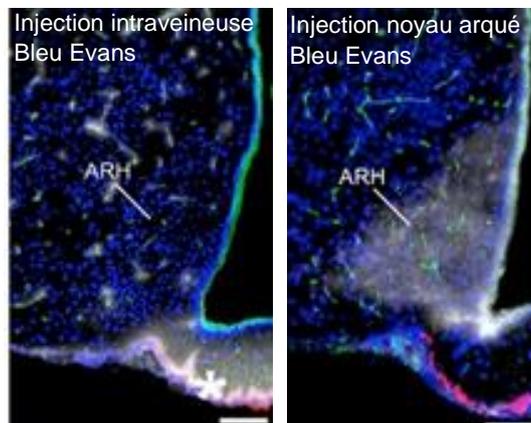


Figure 8 : Visualisation de la barrière de diffusion à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH)

L'injection du traceur bleu Evans (en blanc) soit par voie intraveineuse (panneau de gauche) soit directement au niveau de l'ARH (à droite) permet de visualiser la barrière bidirectionnelle de diffusion existant à la frontière entre l'EM et l'ARH. En effet, lorsque le traceur est injecté par voie intraveineuse, il diffuse dans le parenchyme de l'EM mais pas vers l'ARH, alors que lorsqu'il est injecté au niveau de l'ARH, le traceur diffuse au sein de l'ARH mais pas vers le parenchyme de l'EM (Figure issue de Mullier et al., 2010)

2.3.2. La barrière à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué

L'EM partageant une frontière tissulaire avec l'ARH, il est envisageable que les molécules circulantes ayant gagné le parenchyme de l'EM puissent diffuser au sein de l'ARH.

2.3.2.1. Mise en évidence de la barrière entre l'éminence médiane et le noyau arqué

- ***Par l'injection de traceurs chimiques***

Chez la souris, l'injection de bleu Evans (Campbell et al. 2017; Jiang et al. 2020; Mullier et al. 2010; Rodríguez-Cortés et al. 2022) ou de bleu Trypan (Rodríguez, Blázquez, and Guerra 2010) par la voie intraveineuse montre que ces traceurs diffusent dans le parenchyme de l'EM sans atteindre l'ARH, mettant ainsi en évidence l'existence d'une barrière de diffusion des molécules à la frontière entre ces deux structures. De plus, l'injection du bleu Evans dans le 3V (Mullier et al. 2010) ou du bleu Trypan (Rodríguez et al. 2010) dans l'ARH montre la diffusion de ces traceurs au sein de l'ARH, sans atteindre le parenchyme de l'EM ni les autres noyaux hypothalamiques, montrant que cette barrière de diffusion à la frontière entre l'EM et l'ARH est bidirectionnelle (Figure 8).

Il est à noter que, chez le rat, l'injection d'acide α -amino-isobutyrique (103 Daltons) radiomarké au carbone 14 conduit à la diffusion de cette molécule dans le parenchyme de l'EM, mais également au niveau de l'ARH (Shaver et al. 1992). De même, chez le rat, la fluorescéine de sodium (332 Daltons) est capable d'atteindre l'ARH après son injection intraveineuse (Natah et al. 2005). D'autre part, l'injection intracardiaque de fluorescéine chez le rat induit une accumulation de ce composé dans l'EM et une diffusion légère dans l'ARH (Martinez and Koda 1988). Ces données suggèrent que la barrière de diffusion des molécules à la frontière entre l'EM et l'ARH pourrait présenter des propriétés différentes entre les espèces. Il faut cependant rester prudent sur cette conclusion car les concentrations de traceurs injectés varient fortement d'une étude à l'autre tout comme les méthodes de préparation des tissus pouvant conduire à de mauvaises interprétations des résultats.

- ***Par l'injection de protéines***

L'injection intraveineuse d'HRP chez la souris aboutit à sa diffusion dans le parenchyme de l'EM et à son blocage à la frontière avec l'ARH. Inversement, son injection intra-cérébro-ventriculaire conduit à sa diffusion dans le parenchyme cérébral

sans qu'elle n'atteigne l'EM. Il faut néanmoins noter que ce blocage de la HRP est dépendant de la concentration de protéine infusée puisque l'injection intraventriculaire de cinq fois plus de protéine conduit à sa diffusion dans l'EM (Broadwell et al. 1983).

- ***Par l'injection de nutriments***

L'injection intraveineuse de 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG) – un analogue fluorescent du glucose – conduit à sa diffusion dans le parenchyme de l'EM et à son blocage à la frontière entre l'EM et l'ARH (Rodríguez-Cortés et al. 2022).

- ***Par détection de molécules circulantes endogènes***

La détection de l'immunoglobuline G (IgG), une molécule circulante endogène de poids moléculaire élevé (150 kDa), a été retrouvée abondamment à la frontière entre l'EM et l'ARH chez le rat (Natah et al. 2005). Chez la souris, une étude similaire réalisée après perfusion ou non des tissus montre une accumulation d'IgG dans le parenchyme de l'EM (Ciofi 2011). Nos travaux ont analysé la diffusion de l'albumine endogène circulante dans cette région chez la souris et ont montré son blocage à la frontière entre l'EM et l'ARH (Kuczynski et al., soumis).

2.3.2.2. Quelques propriétés de la barrière de diffusion à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué

- ***Le blocage des molécules circulantes à la frontière EM/ARH est-il dépendant de leur poids moléculaire ?***

Une question légitime s'est alors posée sur la possibilité d'un blocage des molécules en fonction de leur poids moléculaire à la frontière EM/ARH. Des études relativement récentes se sont attachées à élucider cette question en injectant des traceurs de tailles variables afin d'étudier leur diffusion (Morita and Miyata 2012, 2013). La diffusion de traceurs de poids moléculaires variables : l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC ; 389 Da) (Morita and Miyata 2012, 2013), du bleu Evans (961 Da) (Morita and Miyata 2012, 2013), de Dextrans de 3 et 10 kDa couplés à un fluorophore (Morita and Miyata 2013), de l'albumine sérique bovine couplée au FITC (environ 68 kDa) (Morita and Miyata 2012) et du Dextran 70 kDa couplé au FITC (Morita and Miyata 2012) a été évaluée. Les résultats de ces expériences suggèrent que les molécules de faible poids moléculaire telles que le FITC ou le bleu Evans, injectés par perfusion trans-cardiaque, diffusent dans

le parenchyme de l'EM suivant un gradient de diffusion, les molécules étant fortement concentrées dans la zone externe proche des capillaires sanguins, et étant de moins en moins concentrées en se rapprochant de la zone épendymaire à proximité du plancher du 3V. Un Dextran de 3 kDa, injecté par voie intraveineuse, reste quant à lui majoritairement bloqué dans le parenchyme de l'EM et diffuse légèrement dans la partie ventrale de l'ARH. Enfin, les molécules de haut poids moléculaires, injectées par voie intraveineuse, seraient bloquées dans l'espace peri-vasculaire (Dextran 70 kDa-FITC ; Dextran 10 kDa) ou uniquement présentes dans l'ARH et non dans le parenchyme de l'EM (BSA-FITC).

Toutefois, ces auteurs ont observé que le bleu Evans pouvait également atteindre l'ARH s'il était injecté par voie intra-péritonéale. Il est toutefois à noter que le bleu Evans possède une forte affinité pour l'albumine, une molécule plasmatique endogène d'environ 66 kDa, et a ainsi tendance à se lier à cette molécule suite à son injection (del Valle et al. 2008). La diffusion de ce traceur dans cette région cérébrale pourrait donc dépendre également de sa capacité à se fixer à l'albumine endogène. Il est également intéressant de noter qu'outre les voies d'injection des traceurs qui diffèrent d'un traceur à l'autre dans cette étude, les temps de latence entre l'injection et le sacrifice de l'animal varient également.

A ce jour, il est donc difficile de conclure quant à un blocage des molécules circulantes à la frontière entre l'EM et l'ARH dépendant de leur poids moléculaire.

Tableau 1 : Aperçu des différents traceurs utilisés pour évaluer les propriétés de diffusion des molécules en fonction de leur taille à travers la barrière à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué

Les données recueillies pour ce tableau proviennent des études de Miyata et Morita 2012 et 2013.

Traceur	Concentration	Voie d'injection	Attente entre l'injection et le sacrifice
FITC	0.1 mg/mL	Trans-cardiaque	2 minutes
Bleu Evans	10 mg/mL	Trans-cardiaque	5 minutes
Bleu Evans	10 mg/mL	Intra-péritonéale	1 heure
Dextran 3 kDa	0.4 mg/mL	Intra-veineuse	30 minutes
Dextran 10 kDa	0.8 mg/mL	Intra-veineuse	30 minutes
Dextran 70 kDa	50 mg/mL	Intra-veineuse	2 heures

- ***Le blocage des molécules circulantes à la frontière EM/ARH varie avec le rythme circadien***

Il a récemment été démontré que l'accès des molécules à l'ARH via le parenchyme de l'EM est modulé en fonction du rythme circadien. Ainsi, la diffusion du bleu Evans, injecté par voie intraveineuse, depuis l'EM vers l'ARH est minimale juste avant la phase nocturne des souris correspondant à la période active des animaux alors qu'elle est maximale à la fin de la phase active. De plus, en lésant le noyau suprachiasmatique, les auteurs ont pu mettre en évidence que celui-ci joue un rôle dans la régulation circadienne de l'accès des molécules périphérique à l'ARH (Rodríguez-Cortés et al. 2022).

2.3.2.3. Hypothèses suggérées sur le mécanisme moléculaire conduisant au blocage des molécules circulantes à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué

Plusieurs hypothèses ont été émises quant à la nature de la barrière séparant le parenchyme de l'EM et l'ARH, impliquant notamment les tanocytes $\beta 1$ dont les prolongements délimitent la frontière entre l'EM et l'ARH. (*Figure 7*).

- ***Rôle éventuel de jonctions intercellulaires à la frontière entre l'EM et l'ARH***

Des études en microscopie électronique ont mis en évidence la présence de jonctions d'adhérence au niveau des processus des tanocytes $\beta 1$, ainsi que la présence ponctuelle de jonctions serrées le long des extensions tanocytaires (*Figure 9*). D'autre part, des jonctions serrées ont également été identifiées entre les tanocytes et les axones neurosécréteurs présents dans cette région cérébrale (Rodríguez et al. 2010). L'existence de ces différentes jonctions intercellulaires serait en faveur d'un blocage de diffusion des molécules dans cette région cérébrale. Toutefois, pour assurer un blocage de diffusion des molécules efficace, les jonctions intercellulaires devraient être organisées de façon continue le long des extensions tanocytaires tout comme au niveau des corps cellulaires des tanocytes bordant le plancher de 3V. Or, les jonctions serrées retrouvées au niveau des extensions des tanocytes $\beta 1$ à la frontière entre l'EM et l'ARH ne sont pas fréquentes. Il semble donc peu probable que ces dernières puissent justifier du blocage de la diffusion des molécules dans cette région cérébrale.

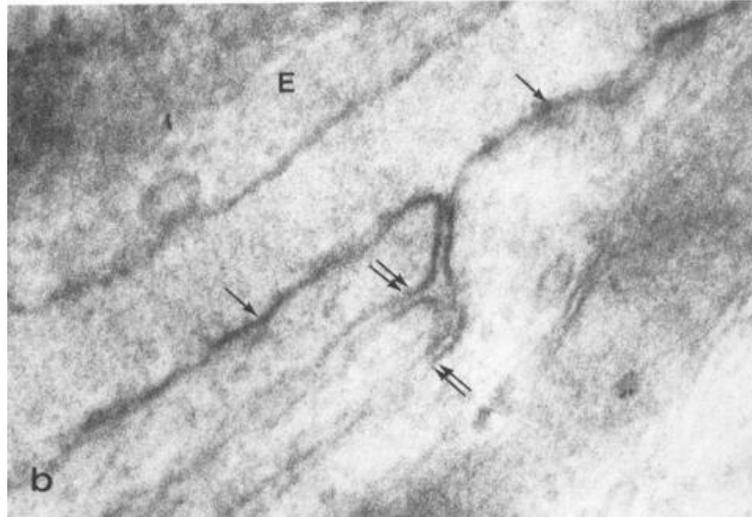


Figure 9 : Microscopie électronique à transmission d'un faisceau de processus de tanycytes $\beta 1$

Diffusion de la HRP (en noir) stoppée au niveau des jonctions entre tanycytes (doubles flèches). (Figure issue de Krisch et Leonhardt, 1978).

- **Rôle éventuel de la protéine SPRR1A**

Outre l'existence de jonctions intercellulaires entre les extensions des tanycytes $\beta 1$, cette sous-population de tanycytes est la seule à exprimer la cornifine A, ou SPRR1a (Figure 10) (Campbell et al. 2017). Cette protéine, produite également par les kératinocytes (Kartasova et al. 1996), est connue pour être réticulée aux protéines membranaires et former ainsi une enveloppe insoluble sous la membrane plasmique. Décrite pour jouer un rôle dans la barrière épithéliale, il serait envisageable que cette protéine joue un rôle dans le blocage de la diffusion des molécules précédemment observé.

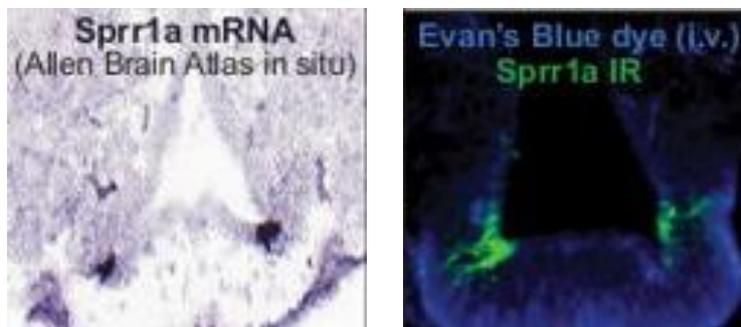
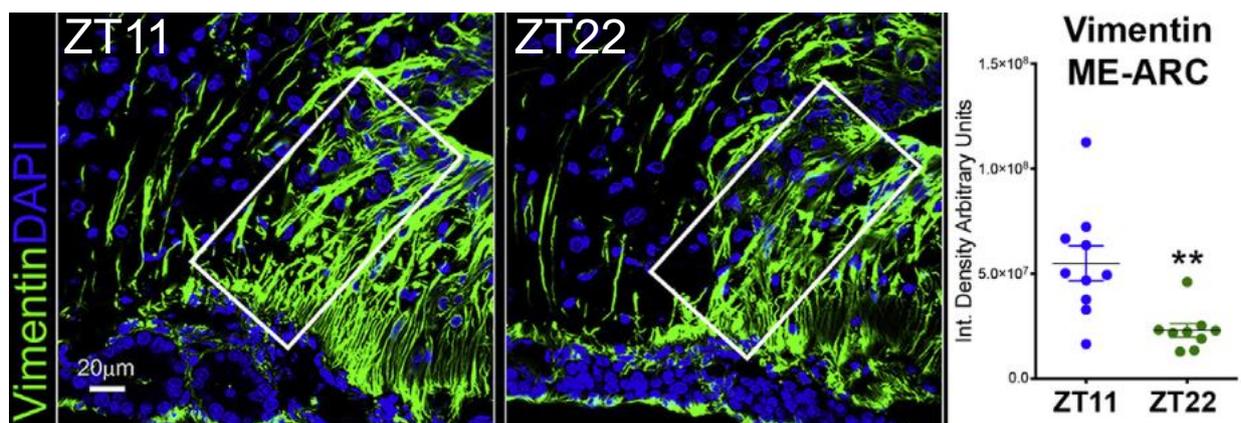


Figure 10 : Expression de la protéine SPRR1a par les tanycytes $\beta 1$

Encart gauche : Hybridation *in situ* montrant l'expression de l'ARNm codant pour la protéine SPRR1a. Cette expression est très spécifique des tanycytes $\beta 1$. Encart droit : Immunohistochimie de la protéine SPRR1a (en vert) sur une tranche de cerveau d'une souris ayant préalablement reçu une injection intraveineuse de bleu Evans (en bleu). La limite de diffusion du bleu Evans corrèle avec l'expression de la protéine SPRR1a. (Figure issue de Campbell et al., 2017)

- **Rôle éventuel de la vimentine tanycytaire**

Une autre hypothèse propose que le rôle de barrière joué par les tanocytes $\beta 1$ serait médié par la vimentine, protéine composant le cytosquelette des tanocytes. En effet, l'observation par Rodriguez-Cortès et ses collaborateurs de variation d'organisation de la vimentine dans les tanocytes $\beta 1$ au cours du rythme circadien s'accorde parfaitement avec les variations de diffusion du glucose dans cette zone cérébrale en fonction des phases nocturne et diurne (voir paragraphe « Mise en évidence de la barrière entre l'EM et l'ARH par l'injection de nutriments ») (Figure 11) (Rodríguez-Cortés et al. 2022). L'hypothèse que la vimentine puisse jouer un rôle de barrière de diffusion pour les molécules repose sur des études *in vitro* réalisées dans des cellules endothéliales (Liu et al. 2014) ou sur des travaux *ex-vivo*. Dans cette étude électrophysiologique *ex vivo*, réalisée à partir d'épithélium de vessie de lapin, il a été mis en évidence que la partie N-terminale de la vimentine peut interagir avec la membrane plasmique des cellules épithéliales, et ainsi favoriser la perméabilité aux ions d'une façon voltage-dépendante (Lewis, Traub, and Spilker 2003). Cependant, le rôle de la vimentine tanycytaire n'a, à ce jour, pas été démontré *in vivo* et reste pour l'instant une hypothèse à explorer.



- **Rôle éventuel de la MEC**

Figure 11 : Variation de la densité de la vimentine tanycytaire en fonction du rythme circadien

Les temps ZT11 et ZT22 correspondent respectivement à la fin de la phase diurne, moment où la diffusion de bleu Evans injecté par voie intraveineuse est minimale, et à la fin de la phase nocturne, moment où la diffusion du bleu Evans est maximale. La densité de l'expression de la vimentine tanycytaire (en vert) (panneau de gauche) a été évalué (panneau de droite). La diffusion maximale du bleu Evans vers le noyau arqué correspond à une diminution de la densité de la vimentine exprimée par les tanocytes. (Figure issue de Rodriguez-Cortés et al. 2022)

Indépendamment des tanocytes, d'autres hypothèses pourraient expliquer le blocage de la diffusion des molécules à la frontière entre l'EM et l'ARH. En effet, l'existence d'un dépôt de MEC apparenté au réseau peri-neuronal (PNN) (cf. « Le réseau peri-neuronal : un matrice extracellulaire particulière au cerveau) à la frontière entre l'EM et l'ARH a été démontré dans plusieurs études indépendantes (Horii-Hayashi et al. 2015; Horii-Hayashi, Sasagawa, and Nishi 2017; Mirzadeh et al. 2019; Pócsai and Kálmán 2014) (Figure 12). Ce dépôt de PNN a été décrit comme un anneau continu séparant l'EM et l'ARH (Mirzadeh et al. 2019). Dans d'autres régions cérébrales, le PNN est connu pour jouer un rôle de barrière physique rigide, empêchant la formation de nouvelles synapses ou limitant l'accès de certaines molécules au corps cellulaire des neurones qu'il entoure (Morawski et al. 2012). De ce fait, ce dépôt de PNN est une piste à explorer pour expliquer la barrière de diffusion observée entre l'EM et l'ARH et a fait l'objet de ce projet de thèse. La composition et les propriétés de ce PNN seront décrites dans le paragraphe suivant.

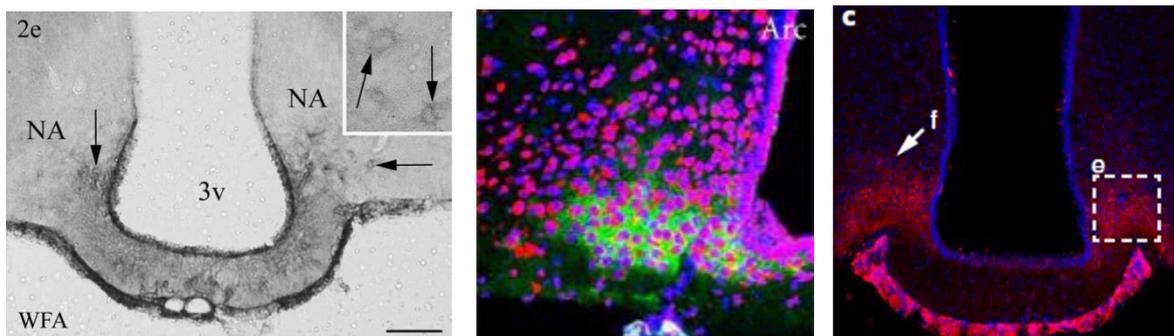


Figure 12 : Visualisation d'un dépôt de réseau peri-neuronal à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué

Les trois photos montrent un immunomarquage avec la lectine *Wisteria Floribunda Agglutinine* (WFA), permettant de visualiser le réseau peri-neuronal (PNN) (en gris ; en vert ; en rouge). Cet immunomarquage montre l'existence d'un dépôt de PNN localisé à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué. (Les figures sont respectivement issues de Pocsai et al., 2014, Horii-Hayashi et al., 2015, Mirzadeh et al., 2019)

3. Le réseau peri-neuronal : une matrice extracellulaire particulière au cerveau

La MEC est un assemblage tridimensionnel complexe de macromolécules. Elle représente 10 à 20% du volume du tissu cérébral (Cragg 1979; Nicholson and Syková 1998). On peut distinguer trois grandes catégories de MEC différentes au sein du SNC en fonction de leurs organisations :

- la lame basale – principalement composée de collagène et laminine tapissant la membrane des cellules endothéliales - ;

- la matrice extracellulaire « lâche » - globalement présente dans l'espace interstitiel du SNC et de la moelle épinière - ;
- le réseau peri-neuronal (PNN) - une structure tridimensionnelle complexe formant un maillage autour du soma, de la partie proximale des dendrites et du segment initial de l'axone de certains neurones - (Celio et al. 1998; Deepa et al. 2006; Lau et al. 2013; Soleman et al. 2013).

Le PNN a été observé pour la première fois par C. Golgi en 1898. Il faudra néanmoins attendre l'avancée des techniques d'immunohistochimie, en particulier l'utilisation du marquage par la *Wisteria Floribunda Agglutinin* (WFA), pour confirmer l'existence du PNN, remise en cause par Ramón y Cajal (Celio et al. 1998). La WFA est une lectine végétale ayant une forte affinité pour les résidus N-acétylgalactosamines des chaînes de sucres composant la majorité des PNNs (Testa, Prochiantz, and Di Nardo 2019).

Le PNN n'est pas distribué de façon homogène dans le tissu cérébral, et il existe différents types de PNN en fonction de la région cérébrale ou de la moelle épinière (Matthews et al. 2002; Vitellaro-Zuccarello et al. 2007). L'hétérogénéité des PNNs est également retrouvée au sein d'une même région, comme cela a été illustré dans la moelle épinière (Vitellaro-Zuccarello et al. 2007). Les neurones responsables de la sécrétion des composants du PNN et entourés par celui-ci créent un micro-environnement unique, dépendant de leur activité, et modulant la structure de ce PNN. Cela pourrait expliquer pourquoi les PNNs sont aussi hétérogènes à travers les différentes régions cérébrales.

3.1. Structure et composition du réseau peri-neuronal

Comme évoqué ci-dessus, le PNN forme un maillage tridimensionnel. Quatre catégories principales de molécules le composent : Les glycosaminoglycanes (GAGs) – dont l'acide hyaluronique (AH) -, les protéoglycanes (PGs) et plus particulièrement les chondroïtines sulfate protéoglycanes (CSPGs), les tenascines, et les petites protéines de liaison hyaluronane et protéoglycane (HAPLNs) (Carulli et al. 2006; Kwok et al. 2011; Rauch 2004; Yamaguchi 2000) (*Figure 13*).

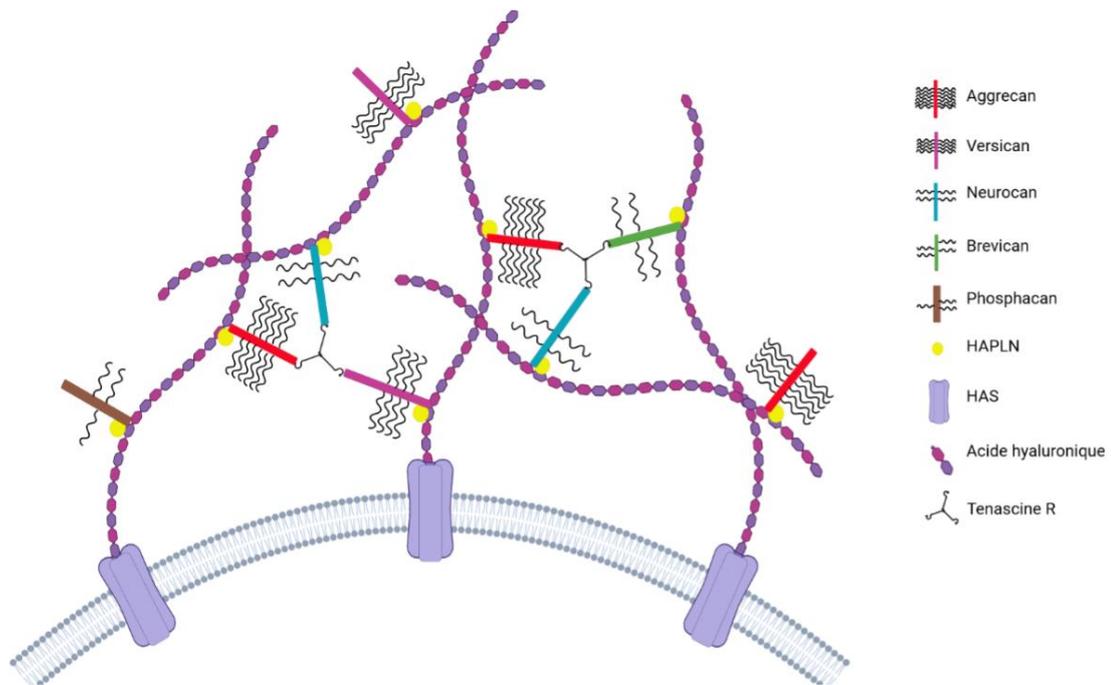


Figure 13 : Organisation tridimensionnelle du réseau peri-neuronal

L'acide hyaluronique (AH) est synthétisé et rattaché à la membrane plasmique des cellules par les hyaluronanes synthases (HAS). Les chondroïtine sulfate protéoglycans (CSPGs) (aggrecan ; versican ; neurocan ; brevican ; phosphacan) se fixent via leur partie N-terminale sur les chaînes d'AH et des petites protéines de liaison (HAPLNs) stabilisent cette fixation. Les tenascines R interagissent avec les parties C-terminales des CSPGs et stabilisent l'ensemble de la structure. (Adapté d'après Fawcett et al., 2019)

3.1.1. L'acide hyaluronique

L'AH constitue la structure de base sur laquelle les PGs peuvent se fixer. Les HAPLNs permettent de stabiliser cette fixation entre les PGs et l'AH. Les tenascines lient entre eux les PGs au niveau de leur extrémité C-terminale afin de stabiliser cette structure (Fawcett, Oohashi, and Pizzorusso 2019; Testa et al. 2019).

L'AH - ou hyaluronane - constitue la base sur laquelle se forme le PNN. Il s'agit d'un très long polymère (plusieurs centaines d'unités) formé par la répétition d'unités disaccharidiques composées d'un acide glucuronique (GlcA) lié à un N-acétylglucosamine (GlcNAc) (Rhodes and Fawcett 2004). Contrairement aux autres GAGs, l'AH est synthétisé directement au niveau de la membrane plasmique par une protéine transmembranaire : la hyaluronane synthase (HAS), responsable à la fois de l'élongation des chaînes d'AH et de leur ancrage à la membrane (Brückner et al. 1993). Il existe trois isoformes de cette protéine. Tous sont retrouvés dans le SNC, mais sont exprimés différemment en fonction de la région cérébrale. L'AH est l'unique GAG non sulfaté (Rhodes and Fawcett 2004). Les PGs peuvent se greffer aux chaînes d'AH, et cette liaison est stabilisée par les HAPLNs.

3.1.2. Les protéines de liaison hyaluronane et protéoglycane

Il existe quatre isoformes des HAPLNs, mais seuls les isoformes 1, 2 et 4 sont retrouvés dans le SNC (Sorg et al. 2016). L'isoforme HAPLN-2 est plutôt exprimé par les neurones et les oligodendrocytes et est retrouvé au niveau des nœuds de Ranvier, alors que les isoformes HAPLN-1 et HAPLN-4 sont exprimés par les neurones entourés de PNN (Oohashi et al. 2015).

3.1.3. Les protéoglycanes

Les protéoglycanes du PNN sont des protéines sur lesquelles sont fixés de façon covalente des GAGs. On distingue ainsi au sein du protéoglycane, le core protéique et les GAGs.

3.1.3.1. Les glycosaminoglycanes

Les GAGs sont des polymères formés par la répétition d'unités disaccharidiques. Chacune de ces unités est composée soit d'un galactose N-acétylé : N-acetylgalactosamine (GalNAc) ou d'un GlcNac couplé avec un galactose (Gal) ou un acide uronique (GlcA ou acide iduronique (IdoA) (Testa et al. 2019). La composition des GAGs est donc variée, et ils peuvent être classés en quatre catégories principales : les chondroïtine sulfates (CS) – composés d'unités GlcA-GalNAc -, les dermatane sulfates (DS) – composés d'unités IdoA-GalNAc -, les héparanes sulfates – composés d'unités GlcA/IdoA-GlcNac - et les kératane sulfates (KS) – composés d'unités Gal-GlcNac -. Ce sont les chondroïtine sulfate protéoglycanes (CSPGs) que l'on retrouve principalement dans le PNN (Jakovljević et al. 2021). Ainsi, l'origine de la grande diversité du PNN au sein du SNC repose sur cette grande diversité de combinaisons entre la nature de la protéine centrale et le type, la taille et la quantité de GAGs qui y sont rattachés.

Ces GAGs sont synthétisés dans le reticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi des neurones ou cellules gliales. La première étape consiste en la synthèse d'un tétra-saccharide dont la séquence est la suivante : xylose-galactose-galactose-glucuronate. C'est cette région qui permettra l'ancrage des GAGs aux PGs : le xylose du

tétra-saccharide est lié à une sérine de la protéine core du PG par l'enzyme β -D-xylosyltransférase (Dyck and Karimi-Abdolrezaee 2015; Schwartz 1977). Les GAGs sont également la cible de modifications, en particulier l'ajout de motifs de sulfatation. Ces modifications apportent un niveau supplémentaire de complexité et de diversité à cette structure. Concernant les CSPGs, ces motifs de sulfatation peuvent être ajoutés sur les carbones de GlcA et/ou GalNAc. La diversité des motifs de sulfatations mène à plusieurs catégories de CS : les CS-A, CS-C, CS-D ou CS-E. Les CS-A sont sulfatés sur le 4^{ème} carbone du GalNAc, alors que les CS-C sont sulfatés sur le 6^{ème} carbone du GalNAc (Gilbert et al. 2005). Les CS-A et CS-C monosulfatés peuvent être sulfatés une seconde fois pour donner les formes CS-E et CS-D respectivement. Ainsi, les CS-D correspondent à la forme CS-C sulfaté en plus sur le 2^{ème} carbone du GlcA, et les CS-E à la forme CS-A sulfaté en plus sur le 6^{ème} carbone du GalNAc (*Figure 14*).

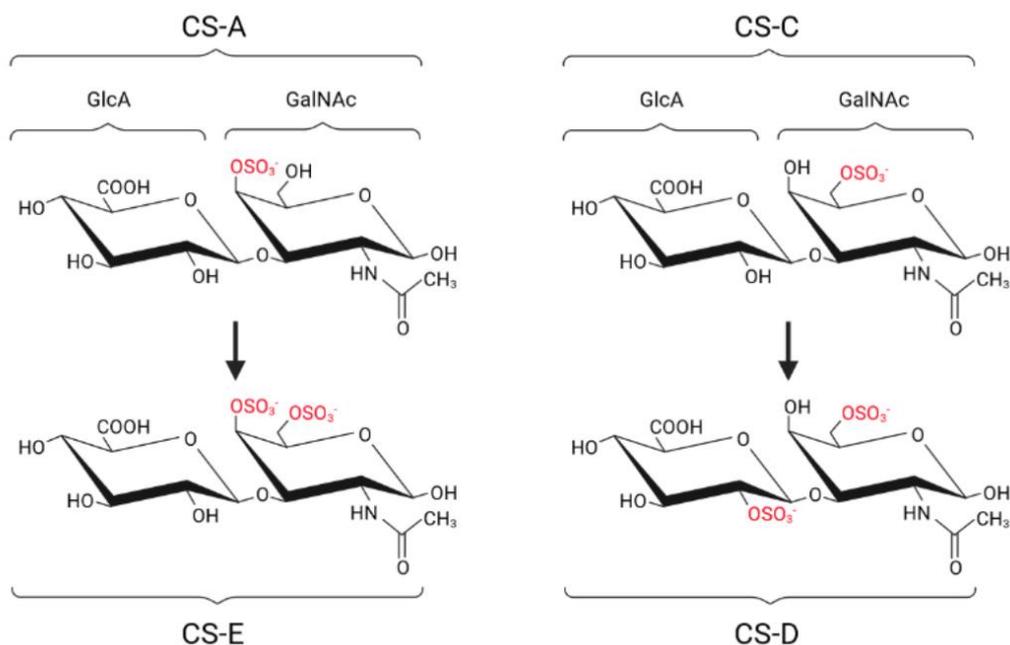


Figure 14 : Présentation des différentes classes d'unités disaccharidiques en fonction de leurs motifs de sulfatation

Le CS-A mono-sulfaté sur le 4^{ème} carbone du GalNAc peut devenir un CS-E en étant sulfaté une seconde fois sur le 6^{ème} carbone du GalNAc. Le CS-C mono-sulfaté sur le 6^{ème} carbone du GalNAc peut devenir un CS-D en étant sulfaté une seconde fois sur le 2^{ème} carbone du GlcA.

3.1.3.2. *Le core protéique*

Les protéines centrales des PGs composant le PNN appartiennent majoritairement à

la famille des lecticans, dont quatre membres sont des CSPGs : l'aggrecan (ACAN), le versican (VCAN), le neurocan (NCAN) et le brévican (BCAN) (Galtrey and Fawcett 2007; Kwok et al. 2011). On retrouve également le phosphacan, un autre CSPG. Le nombre de GAGs qui leur sont associés varie pour chacun d'eux.

Ces protéines sont composées de deux domaines globulaires distincts : le domaine globulaire 1 (et 2 dans le cas de l'ACAN) (G1 ; G2) localisé dans la partie N-terminale de la protéine, et le domaine globulaire 3 (G3) localisé dans la partie C-terminale de la protéine (Dyck and Karimi-Abdolrezaee 2015). Le domaine G1 interagit avec les HAPLNs. Les HAPLNs permettent donc la fixation de façon non covalente des CSPGs aux chaînes d'AH (Oohashi et al. 2015) et limitent de ce fait la diffusion des lecticans dans la MEC. Le domaine G3 interagit quant à lui avec les tenascines R (TNR) et C, seuls isoformes des tenascines retrouvés dans le SNC. L'analyse de souris déficientes pour la TNR a montré que celle-ci est particulièrement importante dans le maintien de la structure du PNN (Brückner et al. 2000). La TNR interagit avec le domaine lectine contenu dans le domaine G3 des CSPGs. C'est cette interaction calcium-dépendante qui permet la condensation du PNN (Aspberg, Binkert, and Ruoslahti 1995).

3.2. Quelques rôles connus pour le réseau peri-neuronal

Comme expliqué précédemment, le PNN n'est pas réparti de façon ubiquitaire dans le SNC, et sa composition varie non seulement entre les différentes régions où il est exprimé, mais également au sein d'une même région. La longueur des chaînes d'AH, la nature et le nombre de CSPGs qui y sont greffés, le type, le nombre, et le degré de sulfatation des GAGs portés par ces PGs sont autant de niveaux de complexité conduisant à la très grande diversité des PNNs. Leur remodelage constant y compris chez l'adulte contribue également à cette diversité. De par cette grande variabilité du PNN, les rôles physiologiques du PNN sont multiples.

3.2.1. Le PNN et l'homéostasie ionique

De par les propriétés poly-anioniques des chaînes d'AH et des CSPGs sulfatés, le PNN permet de tamponner les cations présents dans l'espace extracellulaire, et ainsi réguler l'homéostasie ionique (Brückner et al. 1993). En capturant les cations présents dans l'espace extra-cellulaire (tels que le potassium, le sodium ou le calcium), le PNN contribue à la mise en place d'un micro-environnement particulier autour du neurone.

Cette accumulation de cations pourrait jouer un rôle sur l'excitabilité des neurones, en particulier les neurones à décharge rapide (Balmer 2016).

3.2.2. Le PNN et la période critique

Le PNN a également été largement étudié pour son rôle dans la plasticité du fait que sa mise en place coïncide avec la fin de la période critique (Pizzorusso et al. 2002). De plus, la destruction du PNN par la chondroïtinase ABC (ChABC) restaure une plasticité semblable à celle observée lors de la période critique dans le cortex visuel (Pizzorusso et al. 2002). Au cours du développement, la dégradation du PNN permet également l'augmentation de la synaptogenèse (Pyka et al. 2011). A la vue de son rôle dans la plasticité neuronale, il a été proposé que le PNN soit impliqué dans les processus d'apprentissage ou de mémorisation, en particulier dans l'hippocampe (Hyllin et al. 2013)

3.2.3. Le PNN : une barrière peri-neuronale

Il joue un rôle de barrière physique autour des neurones, limitant l'interactions des molécules, la formation de nouvelles synapses, ou encore le déplacement de protéines membranaires peri-synaptiques à la surface de la membrane plasmique (Morawski et al. 2012).

3.2.4. Le réseau peri-neuronal à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué

Comme déjà évoqué dans le paragraphe sur la barrière à la frontière EM/ARH, un dépôt de PNN a été observé à la frontière entre l'EM et l'ARH et entoure principalement les neurones AgRP/NPY de l'ARH. La mise en place de ce dépôt de PNN semble dépendre de la montée post-natale du taux circulant de leptine. En effet, ce dépôt est altéré chez les animaux Ob/Ob dépourvus de leptine et l'injection post-natale de cette hormone aux souriceaux Ob/Ob suffit à rétablir une organisation normale du PNN dans cette région cérébrale (Mirzadeh et al. 2019). De plus, il a également été montré que l'expression de la TNR, composant essentiel au maintien de la structure du PNN, dépend du statut métabolique de l'animal dans le parenchyme de l'EM (Kohnke et al. 2021). Il existe donc une plasticité de ce PNN en fonction du statut alimentaire de l'animal (nourris ou à jeun). Enfin, il a également été mis en évidence un lien entre un état pathologique lié à la prise alimentaire et l'altération de ce dépôt de PNN séparant l'EM et l'ARH dans

un modèle de rats diabétiques. Plus précisément, une diminution du PNN et notamment de l'ACAN dans les parties médiane et latérale de l'ARH a été observée dans un modèle de rats diabétiques comparé à des rats contrôles. De plus, cette étude montre un changement dans les motifs de sulfatation des CS et DS de l'hypothalamus entre les rats diabétiques et contrôles (Alonge et al. 2020). Il est à noter qu'actuellement, la composition du PNN dans cette région cérébrale fait débat puisque l'ACAN a été identifié à la frontière entre l'EM et l'ARH chez le rat (Alonge et al. 2020) mais pas chez la souris (Mirzadeh et al. 2019) alors que des études transcriptomiques montrent clairement une expression de l'ACAN dans cette région en particulier par les neurones à NPY (Campbell et al. 2017; Henry et al. 2015) chez la souris.

3.3. L'aggrecan : un protéoglycane de haut poids moléculaire aux multiples fonctions

3.3.1. Généralités sur l'aggrecan

L'ACAN est une protéine de haut poids moléculaire codée par le gène *Acan* porté par le chromosome 15 chez la souris et l'humain (*Figure 15*). Chez l'Homme, la protéine core de l'ACAN a un poids moléculaire d'environ 250 kDa sur laquelle viennent se greffer des chaînes de CS-GAGs et de KS-GAGs qui représentent environ 90% du poids moléculaire de l'ACAN (Aspberg 2012; Kiani et al. 2002). Il convient toutefois de noter que ce n'est pas le cas pour toutes les espèces. En effet, le séquençage complet de l'ADNc murin codant pour l'ACAN (Walcz et al. 1994; Watanabe et al. 1995) montre que celui-ci ne contient pas la séquence consensus permettant la fixation des KS (Antonsson, Heinegard, and Oldberg 1989; Doege et al. 1991; Watanabe, Yamada, and Kimata 1998). Alors que l'ACAN humain et bovin possèdent un segment composé de plusieurs répétitions d'un hexapeptide permettant l'attachement des KS, les rongeurs ne possèdent pas cette séquence (Antonsson et al. 1989; Doege et al. 1991). De façon intéressante, il a été montré que chez l'Homme, les ovins et les bovins, la proportion de chaînes KS portées par l'ACAN dans le cerveau est tout de même significativement réduite par rapport à ce qui a été observé sur l'ACAN présent dans le cartilage (Domowicz et al. 1995, 2003; Morawski et al. 2012).

Malgré le fait que l'ACAN soit tronqué chez les rongeurs et ne possède pas de région enrichie en KS, il est possible de trouver quelques chaînes de KS attaché à la core protéine de l'ACAN chez les rongeurs au niveau des domaines G1, G2, et du domaine

inter-globulaire (IGD). Les KS présents au niveau de l'IGD sont d'ailleurs proposés pour favoriser le clivage de l'ACAN à cet endroit par les désintégrines et métalloprotéinases à motifs thrombospondines (ADAMTS)-4/5 (Fosang et al. 2008).

Exprimé principalement par les chondrocytes dans le cartilage, mais également dans d'autres organes tels que le cœur ou le cerveau, l'ACAN est un PG appartenant à la famille des lecticans.

3.3.2. Structure de l'aggrecan

L'ACAN possède deux domaines globulaires (G1 et G2) dans sa partie N-terminale et un domaine globulaire (G3) dans sa partie C-terminale. G1 et G2 sont connectés par l'IGD, et les GAGs se fixent à l'ACAN entre les domaines G2 et G3. Ces GAGs sont majoritairement des CS, mais incluent également des KS chez l'Homme. Les CS sont localisés dans la moitié C-terminale de l'ACAN, au niveau des domaines dits CS1 et CS2. Les KS sont quant à eux situés principalement dans la partie N-terminale de l'ACAN, entre le domaine G2 et la région enrichie en CS (*Figure 15*) (Hardingham and Fosang 1995; Hardingham, Fosang, and Dudhia 1994).

Le domaine G1 de l'ACAN permet la liaison de celui-ci avec l'AH (*Figure 15*), ainsi que la stabilisation de cette liaison par les HAPLNs. En effet, le Domaine G1 est composé de trois sous-domaines qui sont les boucles A, B et B'. La boucle A permet à l'ACAN d'interagir avec l'AH, alors que les boucles B et B' interagissent avec la protéine HAPLN. HAPLN interagit également avec l'AH et stabilise de ce fait la fixation de l'ACAN sur l'AH (Koch, Lee, and Apte 2020). L'IGD séparant les domaines G1 et G2 présente de nombreux sites de clivage pour les métalloprotéinases (MMPs), ou d'autres protéases telles que les aggrecanases appartenant à la famille des ADAMTS (*Figure 15*). Le domaine G2 est propre à l'ACAN parmi les CSPGs de la famille des lecticans. La structure de ce domaine G2 est très semblable à celle du domaine G1. Cependant, alors que le domaine G1 est essentiel pour la fixation de l'ACAN à l'AH – liaison stabilisée par les petites protéines de liaison –, aucune capacité de fixation du domaine G2 aux petites protéines de liaison n'a pu être établie (Fosang and Hardingham 1989; Watanabe, Cheung, et al. 1997).

Le domaine G3 est essentiel pour les modifications post-traductionnelles de l'ACAN impliquant la fixation des GAGs sur la core protéine. Ce domaine est aussi impliqué dans l'interaction de l'ACAN avec la TNR. Le domaine G3 est composé de trois modules : un module de type facteur de croissance épidermique (EGF), un module de type protéine

de liaison du complément (CBP), et un domaine de reconnaissance des lectines (CRD) (Figure 15). Il est toutefois à noter qu'il existe deux variants du module de type EGF (EGF-1 ; EGF-2), et que chez les souris la séquence codant EGF-1 est intronique et n'est donc pas traduit (Kiani et al. 2002). De plus, il a été montré chez le rat que la grande majorité de l'ACAN exprimé dans le cerveau ne possède pas ce module de type EGF (Matthews et al. 2002).

Les CS-GAGs et KS-GAGs sont fixés à l'ACAN de façon post-traductionnelle et la majorité des fonctions des PGs sont médiées par ces chaînes de GAGs. Comme mentionné ci-dessus, les CS sont les GAGs prédominants de l'ACAN. La sulfatation correcte des CS est cruciale pour l'établissement des fonctions physiologiques de l'ACAN et lui permet notamment d'interagir avec des facteurs de croissance par exemple (Asada et al. 2009; Prinz et al. 2014; Sirko et al. 2010; Sterner et al. 2013).

Comme évoqué au début de ce paragraphe, l'ACAN est essentiellement trouvé dans le cartilage, et est absolument nécessaire au bon développement et maintien de ce tissu. L'étude de ce tissu permet donc de mieux appréhender les différentes propriétés de l'ACAN, c'est pourquoi nous nous attacherons dans la prochaine partie à décrire les différentes propriétés de l'ACAN au sein du cartilage.

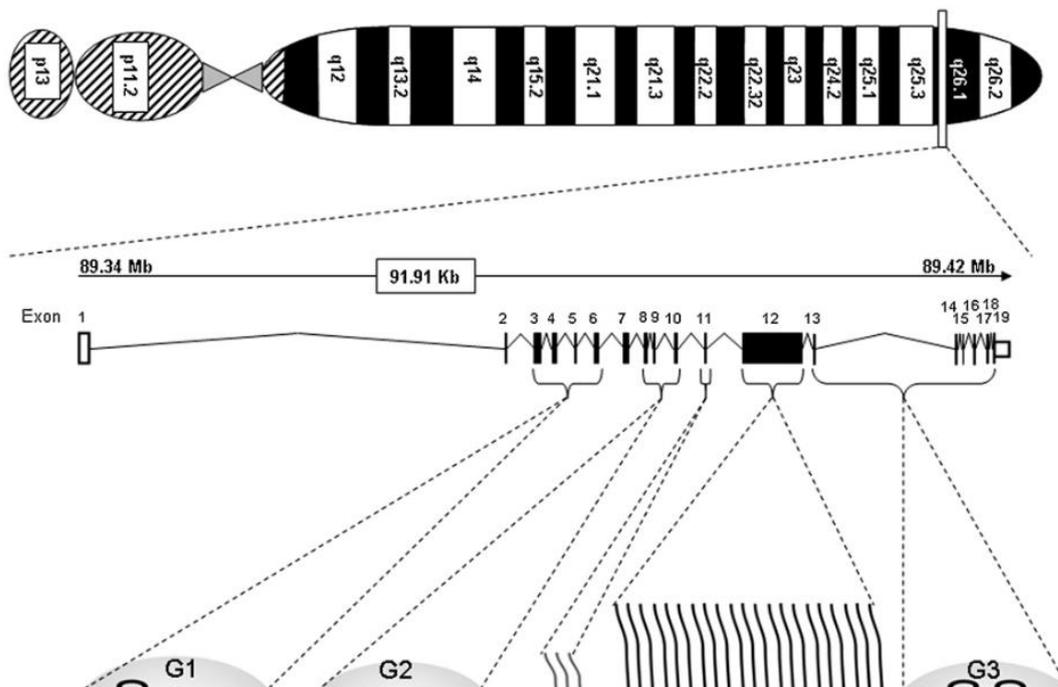


Figure 15 : Localisation chromosomale et structure protéique de l'aggrecan (ACAN)

A. Localisation chromosomale du gène de l'Acn. Le gène humain codant pour l'Acn est localisé sur le chromosome 15, à la position 26.1, **B. Organisation des exons codant pour l'ACAN.** Les exons codants sont représentés par les rectangles noirs et les exons non codants par les rectangles blancs. Les traits représentés entre les exons sont les introns. **C. Représentation schématique de la structure de la protéine ACAN.** Les exons codent pour différents domaines de la protéine, qui donnent des groupes fonctionnels : les trois domaines globulaires G1-3, le domaine enrichi en keratan-sulfates et le domaine enrichi en chondroïtine-sulfates. Le domaine G1 permet la fixation à l'acide hyaluronique. (Figure issue de Morawski et al., 2012)

3.3.3. L'aggrecan et le cartilage

3.3.3.1. Importance de l'aggrecan dans le cartilage

L'importance de l'ACAN dans le cartilage est illustrée dans un modèle murin *in vivo* de déficience de la matrice du cartilage (Cmd) (Krueger, Kurima, and Schwartz 1999), ou encore dans un modèle de culture de chondrocytes de poussins nanométriques (Primorac et al. 1994).

Le modèle Cmd consiste en la délétion de 7 paires de base dans l'exon 5, codant le domaine G1 de l'ACAN (Watanabe et al. 1994). Les souris homozygotes (*Cmd/Cmd*) sont anormalement petites et présentent une malformation de la colonne vertébrale ainsi qu'une chondrodysplasie (Watanabe et al. 1994). Elles meurent peu de temps après la naissance, dû à une insuffisance respiratoire (Watanabe, Nakata, et al. 1997).

Dans le modèle de culture de chondrocytes de poussins nanométriques, la présence d'un codon stop dans la séquence codante de l'ACAN mène à la synthèse d'une version tronquée de la protéine (Primorac et al. 1994). Cette protéine mutée n'est pas transloquée vers l'appareil de Golgi, et n'est donc pas présente dans le cartilage (Argaves, McKeown-Longo, and Goetinck 1981; McKeown and Goetinck 1979). Cette absence d'ACAN dans le cartilage conduit à une diminution très significative de la taille du squelette ainsi qu'à une chondrodysplasie (Stirpe, Argaves, and Goetinck 1987; Vertel et al. 1993, 1994).

3.3.3.2. Propriétés de l'aggrecan dans le cartilage

L'ACAN forme des agrégats dans la MEC du cartilage et les très nombreuses chaînes de CS sulfatées qu'il porte créent un environnement de charges négatives dans le cartilage (Brückner et al. 1993; Roughley and Mort 2014). Ces charges négatives favorisent le déplacement de molécules d'eau vers l'ACAN afin de maintenir l'équilibre osmotique du cartilage. Cette propriété de l'ACAN permet ainsi aux tissus de résister aux forces de compression (MK and I 2006; Nimer, Schneiderman, and Maroudas 2003). La formation d'un gel hydraté au niveau des articulations, grâce à cette propriété de l'ACAN, confère au tissu la capacité de résister de façon optimale aux contraintes de tension et de cisaillement en plus de fournir une élasticité tissulaire.

3.3.3.3. *Le clivage de l'aggrecan*

L'ACAN est susceptible de subir des clivages au cours de processus physiologiques ou pathologiques. Le domaine IGD de l'ACAN est sensible aux clivages protéolytiques et ceux-ci entraînent la libération de la région protéique (incluant les domaines G2 et G3) portant l'ensemble des GAG de l'ACAN (*Figure 15*). De ce fait, l'IGD est particulièrement important pour le processus de renouvellement de l'ACAN (Hardingham and Fosang 1995; Hardingham et al. 1994). Deux sites majeurs de clivage ont été identifiés au niveau de l'IGD. Le premier site est localisé entre l'asparagine 341 et la phénylalanine 342 de la protéine et est clivé par des métalloprotéinases (MMPs). Le clivage de l'ACAN au niveau de ce site génère le néo-épitope VDIPEN³⁴¹ (Flannery, Lark, and Sandy 1992; Fosang et al. 1993). Le second site de clivage est reconnu par les protéases de la famille des ADAMTS et est localisé entre l'acide glutamique 373 et l'alanine 374 de la protéine. Le clivage de l'ACAN à ce site génère le néo-épitope NITEGE³⁷³ (*Figure 16*) (Hughes et al. 1995; Ilic et al. 1992; Sandy et al. 1991). Il est à noter que d'autres sites de clivage existent également au niveau des domaines enrichis en CS – CS-1 et CS-2 – et que d'autres protéases telles que les cathepsines ou les élastases leucocytaires sont responsables du clivage de l'ACAN (*Figure 16*) (Kiani et al. 2002).

Dans le cartilage, deux ADAMTS majeures régulent le clivage de l'ACAN : l'ADAMTS-4 et l'ADAMTS-5 (Tian et al. 2013). Les clivages de l'ACAN par ces deux protéases est un processus physiologique qui participe au renouvellement de ce protéoglycane dans le cartilage (Lark et al. 1997). Cependant, l'augmentation de la dégradation de l'ACAN due à la surexpression des ADAMTS est un événement clé dans le développement de pathologies telles que la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose (Lark et al. 1997; Roughley and Mort 2014).

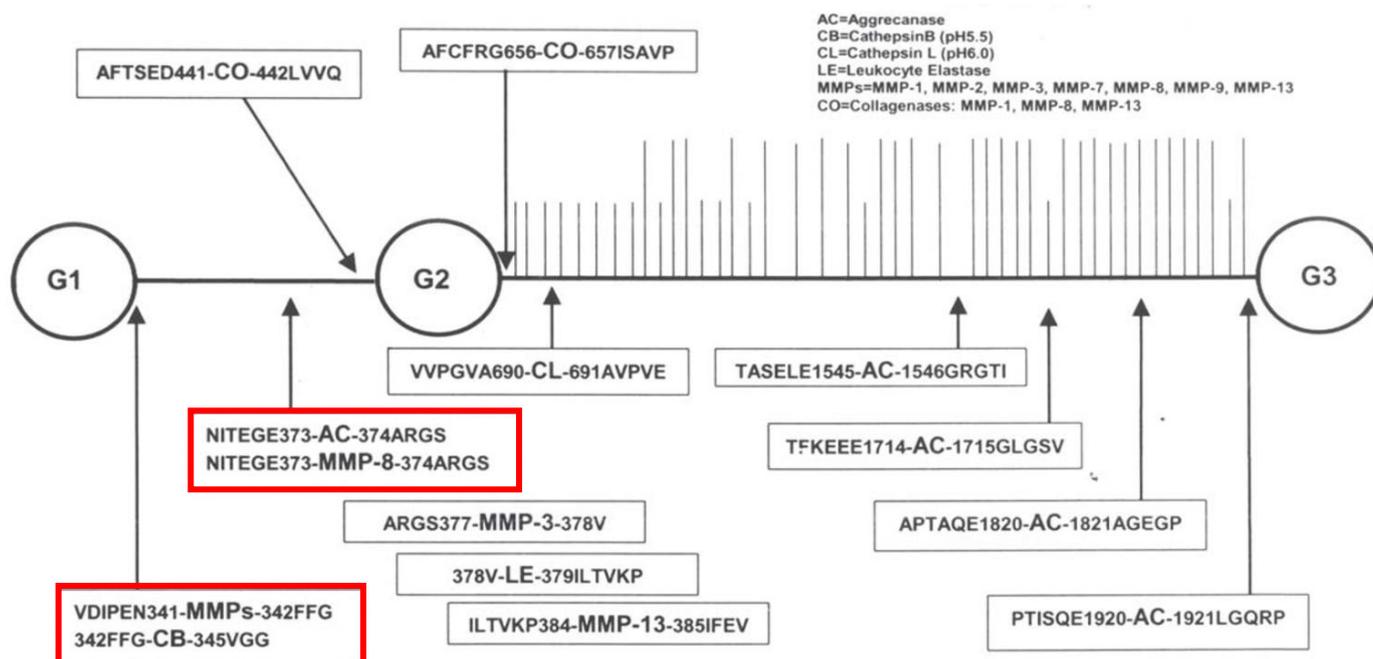


Figure 16 : Les différents sites de clivage de l'aggrecan par les metallo-protéinases et les ADAMTS

Identification de deux sites majeurs pour le clivage de l'aggrecan (ACAN) au niveau du domaine interglobulaire (entre les domaines G1 et G2) : le premier est clivé par les metallo-protéinases (MMPs) et est situé entre les résidus Asn³⁴¹ et Phe³⁴². Il est identifié comme étant le site de clivage VDIPEN³⁴¹ (premier encart rouge). Le second site de clivage est clivé par les aggrecanases appartenant à la famille des ADAMTS et est localisé entre les résidus Glu³⁷³ et Ala³⁷⁴. Il est identifié comme étant le site de clivage NITEGE³⁷³ (second encart rouge). Il existe de nombreux autres sites de clivage de l'ACAN, en particulier au niveau des domaines enrichis en chondroïtine sulfate (CS-1/2) et kératane sulfate selon l'espèce. D'autres protéines que les MMPs et les ADAMTS sont responsables du clivage de l'ACAN, comme les cathepsines ou l'élastase leukocytaire. Figure adaptée de Kiani et al., 2002.

3.3.3.4. Implication de la ghréline et de la leptine dans le remodelage de l'aggrecan

Quelques données suggèrent un impact des hormones métaboliques en particulier la leptine et la ghréline, présentées précédemment, dans la plasticité de l'ACAN. La ghréline aurait un rôle protecteur du cartilage car elle inhibe l'expression de protéases (MMP3, MMP13, ADAMTS-4 et ADAMTS-5) et favorise l'expression de l'ACAN dans des cultures de chondrocytes ou des explants de cartilage (liu et al. 2018). La ghréline permet également de maintenir la production d'ACAN. L'interleukine β 1 a un effet pro-inflammatoire et joue un rôle dans des pathologies telles que l'arthrite osseuse en favorisant la dégradation de la matrice, dont l'ACAN. La ghréline permet également de maintenir la production d'ACAN en prévenant la diminution d'ACAN induite par l'interleukine β 1 (liu et al. 2018; Qu et al. 2018).

Inversement, la leptine serait davantage impliquée dans la dégradation de l'ACAN car elle induit l'expression de trois protéases à activité aggrecanase à savoir ADAMTS-4,

ADAMTS-5 et ADAMTS-9 dans des chondrocytes humains ou des cellules du noyau pulpeux (Li et al. 2014; Yaykasli et al. 2015). D'autre part, la leptine induit une diminution de l'expression de l'ACAN dans des cellules du noyau pulpeux (Li et al. 2014).

L'ACAN est donc un PG dont les propriétés permettent le maintien et le bon fonctionnement du cartilage, en particulier au niveau des articulations. Au niveau du cerveau, l'ACAN présente quelques propriétés particulières qui sont présentées dans le paragraphe ci-dessous.

3.3.4. Importance de l'aggrecan dans le cerveau

Bien que l'importance de l'ACAN dans le cerveau ait déjà été suggérée pour de nombreuses fonctions telles que la stabilisation mécanique des contacts synaptique, l'aide à la transmission synaptique des neurones exprimant le PNN, et en particulier la sous-population de neurones parvalbumine-positifs ou encore la protection des neurones en diminuant le stress oxydatif grâce à la capture des ions red/ox (Morawski et al. 2012), les limitations techniques permettant l'étude *in vivo* de l'ACAN spécifiquement – telles que l'utilisation de la ChABC ciblant les GAGs de l'ensemble des CSPGs, ou encore le fait que la délétion totale de l'ACAN soit létale (cf. « L'aggrecan dans le cartilage ») – ne permettent pas de conclure quant au rôle de l'ACAN uniquement.

Des études *in vitro* ont tout de même montré le rôle primordial de l'ACAN dans la mise en place et la stabilité du PNN (Giamanco, Morawski, and Matthews 2010; Kwok, Carulli, and Fawcett 2010). Plus récemment un modèle murin de knock-out conditionnel pour l'ACAN a été mis en place et a permis l'étude du rôle spécifique de l'ACAN dans la plasticité neuronale (Rowlands et al. 2018). L'inactivation conditionnelle d'*Acan* est obtenue en supprimant l'exon 4 du gène *Acan* par recombinaison Cre-lox. La perte de l'exon 4 induit un décalage du cadre de lecture et empêche ainsi la traduction de la protéine ACAN. A l'aide de ce modèle, les auteurs ont confirmé que la perte de l'ACAN empêche la formation du PNN. De plus, l'injection d'un virus permettant la délétion localisée de l'ACAN dans les neurones montre que les neurones infectés ne sont pas entourés par le PNN, contrairement aux neurones non infectés. Cela suggère que la production d'ACAN par le neurone est nécessaire pour la mise en place du PNN autour de celui-ci.

Sachant que le PNN est retrouvé principalement autour d'une sous-population de neurones exprimant la parvalbumine, les auteurs ont également montré que la perte d'ACAN conduit à une diminution de l'expression de la parvalbumine dans ces neurones.

La parvalbumine étant utilisé comme marqueur pour déterminer le stade de plasticité des neurones, les résultats suggèrent que la perte d'ACAN maintiendrait les neurones à un stade de plasticité semblable à celui observé lors de la période critique, période où la plasticité neuronale est maximale. Enfin, cette étude met en avant que de façon semblable aux résultats obtenus après la dégradation du PNN, la perte d'ACAN améliore les résultats au test de mémoire de reconnaissance d'objet par les souris.

Pris dans leur ensemble, ces résultats soulignent le rôle clé de l'ACAN pour l'assemblage et le maintien de la structure du PNN, ainsi que pour le bon établissement des fonctions physiologiques du PNN. De plus, Ces résultats suggèrent un rôle important du PNN dans la régulation de la plasticité neuronale chez la souris adulte.

Objectifs et stratégies de recherche

L'objectif de ce travail de thèse a été de déterminer la nature et la fonction de la barrière de diffusion localisée à la frontière entre l'EM et l'ARH. Plus particulièrement, ce travail s'intéresse au rôle de cette barrière dans le cadre de la prise alimentaire. Pour cela, ce projet de recherche a été divisé en trois axes d'étude principaux :

- **L'identification de la nature et des propriétés de la barrière de diffusion à la frontière entre l'EM et l'ARH** grâce à :
 - L'étude de la diffusion des molécules en fonction de leur taille,
 - La vérification de l'implication du dépôt de PNN dans le blocage des molécules grâce à la destruction enzymatique de celui-ci ou l'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés,
 - L'évaluation de la diffusion des molécules grâce à des immunomarquages dirigés contre les composants du PNN ;

- **L'évaluation de son rôle physiologique sur la prise alimentaire** grâce à :
 - L'étude de la plasticité de la barrière en fonction du statut métabolique de l'animal,
 - L'étude de l'activation neuronale dans l'ARH et de la prise alimentaire après injection de ghréline avec ou sans destruction de la barrière,
 - L'étude de l'activation neuronale dans l'ARH et de la prise alimentaire après injection de leptine avec ou sans destruction de la barrière et avec ou sans mise à jeun préalable à l'injection de leptine ;

- **L'étude de cette barrière dans le cadre d'une pathologie liée à la prise alimentaire** grâce à :
 - La caractérisation d'un modèle de souris HFD-FC.

Résultats

Partie 1 : Propriétés et nature de la barrière de diffusion pour les molécules circulantes à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué

L'accès des hormones métaboliques périphériques telles que la ghréline ou la leptine au SNC - et plus spécifiquement à l'ARH - est essentiel pour la régulation de la prise alimentaire. Comme décrit précédemment, des expériences ont montré un blocage de traceurs injectés par voie intraveineuse dans le parenchyme de l'EM (Mullier et al. 2010; Rodriguez 1976), suggérant l'existence d'une barrière de diffusion bidirectionnelle pour les molécules circulantes à la frontière entre l'EM et l'ARH. A ce jour, cette barrière reste largement inexplorée. En particulier, ses propriétés spécifiques et sa nature exacte ne sont pas connues. Dans cette première partie, nous avons cherché à établir quelques propriétés de cette barrière et à déterminer sa composition.

1. Quelques propriétés de la barrière de diffusion localisée à l'interface entre l'éminence médiane et le noyau arqué

La partie ventrale de l'EM est bordée par un réseau dense de capillaires fenêtrés qui facilitent la diffusion passive des molécules périphériques vers le parenchyme de l'EM. Des molécules de tailles très variables (par exemple la leptine (16kDa), la ghréline (3kDa), des acides gras (environ 88 à 368 kDa) ou du glucose (180 Da)) sont donc susceptibles de parvenir jusqu'à la barrière latérale de diffusion (BLD) et pourraient, en fonction de leur taille, la franchir ou s'y heurter. Une étude de 2022 utilisant un dérivé fluorescent du glucose (2-NBDGlucose (2-deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose) a révélé que la BLD est capable de freiner la diffusion du glucose dans le parenchyme de l'EM (Rodríguez-Cortés et al. 2022). A l'initiation de cette étude, nous avons cherché à établir si la BLD possède la propriété de filtrer les molécules en fonction de leurs poids moléculaires. Pour cela, des Dextrans de tailles variables - à savoir 3 (proche de la ghréline), 10 (proche de la leptine) et 40 kDa - et couplés à des fluorophores ont été injectés par voie intra-veineuse en rétro-orbital chez des animaux sauvages C57Bl/6J mâles adultes. L'animal a été sacrifié 20 minutes après l'injection afin d'étudier la diffusion de ces molécules. Vingt minutes après l'injection, ces Dextrans sont visibles dans la lumière des vaisseaux sanguins de l'ARH et se sont accumulés dans le parenchyme de l'EM, mais aucun d'eux n'a diffusé de façon massive vers l'ARH (Figure

17 A). Cela suggère que cette barrière est capable de bloquer des molécules de poids supérieur ou égal à 3 kDa.

En accord avec ces résultats, l'immunomarquage de l'albumine - une molécule plasmatique endogène d'environ 66 kDa - montre que celle-ci reste bloquée dans le parenchyme de l'EM sans pouvoir diffuser vers l'ARH (Figure 17 B). Le marquage de l'albumine nous permet donc de visualiser la limite de diffusion des molécules périphériques circulantes sans devoir recourir à l'injection de traceur fluorescent particulier. L'immunomarquage de l'albumine servira donc d'indicateur de l'intégrité de la barrière de diffusion à la frontière entre l'EM et l'ARH dans la suite des expériences.

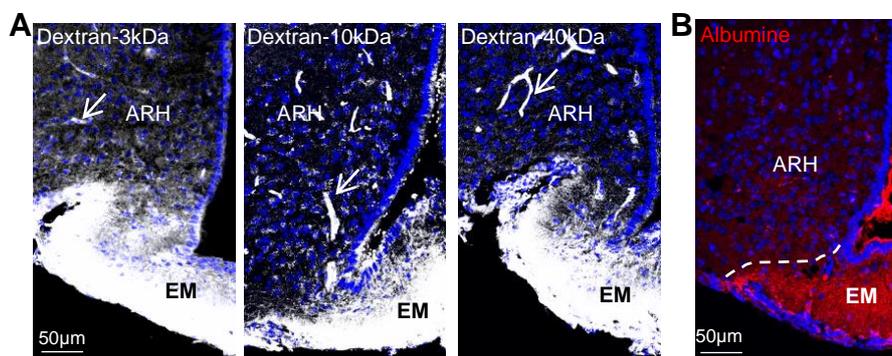


Figure 17 : Blocage de la diffusion des molécules entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH)

A. Diffusion des Dextrans fluorescents de 3, 10 et 40 kDa dans l'EM et l'ARH à partir de tranches de cerveau. Vingt minutes après leur injection intraveineuse, les Dextrans (marquage blanc) sont observables dans la lumière des vaisseaux sanguins de l'ARH (flèches blanches) et s'accumulent dans le parenchyme de l'EM, sans diffuser massivement vers l'ARH. **B.** Diffusion de la molécule endogène circulante albumine dans l'EM et l'ARH. L'immunomarquage de l'albumine plasmatique endogène (rouge) à partir d'une tranche de cerveau montre l'accumulation de cette molécule dans le parenchyme de l'EM, et son blocage à la frontière entre l'EM et l'ARH (ligne pointillée blanche).

2. Nature de la barrière de diffusion à l'interface de l'éminence médiane et du noyau arqué

Plusieurs hypothèses existent quant à la nature de cette barrière. La sous-population des tanocytes $\beta 1$ localisés aux extrémités latérales ventrales du 3V en particulier ont la particularité d'exprimer la protéine SPRR1a (Campbell et al. 2017), qui est réticulée aux protéines membranaires, formant ainsi une enveloppe insoluble sous la membrane plasmique. De façon intéressante, cette molécule joue un rôle dans la formation de la barrière épidermique. De par ses propriétés et sa localisation très particulière, SPRR1a pourrait jouer un rôle dans le blocage de la diffusion des molécules.

Cette hypothèse est en cours d'exploration au laboratoire et ne sera pas abordée dans ce manuscrit.

D'autres auteurs ont découvert l'existence à la limite entre l'EM et l'ARH d'un dépôt de MEC s'apparentant au PNN (Horii-Hayashi et al. 2015, 2017; Mirzadeh et al. 2019; Pócsai and Kálmán 2014) et entourant principalement les neurones à NPY chez la souris (Mirzadeh et al. 2019) (cf. « Rôle éventuel de la MEC » en introduction). Le PNN est déjà connu pour son rôle de « barrière », limitant l'accès des molécules aux neurones qu'il entoure (Morawski et al. 2012), ainsi que la formation de nouvelles synapses à la surface de ces neurones (Barritt et al. 2006; Corvetti and Rossi 2005). Ainsi, le dépôt de PNN dans cette région cérébrale pourrait être impliqué dans le blocage de la diffusion des molécules entre l'EM et l'ARH.

2.1. Implication du réseau peri-neuronal dans le blocage des molécules à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué

Nous avons observé que la limite de diffusion des Dextrans et de l'albumine correspond parfaitement à la frontière entre l'EM et l'ARH. Cette limite de diffusion semble correspondre également avec la zone de dépôt de PNN déjà observée dans la littérature. Afin de déterminer si le dépôt de PNN joue un rôle dans le blocage des molécules décrit ci-dessus, un co-marquage du PNN grâce à la lectine WFA et de l'albumine a été réalisé à partir de tranches de cerveau de souris C57BL/6J mâles adultes. Les résultats obtenus montrent une parfaite corrélation entre le dépôt de PNN et la limite de diffusion de l'albumine (Figure 18 A). Cette corrélation suggère que le PNN localisé à la frontière entre l'EM et l'ARH pourrait jouer un rôle dans le blocage de la diffusion des molécules périphériques vers l'ARH.

Afin d'établir si le PNN pourrait être impliqué dans le blocage de la diffusion des molécules périphériques vers l'ARH, nous avons altéré le dépôt de PNN grâce à l'injection stéréotaxique au niveau de l'ARH d'une enzyme capable de cliver les chaînes disaccharidiques des CSPGs : la ChABC. Cette enzyme catalyse le clivage de la liaison-O liant un N-acétylgalactosamine avec un acide glucuronique au niveau des GAGs des CSPGs (Figure 18 B). Le PNN étant constitué majoritairement de CSPGs, cette enzyme est par conséquent capable de dégrader les GAGs qui constituent le PNN.

Pour cette expérience, des mâles C57BL/6J adultes ont été injectés par stéréotaxie en bilatéral au niveau de l'ARH soit avec une solution contrôle de PBS 1X (se référer à la composition dans la partie Matériel et méthodes, page 116), soit avec l'enzyme ChABC et sacrifiés 48 heures après l'infusion (Figure 18 C). Suite à l'injection de la ChABC, nous constatons une diminution notable du marquage du PNN à la frontière entre l'EM et l'ARH

par rapport aux contrôles, indicatrice d'une altération significative du dépôt de PNN à cet endroit par cette enzyme (Figure 18 D, haut). Dans ce contexte, le marquage de l'albumine montre que celle-ci diffuse largement vers l'ARH chez les animaux injectés avec la ChABC alors qu'elle reste bloquée dans le parenchyme de l'EM chez les animaux contrôles comme observé précédemment chez les C57BL6/J non injectées (Figure 18 D, bas). Nous observons également parfois une diffusion de l'albumine dans le corps cellulaire des tanyocytes (Figure 18 D, bas). Bien que ce ne soit pas le cas sur la majorité des tranches observées, nous ne pouvons exclure qu'il puisse exister un transport de l'albumine par les tanyocytes. L'ensemble de ces résultats démontre le rôle majeur joué par le PNN dans le blocage des molécules à la frontière entre l'EM et l'ARH. En complément de ces expériences, un co-marquage du collagène IV et de ZO-1 sur des tranches de cerveau d'animaux injectés ou non avec la ChABC permettrait de vérifier que celle-ci n'a pas d'impact sur l'intégrité de la BHE.

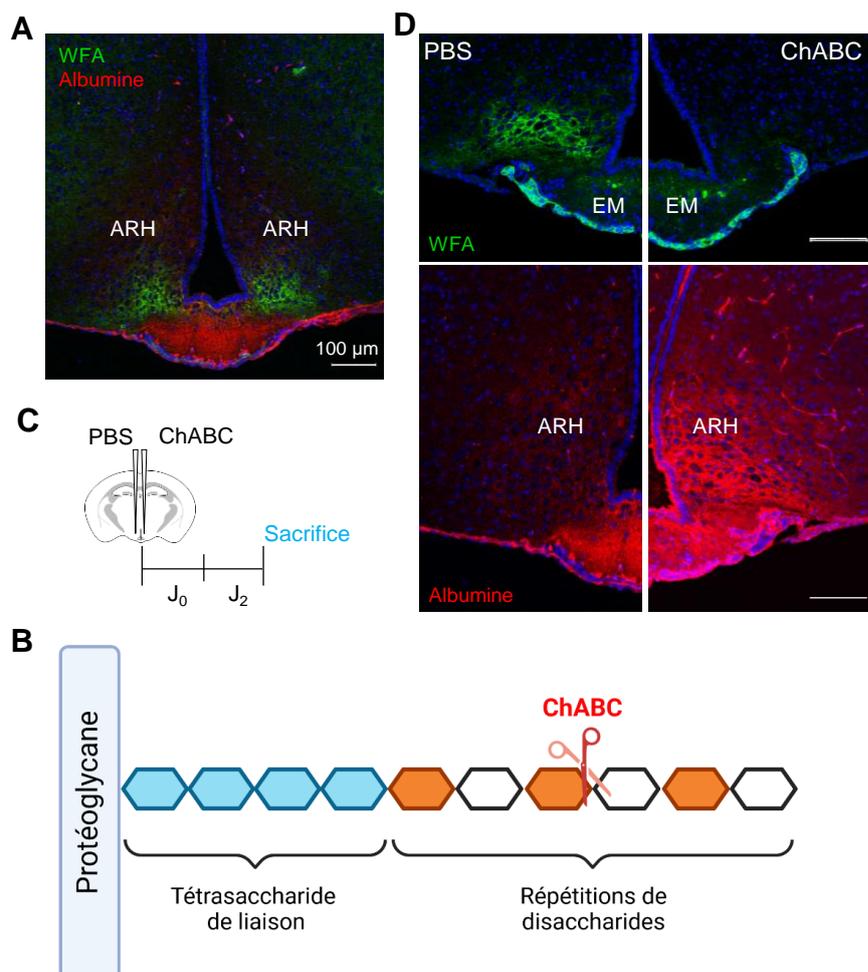


Figure 18 : Le réseau peri-neuronal (PNN) est responsable du blocage de l'albumine à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH)

A. L'albumine est bloquée au niveau du dépôt de PNN présent à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH). Le co-immunomarquage du PNN par la *Wisteria Floribunda* agglutinin (WFA) (en vert) et l'albumine (en rouge) montre la parfaite corrélation entre la limite de diffusion de l'albumine et le dépôt de PNN au niveau de la frontière entre l'EM et l'ARH. **B. Mécanisme d'action de la Chondroïtinase ABC (ChACBC).** La ChABC (en rouge) est une enzyme qui clive les chondroïtine-sulfate glycosaminoglycanes via les liaisons-O liant les N-acétylgalactosamines avec un acide glucuronique. Elle agit entre autres sur les chondroïtine-4-sulfate et les chondroïtines-6-sulfate. **C. Protocole expérimental de la dégradation des CSPGs du PNN par la ChABC et confirmation de cette destruction.** Les souris sont injectées par stéréotaxie en bilatéral au niveau de l'ARH soit avec du PBS pour les contrôles, soit avec la ChABC, et sont sacrifiées deux jours après. **D. Diffusion de l'albumine vers l'ARH après digestion locale du PNN par la ChABC.** Panneau supérieur : Le marquage du PNN par la WFA (en vert) montre une nette diminution du marquage après injection de la ChABC comparé au contrôle injecté avec le PBS. Panneau inférieur : Après digestion du PNN par la ChABC à la frontière entre l'EM et l'ARH, l'albumine diffuse largement vers l'ARH alors qu'elle reste bloquée dans le parenchyme de l'EM chez les animaux contrôles injectés avec le PBS.

2.2. Composition du réseau peri-neuronal à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué

La composition du PNN étant connue pour varier selon la zone du SNC observée, nous avons ensuite déterminé précisément la composition de ce dépôt de PNN dans notre région cérébrale d'intérêt. Pour rappel, le PNN est constitué de CSPGs appartenant majoritairement à la famille des lecticans (ACAN, VCAN, NCAN, BCAN) greffés sur des chaînes d'AH, cette liaison étant stabilisée par les protéines de liaison HAPLNs. L'ensemble de la structure est stabilisé par la TNR. Afin d'établir la composition précise de la MEC localisée à la frontière EM/ARH, un marquage des composants principaux du PNN - à savoir l'AH, les lecticans et la TNR - a été réalisé sur des tranches de cerveau de souris C57BL6/J mâles adultes. L'AH, base de la structure du PNN, est massivement détecté à la frontière entre l'ARH et le VMH et est également détecté dans le parenchyme de l'EM. Tout comme l'AH, la TNR est détectée dans le parenchyme de l'EM. Nous la retrouvons également exprimée de façon diffuse dans l'ARH.

Enfin, parmi les lecticans, alors que le VCAN n'est pas (ou très faiblement) détecté dans cette région médio-basale de l'hypothalamus, le BCAN est détecté dans le parenchyme de l'EM et le NCAN est fortement exprimé à la frontière entre l'ARH et le VMH. L'ACAN est l'unique composant du PNN parmi ceux analysés dont le patron d'expression correspond à celui du PNN (Figure 19). La spécificité des immunomarquages a été préalablement validée par diverses expériences contrôles. Cette corrélation suggère que l'ACAN, localisé à la frontière entre l'EM et l'ARH, pourrait jouer un rôle dans le blocage de la diffusion des molécules périphériques vers l'ARH.

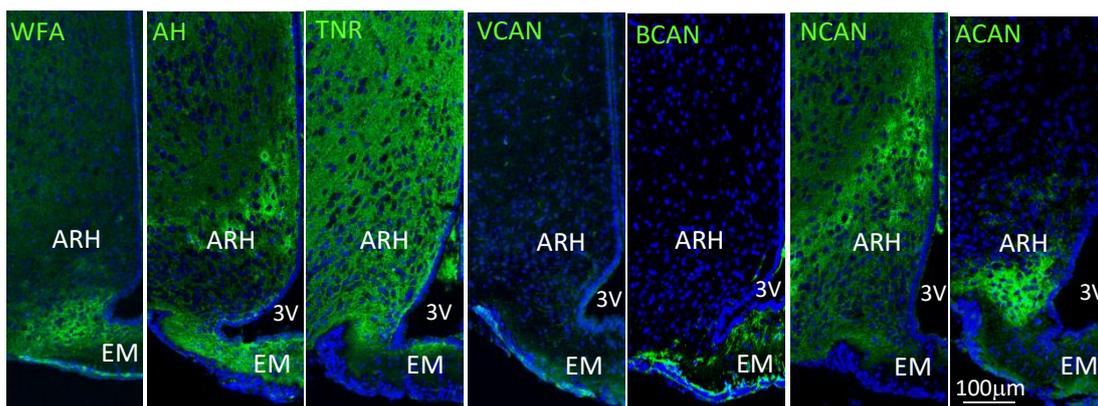


Figure 19 : Composition du réseau peri-neuronal (PNN) à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH)

Corrélation entre le patron d'expression de l'aggrecan et le marquage du PNN. Le PNN présent à la frontière entre l'EM et l'ARH est marqué grâce à la *Wisteria Floribunda Agglutinin* (WFA) (en vert). Le marquage des différents composants principaux du PNN, à savoir l'acide hyaluronique (AH), le neurocan (NCAN), la tenascine R (TNR), le versican (VCAN), et l'aggrecan (ACAN) montre que seul l'ACAN est détecté à la frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué selon le même patron d'expression que le PNN. L'AH et le NCAN sont détectés à la frontière entre l'ARH et le noyau ventromédian de l'hypothalamus (VMH). L'AH est également détectée de façon un peu diffuse dans le parenchyme de l'EM avec la TNR, elle-même détectée de façon diffuse également dans l'ensemble de l'ARH. Le VCAN n'est quant à lui pas, ou très faiblement, détecté dans cette région cérébrale.

2.3. Identification du rôle majeur de l'aggrecan dans la barrière latérale de diffusion

2.3.1. Corrélation entre le dépôt de l'aggrecan et le blocage de la diffusion des molécules

Afin d'établir si l'ACAN pourrait jouer un rôle dans le blocage des molécules à la frontière entre l'EM et l'ARH, nous avons cherché à déterminer si son dépôt correspondait au blocage de la diffusion des molécules périphériques vers l'ARH, comme nous l'avons observé pour le PNN. Un co-marquage de l'ACAN et de l'albumine a été réalisé sur des tranches de cerveau de souris C57BL/6J mâles adultes, et montre que le dépôt d'ACAN correspond parfaitement à la limite de diffusion de l'albumine (Figure 20 A). Ce résultat suggère que l'ACAN pourrait effectivement participer au blocage de la diffusion des molécules circulantes vers l'ARH.

2.3.2. Impact de la réduction du dépôt de l'ACAN sur la diffusion de l'albumine

2.3.2.1. Apport des modèles génétiques d'hypomorphisme et de recombinaison homologue

Dans le but d'établir si le dépôt d'ACAN à la frontière EM/ARH pourrait participer au blocage de la diffusion de molécules circulantes, nous avons étudié la distribution de l'albumine dans notre région d'intérêt dans des modèles murins génétiquement modifiés où le dépôt de l'ACAN est perturbé.

- **Apport d'un modèle hypomorphique pour l'ACAN**

Nous avons d'abord tiré parti du modèle murin hypomorphique pour l'*Acan* (*Acan^{CreERT2}*) précédemment décrit (Alberton et al. 2019). Ce modèle consiste en l'insertion d'une cassette CreERT2 dans la région 3'-UTR du gène codant pour l'*Acan*, menant ainsi à une diminution de la production du protéoglycane.

La quantification du signal de l'ACAN dans notre région d'intérêt réalisée à partir de tranches de cerveaux d'animaux *Acan^{+/+}*; *Acan^{CreERT2/+}* et *Acan^{CreERT2/CreERT2}* immunomarquées pour l'ACAN montre effectivement une diminution du dépôt de l'ACAN chez les animaux *Acan^{CreERT2/+}* et *Acan^{CreERT2/CreERT2}* comparé aux animaux contrôles. Il est intéressant de noter que la diminution est plus forte chez les animaux *Acan^{CreERT2/CreERT2}* (réduction d'environ 73%) que chez les animaux *Acan^{CreERT2/+}* (réduction d'environ 44%), avec une différence de marquage significative entre les animaux contrôles et *Acan^{CreERT2/CreERT2}* ($p = 0.0352$) (Figure 20 B). Ces résultats sont en accord avec la diminution de transcription de l'*Acan* observée par RT-qPCR à partir des microdissections d'EM et d'ARH chez ces animaux (Figure 20 C). On observe également une diminution graduée de la transcription de l'ACAN chez les animaux *Acan^{CreERT2/+}* (environ 17%) et *Acan^{CreERT2/CreERT2}* (environ 58%) comparé aux animaux contrôles, avec une différence significative entre les contrôles et les *Acan^{CreERT2/CreERT2}* ($p = 0.0417$) (Figure 20 C).

Dans ce modèle, l'albumine diffuse vers l'ARH chez les animaux *Acan^{CreERT2/+}* et *Acan^{CreERT2/CreERT2}* alors que, comme attendu, elle reste bloquée dans le parenchyme de l'EM chez les animaux contrôles. De plus, la diffusion de l'albumine semble être proportionnelle au niveau de répression de la transcription de l'*Acan* (Figure 20 D).

- **Apport du modèle de recombinaison homologue pour l'ACAN**

Un second modèle génétique murin a été utilisé pour évaluer l'impact d'une réduction du dépôt d'ACAN sur la diffusion des molécules vers l'ARH. Dans ce modèle, l'inactivation du gène de l'*Acan* a été réalisée par excision de l'exon 5 par recombinaison homologue conduisant à une interruption du cadre de lecture du gène. Les souris homozygotes pour cette mutation (*Acan*^{-/-}) n'étant pas viables, l'ensemble de nos analyses se sont focalisées sur les animaux hétérozygotes (*Acan*^{+/-}) adultes.

Les immunomarquages dirigés contre l'ACAN montrent que la surface couverte par l'ACAN est significativement réduite chez les animaux hétérozygotes *Acan*^{+/-} comparé aux animaux contrôles *Acan*^{+/+}, attestant d'une altération du dépôt d'ACAN à la frontière EM/ARH et validant notre modèle d'étude (Figure 20 E-F). Chez les animaux *Acan*^{+/-}, nous observons une large diffusion de l'albumine vers l'ARH alors que celle-ci reste bloquée dans le parenchyme de l'EM chez les animaux *Acan*^{+/+} (Figure 20 G). Ce deuxième modèle d'altération du dépôt d'ACAN confirme les résultats obtenus chez les animaux hypomorphiques pour l'*Acan*. L'ensemble de ces résultats suggère le rôle crucial joué par l'ACAN dans le blocage de la diffusion des molécules circulantes vers l'ARH.

Toutefois, pour exclure la possibilité d'un effet compensatoire de la répression de l'*Acan* au cours du développement pouvant conduire à une diffusion de l'albumine vers l'ARH, nous avons déterminé l'impact d'une déstabilisation du dépôt de l'ACAN chez les animaux adultes.

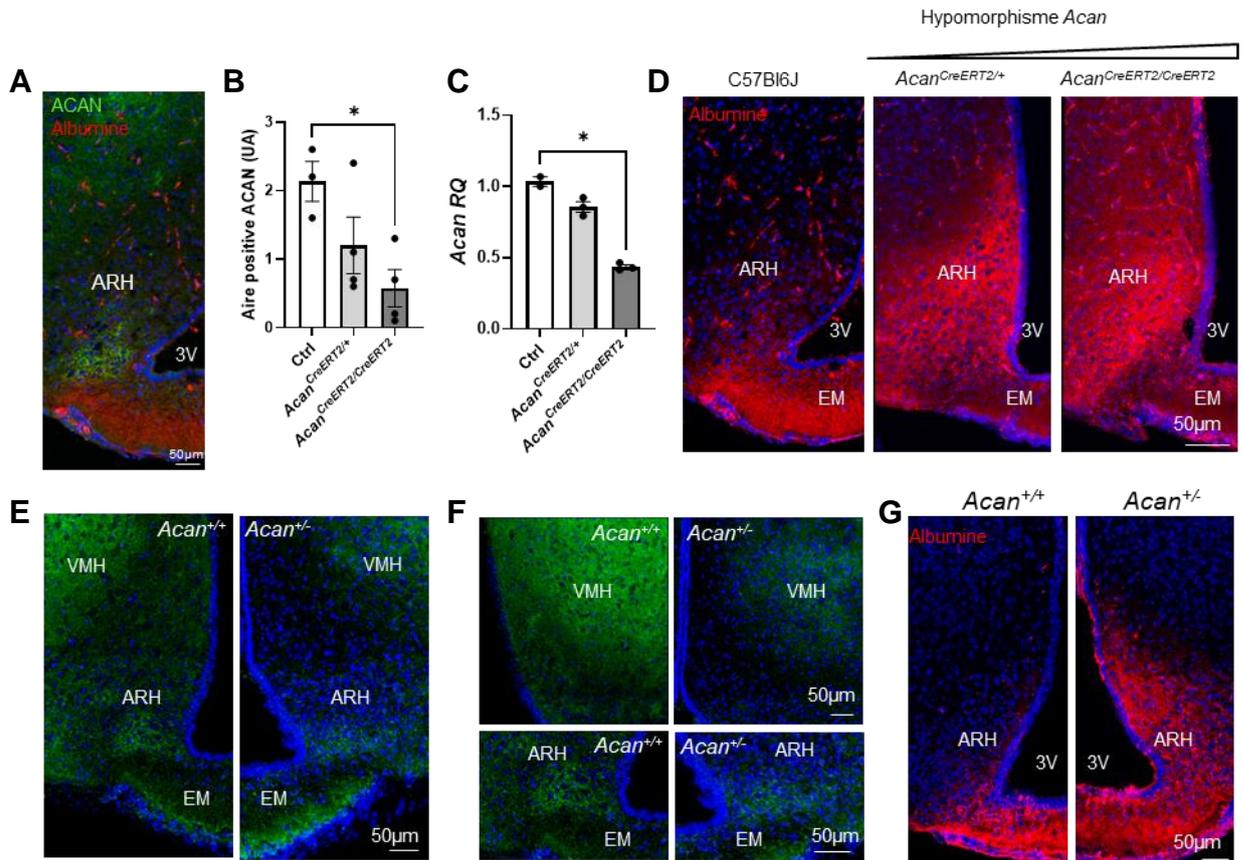


Figure 20 : Altération de l'expression de l'aggrecan (ACAN) dans les modèles génétiques murins

A. L'albumine est bloquée au niveau du dépôt de l'ACAN présent à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH). Le co-immunomarquage de l'ACAN (en vert) et l'albumine (en rouge) montre la parfaite corrélation entre la limite de diffusion de l'albumine et le dépôt d'ACAN au niveau de la frontière entre l'EM et l'ARH. **B-C.** Modèle murin hypomorphique pour l'Acan. Ce modèle consiste en l'insertion d'une cassette CreERT2 dans la région 3'-UTR du gène codant pour l'Acan ($Acan^{CreERT2}$), menant ainsi à une réduction de l'expression de cette protéine **A-B.** Quantification de la diminution de l'expression de l'ACAN dans le modèle murin portant une mutation hypomorphique pour l'Acan. **A.** La surface couverte par le marquage de l'ACAN dans ce modèle est estimée grâce au logiciel ImageJ. Les résultats montrent une diminution significative du marquage de l'ACAN chez les animaux homozygotes comparé aux animaux contrôles (One-way ANOVA, comparaison multiple ; $p = 0.0352$). **B.** Quantification de l'expression de l'ACAN par qPCR dans le modèle d'hypomorphisme pour l'Acan. A partir des ARN extraits des microdissections d'EM et ARH des cerveaux des animaux portant la mutation hypomorphique pour l'Acan, la technique de qPCR est utilisée pour quantifier le niveau d'expression de l'Acan. Les résultats obtenus sont en adéquation avec l'estimation de la surface marquée par l'ACAN, à savoir que celui-ci est significativement moins exprimé chez les animaux homozygotes comparé aux animaux contrôles (Kruskal-Wallis, comparaison multiple de Dunn ; $p = 0.0417$). **C.** Confirmation du rôle joué par l'ACAN dans le blocage des molécules à la frontière entre l'EM et l'ARH grâce au modèle murin de mutation hypomorphique pour l'Acan Le marquage de l'albumine (rouge) montre que chez les animaux hétérozygotes ($CreERT2/+$) ou homozygotes ($CreERT2/CreERT2$), l'albumine diffuse largement vers l'ARH, contrairement au contrôle (C57BL/6J) où elle reste bloquée dans le parenchyme de l'EM. De plus, la diffusion de cette molécule semble proportionnelle au niveau de répression de la transcription de l'Acan. **D-F.** Invalidation partielle de gène codant pour l'Acan par recombinaison homologe. **D-E.** Diminution de l'expression de l'ACAN dans ce modèle. L'immunomarquage de l'ACAN (vert) montre que son signal est réduit de façon très importante chez les animaux hétérozygotes $Acan^{+/-}$ comparé aux animaux contrôles $Acan^{+/+}$. Le panneau E est un agrandissement du panneau D. **F.** Confirmation du rôle joué par l'ACAN dans le blocage des molécules à la frontière entre l'EM et l'ARH grâce au modèle murin recombinaison homologue pour l'Acan. L'immunomarquage de l'albumine (rouge) montre que celle-ci diffuse largement vers l'ARH lorsque la dépôt d'ACAN est altéré ($Acan^{+/-}$) alors qu'elle reste bloquée dans le parenchyme de l'EM lorsque le dépôt d'ACAN est intact ($Acan^{+/+}$).

2.3.2.2. *Impact de la destruction enzymatique de l'aggrecan chez l'animal adulte*

Notre objectif étant de cibler la dégradation spécifique de l'ACAN pour évaluer l'impact de sa déstabilisation sur la diffusion des molécules périphériques vers l'ARH, nous avons porté notre choix sur une enzyme ayant une activité aggrecanase : l'ADAMTS-5. Comme décrit précédemment pour les expériences impliquant la ChABC, l'ADAMTS-5 est injectée par stéréotaxie en bilatéral au niveau de l'ARH chez des souris C57BL/6J mâles adultes alors que les animaux contrôles reçoivent des injections de PBS 1X. Les animaux sont sacrifiés 48 heures après l'injection intracérébrale (Figure 21 A).

Dans un premier temps, l'efficacité de cette enzyme pour la dégradation de l'ACAN dans la zone cérébrale d'intérêt a été vérifiée par immunomarquage sur des coupes de cerveaux. Ainsi, après injection de l'ADAMTS-5, le marquage pour l'ACAN diminue de façon significative d'environ 67% par rapport au contrôle ($p = 0.0002$) (Figure 21 B). De plus, de la même manière qu'après digestion avec la ChABC, l'albumine diffuse largement vers l'ARH après injection de l'ADAMTS-5 alors qu'elle reste bloquée dans le parenchyme de l'EM chez les animaux contrôles (Figure 21 C).

D'autre part, les injections d'ADAMTS-5 n'ont pas clairement altéré les dépôts d'AH, de NCAN et de TNR (Figure 22 A) indiquant que l'ADAMTS-5 agit spécifiquement sur l'ACAN dans cette région. D'autre part, nous avons également analysé l'intégrité de la BHE présente au niveau des capillaires de l'ARH, et de la barrière EM/LCR, formée par les jonctions serrées tanycyaires, suite à l'injection d'ADAMTS-5 dans notre région d'intérêt. En effet, une altération de l'une et/ou l'autre de ces barrières pourrait conduire à une interprétation erronée des observations. Pour cela, nous avons réalisé un co-marquage de ZO-1 - marqueur des jonctions serrées - ainsi que du collagène IV - marqueur de la membrane basale des vaisseaux - sur des tranches de cerveau d'animaux contrôles et injectés avec l'aggrecanase. Les jonctions serrées étant détectées au niveau des vaisseaux de l'ARH ainsi qu'au niveau des tanycytes aussi bien chez les animaux contrôles que chez les animaux injectés avec l'ADAMTS-5, (Figure 22 B) nous pouvons donc conclure que l'ADAMTS-5 n'a pas altéré les jonctions serrées ni de la BHE ni de la barrière tanycytaire indiquant que ces deux barrières sont restées fonctionnelles.

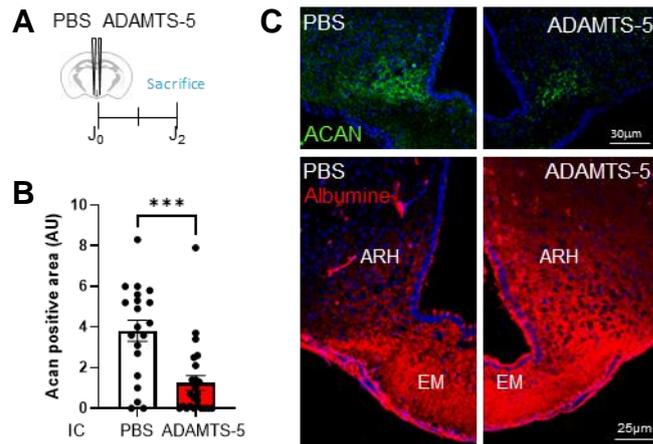


Figure 21 : L'aggrecan (ACAN) est responsable du blocage des molécules à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH)

A. Protocole expérimental de la destruction de l'ACAN par l'aggrecanase ADAMTS-5. Les souris sont injectées par stéréotaxie en bilatéral au niveau de l'ARH soit avec du PBS pour les contrôles, soit avec l'ADAMTS-5, et sont sacrifiées deux jours après. **B.** Quantification de la diminution du marquage de l'ACAN après digestion par l'ADAMTS-5. La quantification du marquage de l'ACAN à l'aide du logiciel ImageJ montre une diminution significative de celui-ci après injection de l'ADAMTS-5 (Mann-Whitney ; $p = 0.0002$). **C.** Diffusion de l'albumine après digestion de l'ACAN par l'ADAMTS-5. Panneau supérieur : Le marquage de l'ACAN (en vert) est nettement diminué après injection de l'ADAMTS-5 comparé au contrôle. Panneau inférieur : Après digestion de l'ACAN par l'ADAMTS-5 à la frontière entre l'EM et l'ARH, l'albumine (rouge) diffuse largement vers l'ARH alors qu'elle reste bloquée dans le parenchyme de l'EM chez les animaux contrôles injectés avec le PBS.

De façon intéressante, dans le modèle d'injection par stéréotaxie de la ChABC (Figure 23 A), nous observons une diminution significative d'environ 64% du marquage de l'ACAN après l'infusion de cette enzyme ($p = 0.0425$) (Figure 23 B), bien que cette dernière ne possède pas d'activité protéase. Cette observation inattendue suggère que la diffusion de l'albumine dans l'ARH (Figure 23 C), consécutive à l'injection de ChABC, pourrait être liée à une déstabilisation de l'ACAN. Dans ce même modèle, nous observons également une diminution massive du marquage pour l'AH et pour le NCAN indiquant que la ChABC a totalement déstabilisé l'organisation matricielle dans cette région cérébrale (Figure 22 C).

L'ensemble de ces résultats montre que l'ACAN joue un rôle majeur dans le blocage de la diffusion des molécules vers l'ARH. L'importance de l'ACAN pour le blocage de la diffusion des molécules circulantes du parenchyme de l'EM vers l'ARH étant établie, nous nous sommes intéressés au rôle physiologique de cette barrière.

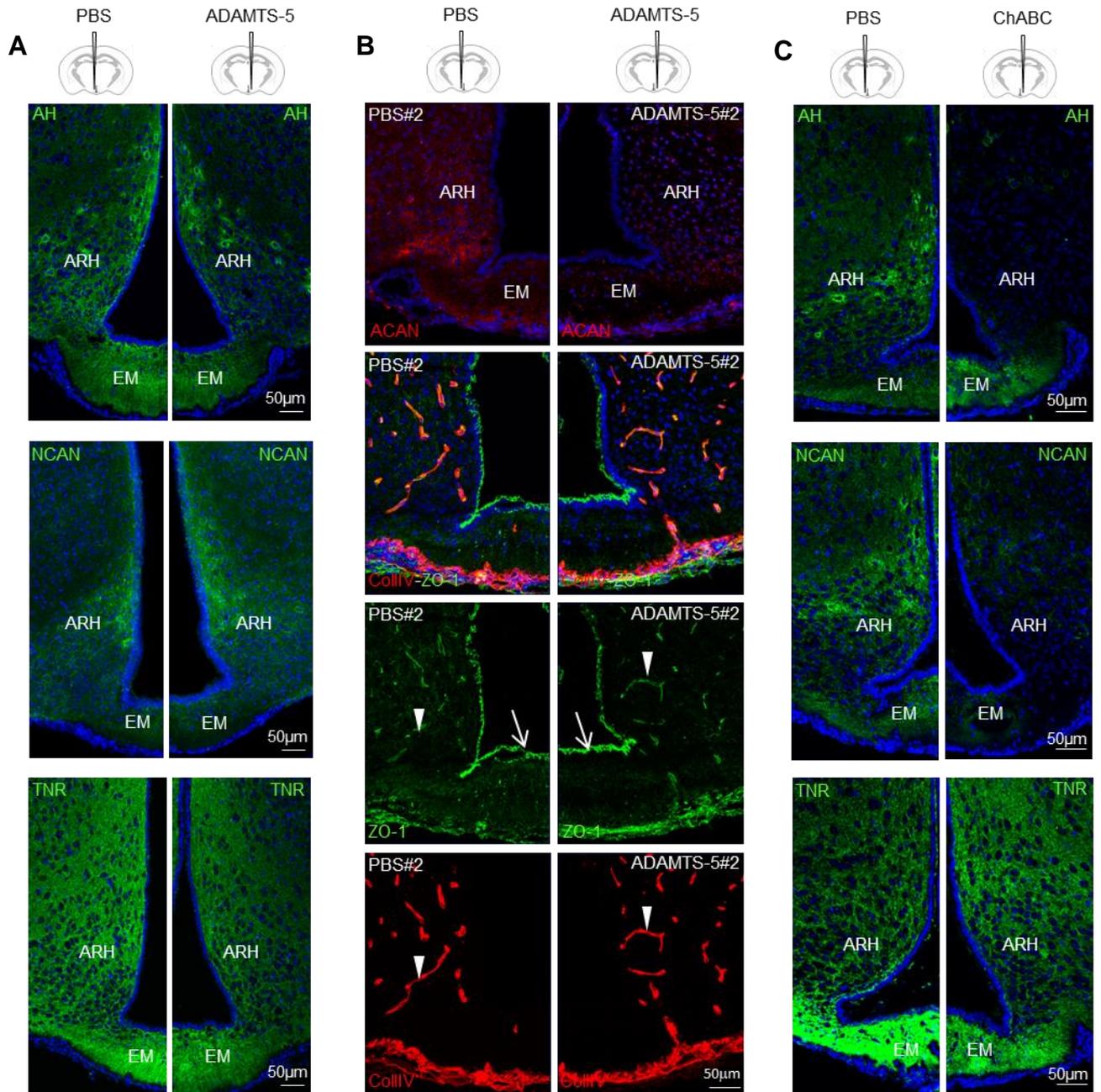


Figure 22 : L'aggrecanase ADAMTS-5 est spécifique pour l'aggrecan (ACAN)

A. La chondroïtinase ABC (ChABC) digère l'acide hyaluronique (AH), affectant de ce fait tous les chondroïtines sulfates sans distinction. Après l'injection intracérébrale de la ChABC, l'acide hyaluronique (AH) est dégradé par l'activité hyaluronidase de la ChABC. L'AH étant le support de l'architecture du PNN, le neurocan (NCAN) n'est de ce fait plus détectable non plus. Seule la tenascine R (TNR) ne semble pas affectée par la ChABC. **B.** L'ADAMTS-5 n'altère aucun autre composant du réseau peri-neuronal (PNN). Après l'injection intracérébrale de l'ADAMTS-5, ni l'AH ni le NCAN ni la TNR ne sont dégradés par l'aggrecanase. **C.** L'ADAMTS-5 n'affecte ni la barrière tancytaire ni la barrière hématoencéphalique (BHE). Après injection intracérébrale de l'ADAMTS-5, le marquage de l'ACAN (en rouge, premier panneau) est réduit par rapport au contrôle. Toutefois, l'injection de l'enzyme n'a pas eu d'impact sur le marquage de ZO-1 (en vert, troisième panneau), marqueur des jonctions serrées présentes entre les tancytes qui bordent le 3^{ème} ventricule et qui forment la barrière tancytaire, ou présentes au niveau des vaisseaux sanguins du noyau arqué (colocalisation des marquages ZO-1 et Collagène IV (Coll IV, en rouge, deuxième et quatrième panneaux) marqueur des cellules endothéliales.

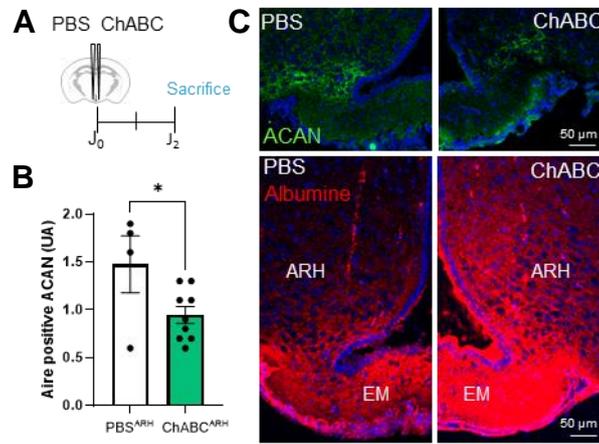


Figure 23 : La chondroïtinase ABC (ChABC) déstabilise l'ensemble du réseau peri-neuronal (PNN)

A. Protocole expérimental de la digestion locale du PNN par la ChABC. Les souris sont injectées par stéréotaxie en bilatéral au niveau de l'ARH soit avec du PBS pour les contrôles, soit avec la ChABC, et sont sacrifiées deux jours après. **B.** Quantification de la diminution du marquage de l'ACAN après digestion par la ChABC. La surface couverte par le marquage de l'ACAN chez les animaux injectés par stéréotaxie avec la ChABC comparé aux animaux contrôles (test t non païré ; $p = 0.0425$). **C.** Diffusion de l'albumine vers l'ARH après l'altération indirecte locale de l'ACAN par la ChABC. Panneau supérieur : Le marquage de l'ACAN (en vert) est nettement diminué après injection de la ChABC comparé au contrôle injecté avec le PBS. Panneau inférieur : Après l'altération indirecte du dépôt d'ACAN par la ChABC à la frontière entre l'EM et l'ARH, l'albumine diffuse largement vers l'ARH alors qu'elle reste bloquée dans le parenchyme de l'EM chez les animaux contrôles.

Partie 2 : Etude du rôle physiologique de la barrière latérale de diffusion

Dans la partie précédente, il a été montré que le PNN, et plus précisément l'**ACAN**, joue un rôle primordial dans le blocage des molécules à la frontière entre l'EM et l'ARH. Nous avons également mis au point un modèle de digestion enzymatique du dépôt d'ACAN par injection stéréotaxique de l'aggrecanase ADAMTS-5, permettant de ce fait d'étudier le rôle de la BLD. Cette barrière est capable de bloquer des molécules dont le poids moléculaire est supérieur ou égal à 3 kDa (équivalent au poids moléculaire de la ghréline). Des études ont montré que le PNN impacte l'activité électrique des neurones qu'il entoure en modifiant leur réponse aux molécules circulantes (Wingert and Sorg 2021). Cette partie vise à déterminer si cette BLD joue un rôle physiologique dans la régulation de la prise alimentaire et si elle peut être modulée par le statut métabolique, modifiant ainsi les réponses des neurones aux hormones métaboliques circulantes.

1. Importance et plasticité de l'aggrecan pour la régulation de la prise alimentaire

Dans le but de déterminer si la barrière joue un rôle dans la régulation de la prise alimentaire, nous avons quantifié la nourriture ingérée par des souris C57BL/6J non injectées, ou ayant été injectées en intracérébral avec du PBS ou de l'ADAMTS-5 en bilatéral au niveau de l'ARH (PBS^{ARH} et ADAMTS-5^{ARH}) après un jeûne nocturne de 16 heures, imposé le lendemain de l'infusion cérébrale. La quantité de nourriture ingérée par ces animaux a été mesurée sur une période de 2 heures après le jeûne (Figure 24 A). Les résultats montrent que la prise alimentaire des animaux non injectés et des animaux PBS^{ARH} sont équivalentes, indiquant ainsi que l'injection stéréotaxique elle-même n'influence pas la prise alimentaire. En revanche, les animaux ADAMTS-5^{ARH} mangent environ 40% plus que les animaux non injectés ou injectés avec le PBS dans l'ARH ($p = 0.0391$ et $p = 0.0334$ respectivement) (Figure 24 B). Ces résultats montrent que l'ACAN est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire.

De façon intéressante, un article a récemment montré que le PNN localisé dans le parenchyme de l'EM est plastique en fonction du statut métabolique de l'animal (Kohnke et al. 2021). Nous avons donc cherché à déterminer si le dépôt d'ACAN localisé à la frontière EM/ARH est également plastique en fonction du statut alimentaire de l'animal, et donc si cette BLD est capable de s'adapter dans le but de réguler la prise alimentaire. Pour cela, nous avons étudié l'expression et le dépôt de l'ACAN dans la région EM/ARH chez des animaux nourris, mis à jeun, et renourris 4 heures après un jeûne de 16 heures.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la variation de l'expression de l'*Acan* lors de la mise à jeun des animaux. Pour cela, les EM et ARH des animaux nourris, à jeun et renourris ont été microdisséqués, et les ARNs totaux de ces tissus ont été extraits afin de procéder à une analyse par qPCR des niveaux d'expression des différents composants du PNN (données non montrées dans ce manuscrit). Nous avons alors constaté que l'expression d'ARN codant pour l'*Acan* augmente significativement chez les animaux à jeun comparé aux animaux nourris ($p = 0.0007$). De façon intéressante, nous n'observons pas de différence significative de l'expression de l'*Acan* entre les animaux nourris et renourris, indiquant que l'expression de l'*Acan* chez les animaux renourris tend à revenir au niveau basal (Figure 24 C, gauche).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression protéique de l'ACAN entre ces différents groupes en analysant le patron d'expression de ce PG par immunomarquage. En accord avec les résultats obtenus par qPCR décrits ci-dessus, l'estimation de la surface couverte par le marquage de l'ACAN montre une augmentation significative de 30% ($p=0.0049$) de la surface couverte par l'ACAN chez les animaux mis à jeun comparé aux animaux nourris, ainsi qu'une tendance du retour au niveau basal chez les animaux renourris (Figure 24 C, droite). Nous avons observé que l'augmentation de la surface couverte par l'ACAN se caractérise par une extension dorsale de ce CSPG chez les animaux à jeun (Figure 24 D).

De façon intéressante, la ré-analyse bio-informatique de données de séquençage sur cellule unique de la région EM/ARH (Campbell et al. 2017) montre que l'expression de l'*Acan* par les neurones NPY varie en fonction du statut métabolique, et a permis l'identification d'une sous-population particulière de neurones NPY n'exprimant l'*Acan* qu'en état de jeûne (Figure 24 E). Or l'immunomarquage de l'ACAN sur des tranches de cerveau de souris NPY-GFP (exprimant la protéine fluorescente verte GFP dans les neurones à NPY spécifiquement) montre qu'à l'état basal nourri le dépôt d'ACAN est accumulé autour des neurones NPY les plus ventraux de l'ARH, alors que l'extension dorsale du patron d'expression de l'ACAN observé ci-dessus lors de l'état de jeûne inclut des neurones NPY localisés plus dorsalement (Figure 24 D, encart). Le comptage du nombre de neurones NPY enchâssés dans l'ACAN augmente d'ailleurs plus de 2.5 fois ($p = 0.0286$) chez les animaux mis à jeun comparé aux animaux nourris (Figure 24 F).

En accord avec l'ensemble de ces résultats, des résultats de RNAscope, réalisé avec des sondes dirigées contre l'*Acan* et le *Npy* sur des tranches de souris nourries ou mises à jeun montrent que l'*Acan* est bien plus exprimé en condition de jeûne qu'à l'état basal

nourri. De plus, l'expression de l'*Acan* et du *Npy* semblent colocaliser (Figure 24 G). Une deuxième expérience de RNAscope opposant soit la co-hybridation de sondes dirigées contre l'*Acan* et le *Npy*, soit la co-hybridation de sondes dirigées contre l'*Acan* et la *Pomc* permet de confirmer que l'*Acan* est synthétisé par les neurones à NPY et non par les neurones à POMC (Figure 24 H).

L'ensemble de ces résultats montre que la BLD joue un rôle dans la prise alimentaire, et que le dépôt d'ACAN à la frontière entre l'EM et l'ARH subit un remodelage et s'adapte en fonction du statut alimentaire des animaux. Cela suggère que la barrière formée par le dépôt d'ACAN joue un rôle dans la régulation de la prise alimentaire, en particulier en régulant l'accès des signaux métaboliques circulants tels que la ghréline ou la leptine aux neurones à NPY. C'est pourquoi nous nous sommes attachés, dans la suite des résultats, à découvrir le rôle joué par l'ACAN dans la réponse des neurones de l'ARH et en particulier les neurones à NPY à ces deux hormones métaboliques périphériques.

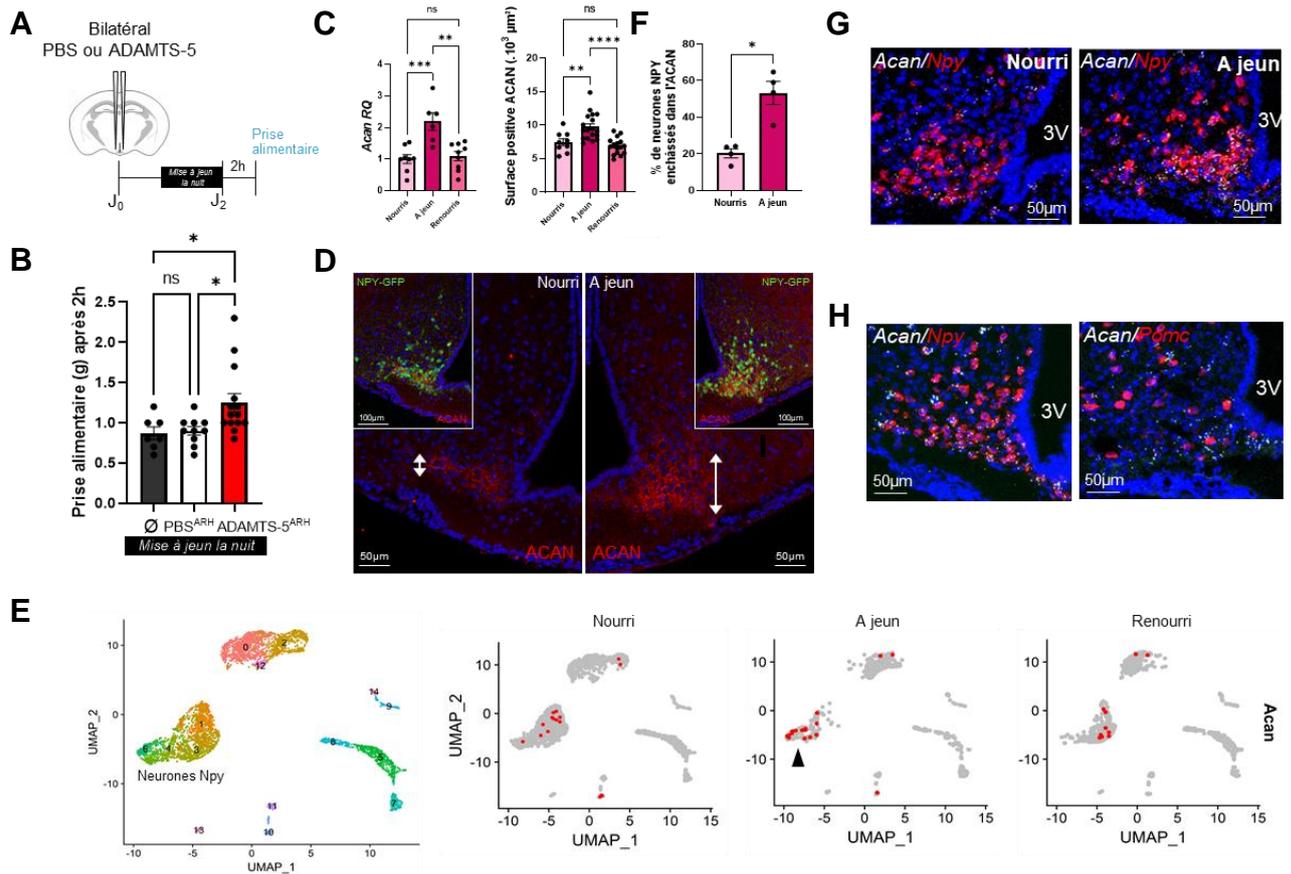


Figure 24 : Plasticité de la barrière latérale de diffusion en fonction du statut métabolique alimentaire de l'animal ; Importance de cette barrière dans la prise alimentaire

A. Protocole expérimental de la mesure de la prise alimentaire après destruction de la barrière. Les animaux sont mis à jeun sur la nuit le lendemain de l'injection intracérébrale de PBS ou d'ADAMTS-5 au niveau de l'ARH. Le lendemain de la mise à jeun, la prise alimentaire est mesurée chez les animaux pendant 2 heures. **B. Augmentation de la prise alimentaire après dégradation du dépôt d'ACAN.** La prise alimentaire est comparable chez les animaux n'ayant reçu aucune injection et ceux injectés avec du PBS, mais est significativement plus élevée chez les animaux dont la barrière a été détruite par rapport à ces deux groupes (Kruskal-Wallis, comparaison multiple de Dunn ; $p = 0.0391$ et $p = 0.0334$ respectivement). **C. Variation de la production d'aggrécane (ACAN) en fonction du statut métabolique de l'animal.** Panneau de gauche : L'analyse par qPCR de la production d'AcAn à partir des éminences médianes (EM) et noyau arqué (ARH) microdisséqués sur des cerveaux de souris nourries, mises à jeun ou renourries 4 heures montre une augmentation significative de la synthèse d'AcAn chez les animaux mis à jeun comparé aux animaux nourris (One-way ANOVA, comparaison multiple ; $p = 0.0007$). En revanche elle tend à revenir au niveau basal chez les animaux renourris. Aucune différence significative observée entre les animaux renourris et nourris (One-way ANOVA, comparaison multiple ; $p = 0.9243$). Panneau de droite : La surface couverte par le marquage de l'ACAN est estimée en détournant ce marquage à l'aide de l'outil « polygone » du logiciel Zen. Les résultats montrent une augmentation significative de la surface marquée par l'ACAN chez les animaux à jeun comparé aux animaux nourris (One-way ANOVA, comparaison multiple ; $p = 0.0049$) et un retour à l'état basal chez les animaux renourris chez lesquels le dépôt d'ACAN est comparable à celui observé chez les animaux nourris (One-way ANOVA, comparaison multiple ; $p = 0.6775$). **D. Le dépôt d'ACAN s'étend dorsalement chez les animaux à jeun.** L'immunomarquage de l'ACAN (rouge) chez des animaux nourris et à jeun montre une modification du patron d'expression de l'ACAN qui s'étend dorsalement chez les animaux à jeun. La même expérience faite chez des animaux NPY-GFP montre que l'ACAN entoure des neurones NPY localisés plus dorsalement dans le noyau arqué. **E. Analyse bio-informatique d'un jeu de données de single cell (Campbell) en fonction du statut métabolique alimentaire de l'animal.** Cette analyse de données met en évidence une sous-population de neurones NPY exprimant l'AcAn uniquement lorsque l'animal est à jeun. **F. Augmentation du nombre de neurones NPY enchâssés dans l'ACAN chez l'animal mis à jeun.** Le comptage du nombre de neurones NPY enchâssés dans l'ACAN en fonction du statut métabolique de l'animal montre que celui-ci augmente plus de 2.5 fois si l'animal est à jeun comparé aux animaux nourris. (Mann-Whitney ; $p = 0.0286$). **G. Patron d'expression de l'ARNm codant pour l'AcAn en fonction du statut métabolique alimentaire de l'animal obtenu par RNAscope.** La co-hybridation des sondes dirigées contre l'AcAn (en blanc) et le Npy (en rouge) montre une augmentation de l'AcAn lors de la mise à jeun, et l'expression de l'AcAn colocalise avec celle du Npy. **H. Patron d'expression de l'ARNm codant pour l'AcAn obtenu par RNAscope.** La co-hybridation des sondes dirigées contre l'AcAn (blanc) et la Pomc (rouge) dans le panneau inférieur) montre que les ARNm codant pour l'AcAn sont totalement exclus des neurones exprimant la Pomc.

2. Impact de la dégradation de l'aggrecan sur la réponse centrale à la ghréline

La ghréline est une hormone de petite taille (3 kDa) ayant une action orexigène, c'est-à-dire qui promeut la prise alimentaire. Elle est sécrétée principalement par l'estomac en réponse au jeûne et agit en activant les neurones NPY/AgRP pour induire la prise alimentaire. Afin d'évaluer l'importance de la BLD pour l'activation des neurones NPY par la ghréline, et donc son impact sur la prise alimentaire, nous avons évalué la prise alimentaire et l'activation neuronale suite à l'injection de ghréline avec (ADAMTS-5^{ARH}) ou sans (PBS^{ARH}) digestion du dépôt d'ACAN à la frontière entre l'EM et l'ARH (Figure 25 A). Ces expériences ont été réalisées avec des souris mâles adultes C57BL/6J et NPY-GFP. Dans nos analyses, seuls les animaux dont la barrière a été détruite au moins en partie (réduction du marquage pour l'ACAN et diffusion de l'albumine observés par immunomarquage) ont été considérés.

2.1. Impact de la dégradation de l'aggrecan sur l'effet orexigène de la ghréline

Au bout de 30 minutes après l'injection intrapéritonéale de ghréline, les animaux ADAMTS-5^{ARH} mangent environ 2 fois plus que les animaux PBS^{ARH} ($p = 0.0038$) (Figure 25 B). Ces résultats indiquent que la dégradation de l'ACAN favorise l'effet orexigène de la ghréline, qui pourrait être dû à une activation neuronale accrue dans cette zone cérébrale suite à l'injection de la ghréline.

2.2. Impact de la dégradation de l'aggrecan sur l'activation neuronale dans l'ARH suite à l'injection de ghréline

La prise alimentaire est médiée par l'activation des neurones à NPY de l'ARH par la ghréline (Tschop et al. 2000; Valassi, Scacchi, and Cavagnini 2008). La prise alimentaire étant augmentée de façon significative après la dégradation du dépôt d'ACAN entourant les neurones à NPY à la frontière EM/ARH, nous avons analysé l'activation des neurones de l'ARH avec ou sans destruction de ce dépôt d'ACAN. Pour cela, nous avons utilisé le marquage c-fos, qui correspond à un marqueur d'activation neuronale (Herrera and Robertson 1996) (Figure 25 C). Les neurones c-fos positifs situés dans la partie ventrale de l'ARH (correspondant aux neurones NPY) et ceux situés dans la partie dorsale de l'ARH ont été dénombrés dans chaque condition. Après comptage, aucune différence significative du nombre de neurones c-fos positifs dans la partie ventrale de l'ARH n'a pu être observée ($p = 0.0801$) (Figure 25 D, haut). En revanche, le nombre de neurones

activés dans la partie dorsale de l'ARH est significativement plus élevé chez les animaux ADAMTS-5^{ARH} que chez les animaux PBS^{ARH} ($p = 0.0085$) (Figure 25 D, bas).

2.3. Identification des neurones activés dans la partie dorsale de l'ARH après dégradation de l'aggrecan et injection de ghréline

Compte tenu de leur localisation dans l'ARH, les neurones dorsaux activés en réponse à l'injection de ghréline chez les animaux ADAMTS-5^{ARH} ne correspondent pas à des neurones NPY. Nous avons donc cherché à identifier cette population neuronale. Une étude transcriptomique a permis de lister l'ensemble des populations neuronales présentes dans l'hypothalamus, dont les neurones exprimant la tyrosine hydroxylase. Ces neurones ont été précédemment décrits comme présentant à leur surface le récepteur pour la ghréline et comme étant impliqué dans la prise alimentaire. Dans le but de déterminer si les neurones activés en réponse à la ghréline dans la partie dorsale de l'ARH chez les animaux ADAMTS-5^{ARH} correspondent aux neurones à TH, nous avons réalisé un co-marquage c-fos/TH sur ces animaux. Ce co-marquage montre une corrélation entre les neurones activés dans la partie dorsale de l'ARH chez les animaux ADAMTS-5^{ARH} et les neurones à TH (Figure 25 E). Toutefois, il est intéressant de noter que les neurones à TH ne représentent qu'une partie des neurones c-fos positifs dans la partie dorsale de l'ARH, indiquant qu'il existe d'autres populations neuronales activées suite à l'injection de ghréline lorsque le dépôt d'ACAN est détruit.

Ce même co-marquage c-fos TH réalisé sur des souris NPY-GFP – exprimant la GFP dans les neurones à NPY – nous a permis d'affirmer que la population de neurones à TH identifiée dans la partie dorsale de l'ARH est distincte de celle des neurones à NPY localisés dans la partie ventrale de l'ARH. De plus, l'observation de neurones double positifs c-fos/GFP montre que les neurones activés dans la partie ventrale de l'ARH chez les animaux PBS^{ARH} et ADAMTS-5^{ARH} en réponse à la ghréline correspondent bien aux neurones NPY (Figure 26).

Afin de déterminer si l'activation de ces neurones à TH est due à une action directe de la ghréline ou à un effet trans-synaptique, nous avons réalisé un marquage de la protéine mTOR phosphorylée (pmTOR), dont l'importance dans la voie de signalisation de la ghréline a été décrite (Martins et al. 2012). Le co-marquage pmTOR/TH confirme que les neurones à TH expriment p-mTOR suggérant qu'ils sont directement activés par la ghréline (Figure 25 F).

Pris dans leur ensemble, ces résultats suggèrent que si la BLD ne semble pas indispensable pour l'activation des neurones NPY par la ghréline, elle permet toutefois de ralentir la diffusion de celle-ci. Cette activation de neurones supplémentaires dans la partie dorsale de l'ARH suite à la déstabilisation de la barrière semble pouvoir expliquer au moins en partie l'augmentation de la prise alimentaire chez ces individus, confirmant ainsi l'implication de la BLD dans la régulation physiologique de la prise alimentaire. Toutefois, nous pouvons également conclure que le nombre de neurones NPY activés étant semblable en présence ou en absence de la barrière, celle-ci n'est pas nécessaire pour l'activation des neurones NPY par la ghréline. Dans le but de déterminer s'il en est de même pour la leptine, nous sommes intéressés par la suite à l'importance de la BLD pour la réponse des neurones de l'ARH à la leptine.

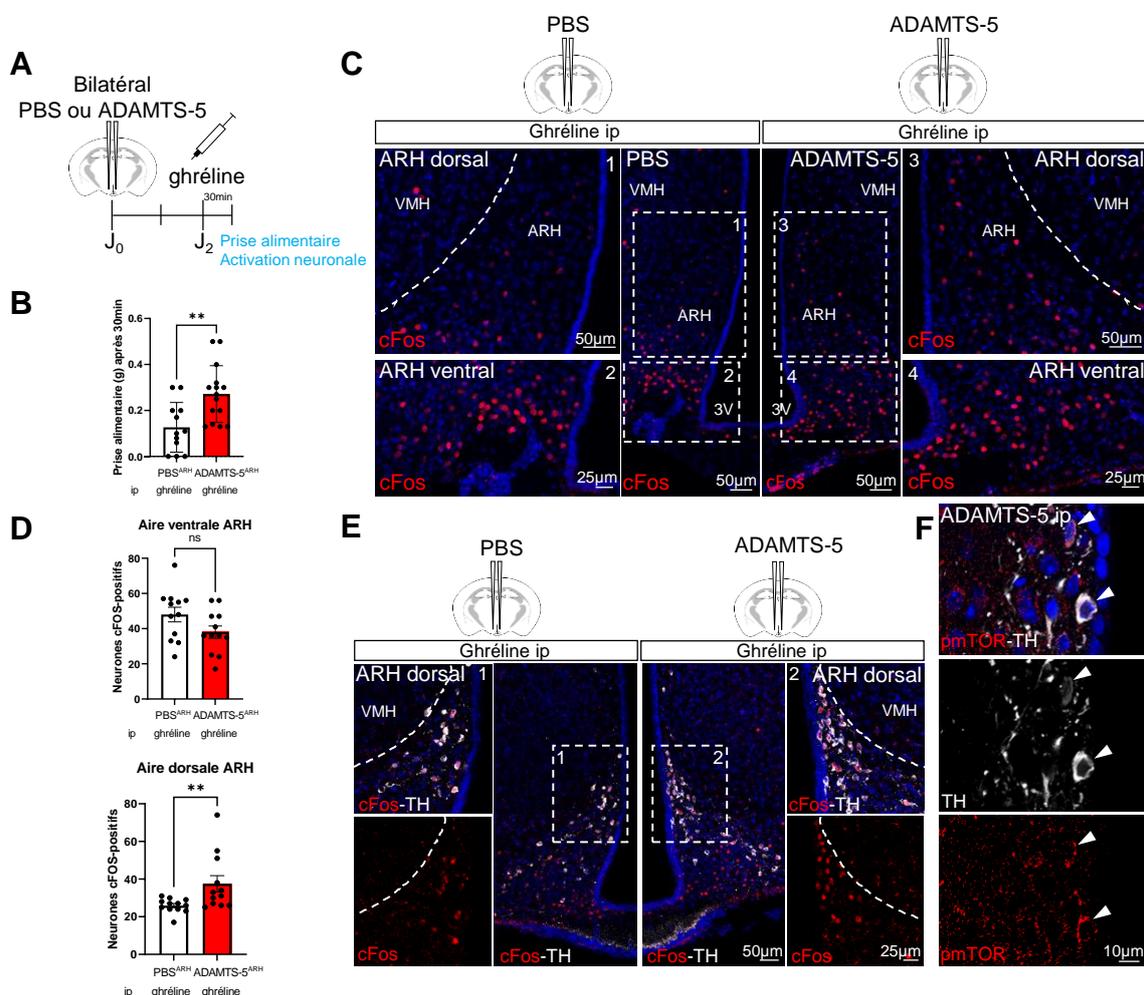


Figure 25 : Rôle de la barrière latérale de diffusion à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH) dans la réponse de la ghréline

A. Protocole expérimental du challenge ghréline. 48 heures après l'injection intracérébrale d'ADAMTS-5 ou PBS pour les contrôles, les animaux sont injectés en intrapéritonéal avec de la ghréline (2 mg/kg). A partir de l'injection de ghréline, la prise alimentaire est mesurée sur 30 minutes avant sacrifice de l'animal. **B. Mesure de la prise alimentaire après injection intrapéritonéale de ghréline.** Les animaux dont la barrière a été déstabilisée par l'ADAMTS-5 mangent environ 2 fois plus que les animaux contrôles dont la barrière est intacte. (test t non païré ; $p = 0.0038$). **C. Analyse de l'activation neuronale dans l'ARH en réponse à l'injection de ghréline.** L'immunomarquage de cFos (rouge), marqueur de l'activation neuronale, montre une activation comparable entre les animaux

contrôles et ceux injectés avec l'ADAMTS-5 dans la partie ventrale de l'ARH, mais plus importante dans la partie dorsale de l'ARH après destruction de la barrière. **D. Comptage du nombre de neurones cFos+ activés dans l'ARH en réponse à l'injection de ghréline.** Panneau supérieur : Les comptages des neurones cFos+ confirment que le nombre de neurones activés dans la partie ventrale de l'ARH après injection de ghréline est similaire en présence ou en absence de barrière (test t non pairé ; $p = 0.0801$). Panneau inférieur : Le nombre de neurones activés dans la partie dorsale de l'ARH après l'injection de ghréline est significativement supérieur lorsque la barrière est détruite (Mann-Whitney ; $p = 0.0085$). **E. Identification des neurones activés dans la partie dorsale de l'ARH après injection de la ghréline.** L'immunomarquage de la tyrosine hydroxylase (TH ; en blanc) montre qu'au moins une partie des neurones cFos+ (en rouge) localisés dans la partie dorsale de l'ARH, en présence (PBS) ou en absence (ADAMTS-5) de barrière, est également TH+. **F. Les neurones TH+ localisés dans la partie dorsale de l'ARH sont activés par action directe de la ghréline.** L'immunomarquage de la protéine mTOR phosphorylée (pmTOR ; en rouge), présente en amont de la voie de signalisation de la ghréline, correspond aux neurones TH+ activés après injection de la ghréline chez les animaux dont la barrière a été détruite.

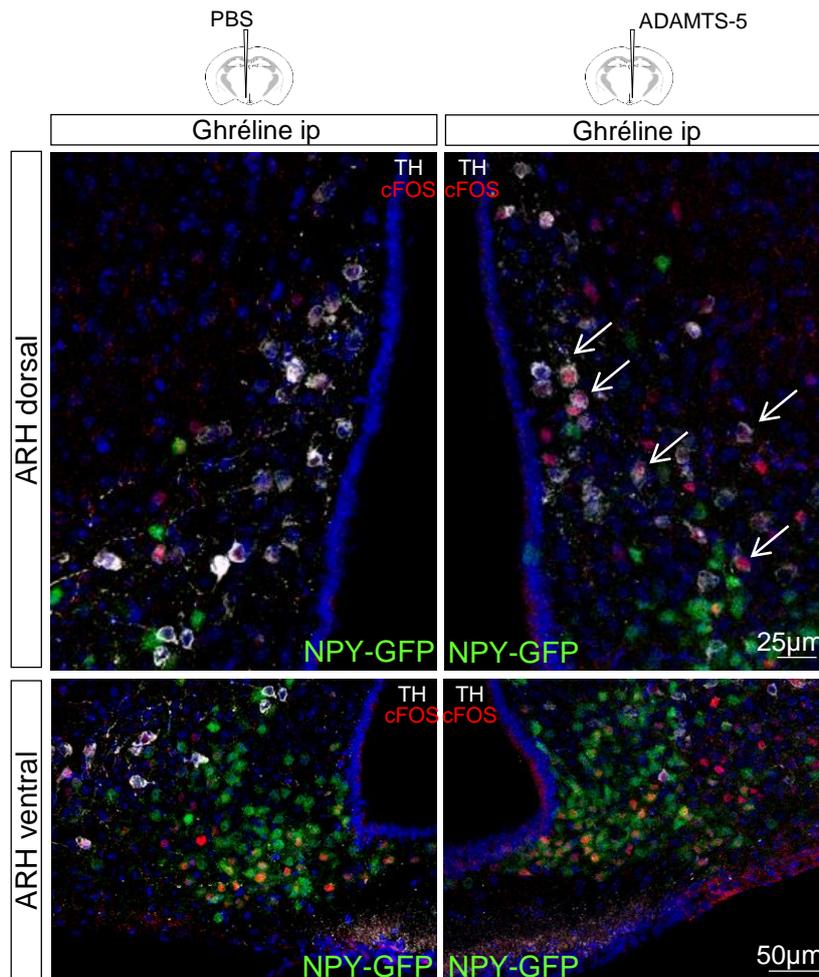


Figure 26 : Les neurones activés par la ghréline dans la partie ventrale du noyau arqué (ARH) sont les neurones à NPY

Le challenge ghréline réalisé sur des souris mâles adultes NPY-GFP (exprimant la GFP dans les neurones NPY ; verts) permet d'établir que les neurones activés (i.e. cFos+ ; en rouge) dans la partie ventrale de l'ARH après injection de ghréline sont les neurones à NPY (en jaune), mais également que les neurones activés dans la partie dorsale de l'ARH et identifiés comme tyrosine hydroxylase (TH ; en blanc) positifs ne sont pas des neurones à NPY (flèches blanches)

3. Impact de la dégradation de l'aggrecan sur la réponse centrale à la leptine

La leptine est une hormone de 16 kDa dite anorexigène, c'est-à-dire qui favorise la dépense énergétique et diminue la prise alimentaire. Elle est notamment sécrétée par le tissu adipeux et est principalement décrite comme une hormone pouvant activer les neurones à POMC et inhiber les neurones à NPY. A l'inverse de la ghréline, son taux circulant chute au moment du jeûne pour revenir à un niveau de base en postprandial (Ahima et al. 1996; Becker et al. 1995; Trayhurn et al. 1995). En condition basale, la leptine active les neurones à POMC pour médier son action anorexigène. Lors du jeûne, le taux de ghréline plus important permet l'activation des neurones NPY. Après un jeûne, la leptine inhibe donc les neurones NPY préalablement activés par la ghréline. Nous nous sommes donc intéressés aux effets d'une dégradation de l'ACAN sur la réponse à la leptine lorsque les animaux sont nourris ou lorsque les animaux ont été préalablement mis à jeun.

3.1. Analyse de l'impact de la dégradation de l'aggrecan sur la réponse centrale à la leptine chez les animaux nourris

Afin d'étudier l'effet de la barrière sur l'activation des neurones à POMC par la leptine, la barrière de diffusion est déstabilisée par des infusions intracérébrales d'ADAMTS-5 comme décrit précédemment avant d'injecter de la leptine aux animaux nourris *ad libitum* (Figure 27 A).

Lors de la mesure de la prise alimentaire après injection intrapéritonéale de leptine, aucune différence n'est observée entre les animaux dont la barrière est intègre et ceux dont la barrière est détruite (Figure 27 B, gauche). En accord avec ces résultats, aucune différence n'est observée dans le comptage des neurones c-fos positifs entre ces deux groupes (Figure 27 B, droite ; Figure 27 C). Ces résultats suggèrent que cette barrière n'est pas nécessaire pour l'activation des neurones à POMC par la leptine lorsque les animaux sont nourris.

De façon cohérente, nous avons montré que le co-marquage de l'ACAN et de la POMC avec l'albumine met en évidence que même si l'ACAN entoure une petite partie des neurones à POMC, ceux-ci sont situés plus latéralement par rapport à la limite de diffusion de l'albumine. D'autre part, ils ne sont pas majoritairement enchâssés dans le dépôt d'ACAN. En revanche, le co-marquage de l'ACAN et de l'albumine sur des souris NPY-GFP montre que la limite de diffusion de l'albumine correspond parfaitement à la ligne des neurones NPY entourés par l'ACAN (Figure 27 D). Cela suggère donc que ce

dépôt d'ACAN influencerait l'activité des neurones à NPY, mais n'interviendrait pas dans celle des neurones à POMC. Cela expliquerait pourquoi aucune différence n'a été observée concernant l'activation des neurones à POMC par la leptine en présence ou en absence de la barrière.

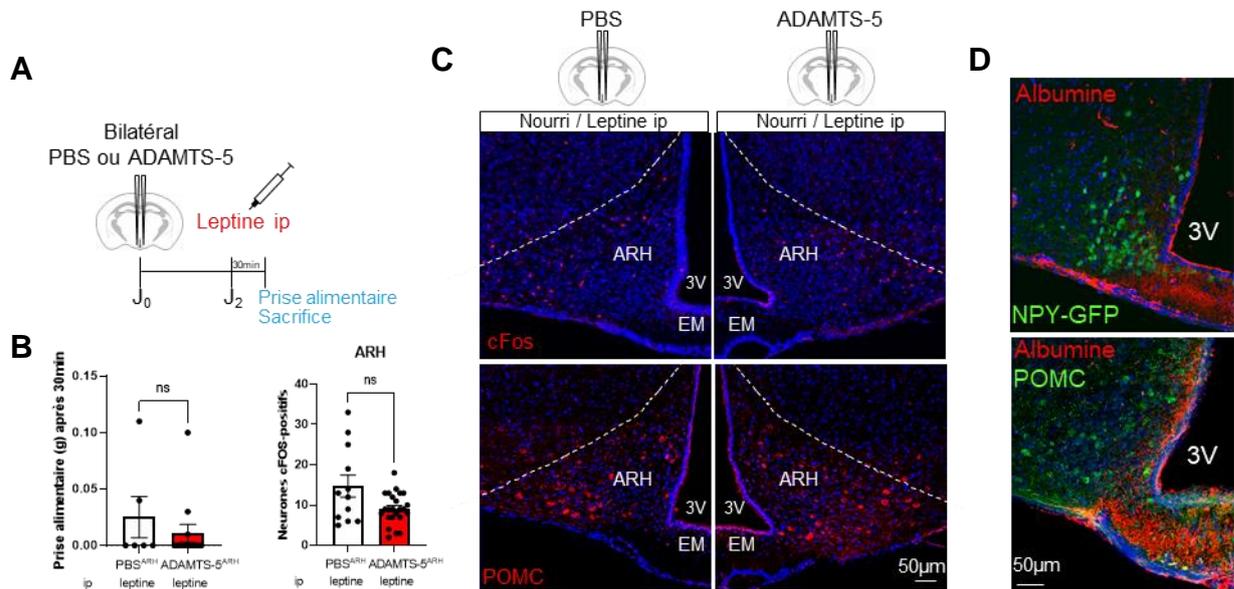


Figure 27 : La destruction de la barrière de diffusion des molécules ne semble pas modifier l'activation des neurones à POMC suite à une injection de leptine

A. Protocole expérimental du challenge à la leptine sans mise à jeun. Protocole expérimental mis en place pour étudier l'effet de la dégradation de l'ACAN sur la réponse à la leptine chez les animaux nourris ad libitum. Les animaux sont injectés par stéréotaxie avec du PBS ou de l'ADAMTS-5 au niveau de l'ARH (PBS^{ARH} ou ADAMTS-5^{ARH} respectivement). 48 heures après l'injection, la prise alimentaire est mesurée sur une durée de 30 minutes suite à l'injection intrapéritonéale de leptine (3 mg/kg). **B. La destruction de la barrière n'impacte ni la prise alimentaire ni la signalisation de la leptine.** Panneau gauche : la mesure de la prise alimentaire sur 30 minutes après injection de leptine ne montre aucune différence sur la quantité consommée entre les animaux dont la barrière est intacte (PBS^{ARH}) et ceux dont la barrière est détruite (ADAMTS-5^{ARH}) (Mann-Whitney ; $p = 0.4835$). Panneau droit : Le comptage de neurones cFos⁺ (activateur neuronal ; en rouge) ne montre aucune différence du nombre de neurones activés dans l'ARH entre les animaux dont la barrière est détruite et ceux dont la barrière est intacte. **C.** La répartition des neurones activés par la leptine sans mise à jeun préalable (Panneau supérieur ; en rouge) semble correspondre aux neurones à POMC (Panneau inférieur ; en rouge). **D. La limite de diffusion de l'albumine corrèle parfaitement avec les neurones NPY, mais pas les neurones POMC.** Panneau haut. Le marquage de l'albumine (en rouge) sur des tranches de cerveau de souris NPY-GFP (dont les neurones NPY expriment la GFP, en vert) montre que la limite de diffusion de cette protéine correspond parfaitement à la ligne formée par les neurones NPY ventraux de l'ARH. Panneau bas. En revanche, le co-marquage de l'albumine (en rouge) et des neurones à POMC (en vert) montre que les neurones à POMC sont localisés plus latéralement par rapport à la limite de diffusion de l'albumine.

3.2. Analyse de l'impact de la dégradation de l'aggrecan sur la réponse centrale à la leptine chez les animaux préalablement mis à jeun

Afin d'étudier l'influence de la barrière sur l'inhibition des neurones à NPY par la leptine, nous avons établi un protocole expérimental où les neurones à NPY sont préalablement activés chez les animaux ayant reçu ou non une infusion intracérébrale d'ADAMTS-5 (ADAMTS-5^{ARH} ou PBS^{ARH}) et avant une injection intrapéritonéale de leptine. Ainsi, 48 heures après l'infusion intracérébrale, les animaux ADAMTS-5^{ARH} ou PBS^{ARH} qui présentent une barrière de diffusion déstabilisée ou intacte sont mis à jeun durant la nuit afin d'induire une activation massive des neurones à NPY en raison d'une forte sécrétion de ghréline due au jeûne (Cummings et al. 2001). A l'issue des 16 heures de jeûne, la leptine est ensuite injectée en intrapéritonéal aux animaux ADAMTS-5^{ARH} ou PBS^{ARH} afin d'évaluer sa capacité à inhiber les neurones à NPY en présence ou non d'ACAN à la frontière entre l'EM et l'ARH. Parallèlement, nous avons mesuré l'impact des injections de leptine sur la prise alimentaire des animaux présentant une barrière de diffusion des molécules intacte ou altérée par une infusion d'ADAMTS-5 (Figure 27 D). De la même manière que précédemment, seuls les animaux pour lesquels nous avons vérifié la dégradation de la barrière (par marquage de l'ACAN ou l'albumine) ont été retenus dans nos analyses.

3.2.1. Impact de la dégradation de l'aggrecan sur l'effet anorexigène de la leptine

Tout d'abord, nous avons vérifié, dans notre modèle expérimental, l'effet anorexigène de la leptine en mesurant la quantité de nourriture ingérée par les animaux durant 30 minutes après le jeûne. Nous avons ainsi observé une diminution significative de la prise alimentaire chez les animaux PBS^{ARH} injectés en intrapéritonéal avec de la leptine par rapport aux animaux PBS^{ARH} injectés en intrapéritonéal par du PBS (Figure 28 E).

En revanche, les animaux ADAMTS-5^{ARH} dont la barrière a été déstabilisée par une injection intracérébrale d'aggrecanase mangent significativement plus que les animaux PBS^{ARH}, et ce malgré l'injection intrapéritonéale de leptine (Figure 28 E).

3.2.2. Impact de la dégradation de l'aggrecan sur l'activation des neurones du noyau arqué par la leptine

Comme attendu, chez les animaux contrôles PBS^{ARH} (Figure 28 A), on observe une diminution significative du nombre de neurones NPY c-fos positifs après l'injection de la leptine comparé aux animaux contrôles PBS^{ARH} injectés avec du PBS ($p = 0.0086$) (Figure 28 B-C). Cela suggère que, en condition normale, lorsque la barrière est intègre, la leptine inhibe les neurones à NPY préalablement activés par le jeûne. En revanche, chez les animaux ADAMTS-5^{ARH}, le nombre de neurones à NPY activés (positifs pour le marquage cFos) est plus élevé que chez les animaux PBS^{ARH} suite à l'injection de leptine (Figure 28 F) et cette différence est significative ($p = 0.0393$) (Figure 28 G). Ces résultats suggèrent que lorsque la barrière de diffusion des molécules est dégradée par une digestion de l'ACAN, la leptine n'est plus capable d'inhiber efficacement les neurones à NPY préalablement activés par le jeûne (Figure 28 H). Ainsi, la BLD est nécessaire à l'inhibition des neurones NPY par la leptine.

Afin de corroborer ces résultats, nous avons tiré parti de l'analyse de l'activation des neurones à NPY chez un animal où la digestion de l'ACAN n'est pas équivalente dans les deux hémisphères cérébraux injectés par l'ADAMTS-5 (Figure 29 A). En effet, le marquage de l'albumine montre une plus grande diffusion vers l'ARH dans l'hémisphère gauche que dans l'hémisphère droit (Figure 29 B). Ainsi, lorsque la digestion de l'ACAN a été efficace (hémisphère gauche), le nombre de neurones cFos positif est plus important (24 neurones positifs pour cFos) que dans l'hémisphère cérébral opposé (hémisphère droit, 15 neurones positifs cFos) où la déstabilisation du protéoglycane a été beaucoup plus limitée (Figure 29 C). Chez cet animal, la différence de réponse à la leptine corrèle donc avec le degré d'intégrité de la barrière de diffusion des molécules.

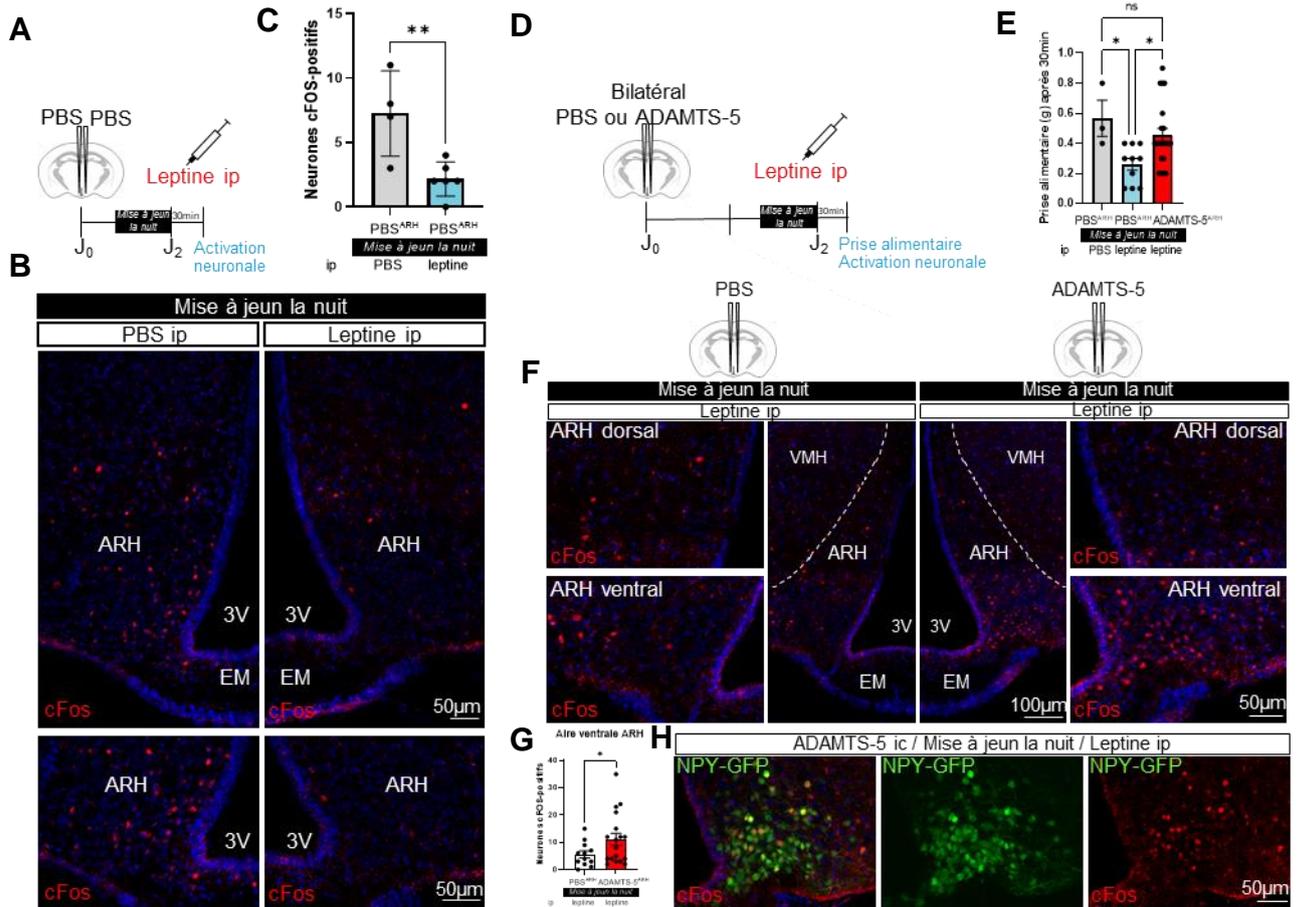


Figure 28 : Rôle de la barrière latérale de diffusion (BLD) à la frontière entre l'éminence médiane (EM) et le noyau arqué (ARH) dans la signalisation de la leptine après mise à jeun

A – C. Contrôle de l'effet anorexigène de la leptine. **A. Protocole expérimental.** Tous les animaux (souris mâles adultes C57Bl6/J) sont injectés par stéréotaxie avec du PBS au niveau de l'ARH (PBS^{ARH}). Ils sont mis à jeun sur la nuit 24h après, et la prise alimentaire est mesurée le lendemain sur une durée de 30 minutes à partir de l'injection intrapéritonéale de leptine (3 mg/kg) ou de PBS. **B. Effet inhibiteur de la leptine sur l'activation neuronale dans l'ARH.** Le marquage cFos (activateur neuronal ; en rouge) montre une très forte extinction de l'activation des neurones de l'ARH après injection de leptine comparé aux contrôles injectés avec du PBS. L'injection intracérébrale de PBS n'affecte pas l'effet anorexigène de la leptine. **C. Quantification de l'activation neuronale dans l'ARH après injection de leptine.** Le comptage des neurones cFos⁺ dans l'ARH montre une diminution significative de l'activation neuronale en réponse à l'injection de leptine (test t non paillé ; $p = 0.0086$). **D – H. Challenge leptine.** **D. Protocole expérimental.** Les animaux sont injectés par stéréotaxie avec du PBS ou de l'ADAMTS-5 au niveau de l'ARH (PBS^{ARH} ; $ADAMTS-5^{ARH}$ respectivement). Ils sont mis à jeun sur la nuit 24h après, et la prise alimentaire est mesurée le lendemain sur une durée de 30 minutes à partir de l'injection intrapéritonéale de leptine ou de PBS. **E. Variation de la prise alimentaire après injection de leptine en fonction de l'intégrité de la barrière.** La prise alimentaire montre une diminution significative de celle-ci chez les animaux injectés PBS^{ARH} -leptine comparé aux animaux PBS^{ARH} -PBS (Kruskal-Wallis ; comparaison multiple de Dunn ; $p = 0.0425$). Après destruction de la barrière ($ADAMTS-5^{ARH}$), la prise alimentaire reste similaire au contrôle PBS^{ARH} -PBS, malgré l'injection de leptine (Kruskal-Wallis, comparaison multiple de Dunn ; $p = 0.8748$). **F. Suppression de l'effet inhibiteur de la leptine sur l'activation neuronale dans l'ARH suite à la destruction de la barrière.** Le marquage cFos (activateur neuronal ; en rouge) montre que les neurones ne sont pas inhibés suite à l'injection de leptine lorsque la barrière est préalablement digérée par l'ADAMTS-5, alors qu'ils le sont majoritairement chez les animaux contrôles. **G. Quantification de l'activation neuronale dans la partie ventrale de l'ARH après injection de leptine.** Le comptage des neurones cFos⁺ dans la partie ventrale de l'ARH montre une diminution significative de l'activation neuronale chez les animaux injectés PBS^{ARH} -leptine en réponse à l'injection de leptine, alors qu'elle reste élevée chez les animaux injectés $ADAMTS-5^{ARH}$ -leptine dont la barrière est détruite (test t non paillé avec correction de Welch ; $p = 0.0393$). **H. Les neurones non inhibés par la leptine après destruction de la barrière sont des neurones à NPY.** L'expérience du challenge leptine a été réalisée sur des souris mâles NPY-GFP (les neurones NPY expriment la GFP, en vert). Le marquage de cFos (en rouge) montre les neurones activés après la mise à jeun des animaux et qui n'ont pas été inhibés malgré l'injection intrapéritonéale de leptine. Ces résultats permettent d'identifier ces neurones comme étant des neurones NPY (en jaune).

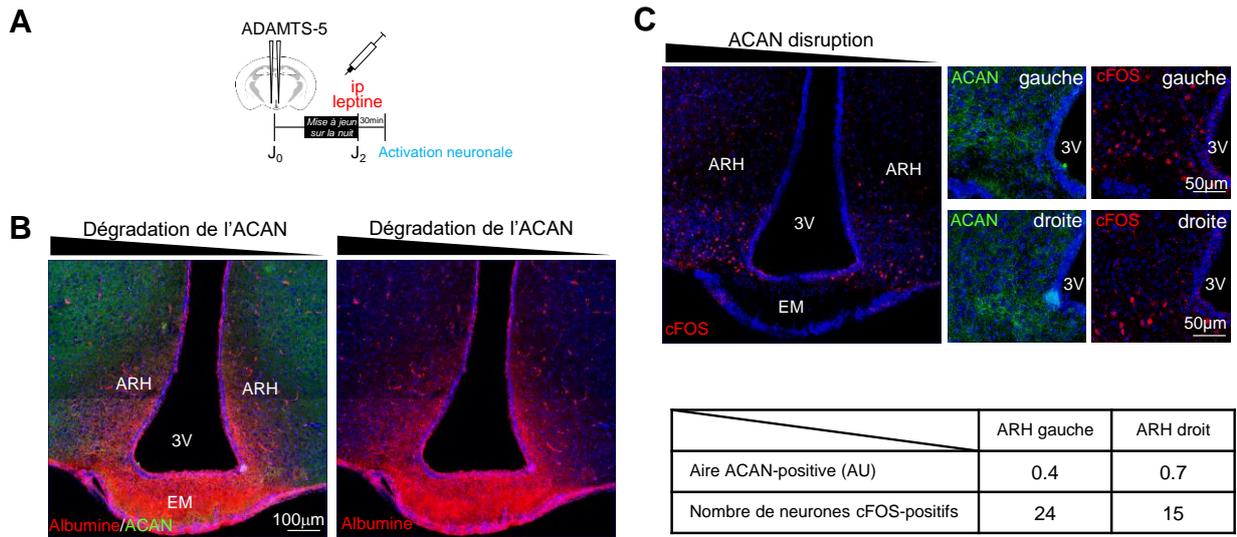


Figure 29 : Effet de l'efficacité de la dégradation de l'aggrecan (ACAN) sur la réponse centrale à la leptine chez des animaux préalablement mis à jeun

A. Protocole expérimental du challenge à la leptine avec mise à jeun. L'animal a été injecté par stéréotaxie avec de l'ADAMTS-5 au niveau de l'ARH (ADAMTS-5^{ARH}) dans les deux hémisphères cérébraux. Il a été mis à jeun sur la nuit 24h après, et l'activation neuronale dans l'ARH est étudiée grâce au marquage c-fos. **B. Diffusion de l'albumine vers l'ARH après dégradation du dépôt d'ACAN.** En tant qu'indicateur de l'intégrité de la barrière, la diffusion de l'albumine (en rouge) vers l'ARH étant plus importante dans l'hémisphère gauche que dans l'hémisphère droit, la dégradation de l'ACAN a été plus importante à gauche qu'à droite. **C. Inhibition de l'activité neuronale de l'ARH en réponse à l'injection de leptine.** Le nombre de neurones c-fos positifs est plus important dans l'hémisphère gauche où la dégradation de l'ACAN est plus forte que dans l'hémisphère droit.

Partie 3 : Analyses préliminaires de la barrière latérale de diffusion dans un contexte pathologique en lien avec la prise alimentaire

Dans la partie précédente nous avons suggéré l'importance de la BLD dans la régulation de l'accès des hormones métaboliques périphériques telles que la ghréline ou la leptine aux neurones de l'ARH, en particulier aux neurones à NPY. Si la BLD n'est pas nécessaire pour l'activation des neurones à NPY par ghréline, elle est essentielle pour l'inhibition de ces neurones par la leptine. Ainsi, la présence de cette barrière permet de réguler la prise alimentaire de l'individu en contrôlant l'accès des hormones métaboliques à l'ARH. Nous pouvons donc supposer qu'un dérèglement de la prise alimentaire, comme observé dans des cas pathologiques d'obésité, pourrait résulter d'une altération de cette barrière. C'est l'hypothèse que nous avons explorée pour cette dernière partie.

1. Mise en place et description du modèle sélectionné

1.1. Choix de la nourriture

Il existe une multitude de régimes alimentaires permettant la mise en place d'un phénotype d'obésité chez la souris, notamment les régimes enrichis en gras (HFD), les régimes enrichis en sucrose et en gras (HFHSD) et les régimes enrichis en gras et en fructose (HFHFD). Les régimes HFD ont souvent une teneur en gras très élevée (> 50 kcal%), afin d'induire une prise de poids rapide. Certains de ces régimes sont proposés par des fournisseurs (par exemple Research Diet) et d'autres moins standardisés sont mis en place au sein des laboratoires de recherche. Le régime alimentaire suivi par les animaux contrôles est un autre paramètre essentiel pour le choix d'un modèle d'obésité chez la souris. En effet, de nombreuses études utilisent la nourriture habituelle de base des souris comme contrôle expérimental pourtant cette dernière n'est souvent pas suffisamment standardisée pour être comparée aux régimes induisant l'obésité.

Notre objectif a été de sélectionner un régime alimentaire se rapprochant au mieux de l'alimentation extrêmement riche en graisses et en sucres des populations des pays développés et susceptible d'induire non seulement une obésité mais également de provoquer ses comorbidités telles que certaines hépatopathies métaboliques comme la stéatose hépatique non alcoolique évoluant vers la fibrose ou la cirrhose, le diabète de type 2 ou des anomalies cardiovasculaires. D'autre part, nous avons choisi d'utiliser un contrôle de régime alimentaire également standardisé et produit par le même fournisseur.

Ainsi, les animaux ont été nourris avec de la nourriture composée de 40 kcal% de

graisse (essentiellement de l'huile de palme), 20 kcal% de fructose and 2% de Cholesterol (Research Diet # D09100310) alors que les animaux contrôles ont été nourris avec une nourriture contenant 10% kcal% de graisse (research Diet # D09100304). Ces nourritures sont produites en routine chez le fournisseur Research Diet (New Brunswick, USA). La nourriture riche en gras et contenant du fructose et du cholestérol (HFD-FC) induit, en plus d'une prise de poids, différents stades de la stéatose hépatothique et des disfonctionnements métaboliques (Clapper et al. 2013; Trevaskis et al. 2012).

1.2. Caractérisation du modèle

Une cohorte de 20 animaux a suivi le régime décrit ci-dessus, incluant 10 animaux contrôles et 10 animaux sous régime HFD-FC. Le suivi longitudinal du poids hebdomadaire des animaux montre l'évolution de ce poids au cours du traitement. Nous avons observé que le poids des animaux sous régime HFD-FC continue de progresser après 19.5 semaines de régime, alors qu'à ce stade le poids des animaux contrôles atteint un palier (Figure 30). Dans chacun des groupes contrôles et traités, les animaux ont été subdivisés en 2 groupes : 5 animaux ont été sacrifiés au bout de 5 semaines de traitement, afin d'analyser les effets précoces du régime HFD-FC non seulement sur différents organes périphériques (poids, accumulation de lipides) mais également sur l'organisation de la matrice extracellulaire (notamment le dépôt d'ACAN à la frontière EM/ARH) au niveau de l'ARH. Les 5 animaux restant de chaque groupe ont été sacrifiés au bout de 31.5 semaines de traitement afin d'étudier les effets d'un régime HFD-FC prolongé sur la structure des organes périphériques et de la région cérébrale contenant l'EM et l'ARH.

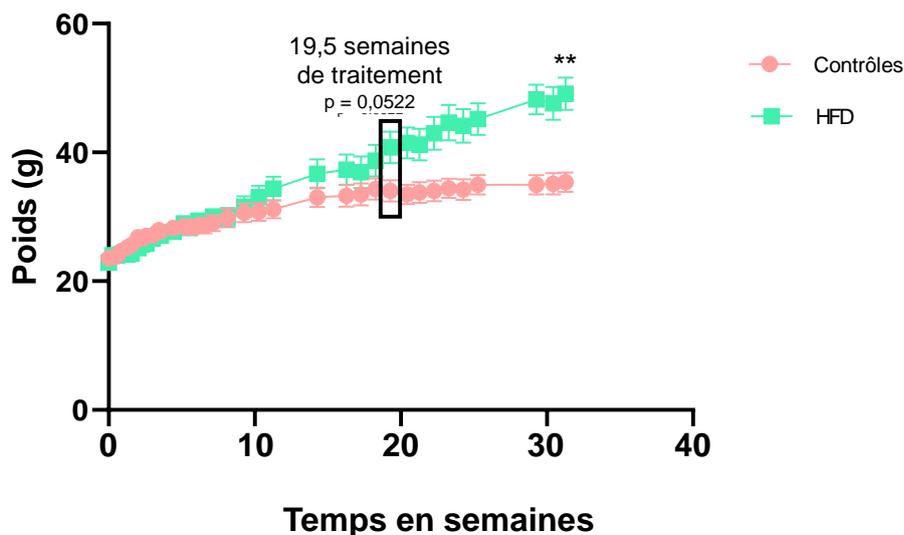


Figure 30 : Suivi du poids des animaux suivant un régime enrichi en gras, en fructose et en cholestérol (HFD-FC)

Le poids moyen des animaux du groupe contrôle et des animaux HFD sont équivalents. La prise de poids des animaux HFD-FC comparé aux animaux contrôles devient effective à partir de 19.5 semaines de traitement.

2. Analyse du modèle d'obésité après 5 semaines de régime riche en gras, fructose et cholestérol

2.1. Impact du régime enrichi en gras, fructose et cholestérol sur la périphérie

Après 5 semaines de régime HFD-FC (Figure 31 A), il n'y a aucune différence de poids entre les animaux contrôles et HFD-FC (Figure 31 B). En revanche, à ce stade, la masse du tissu adipeux peri-viscéral est significativement plus importante chez les animaux ayant suivi le régime HFD-FC que chez les animaux contrôles ($p = 0.0202$) (Figure 31 C). L'analyse de coupes histologiques de ce tissu adipeux (Figure 31 D) a permis de mettre en évidence une hyperplasie significative des adipocytes ($p = 0.0080$) (Figure 31 E), qui ne semblent en revanche pas présenter d'hypertrophie (Figures 31 F).

Le tissu adipeux peri-viscéral n'est pas le seul organe périphérique impacté par le régime HFD-FC. En effet, nous avons observé un début de stéatose hépatique non alcoolique chez les animaux ayant suivi ce régime (Figure 31 G-H). Celle-ci est caractérisée par une inflammation chronique ainsi qu'une accumulation de graisses dans le tissu hépatique (Fraile et al. 2021). Les inclusions de gras dans ce tissu sont plus nombreuses ($p = 0.0079$) (Figure 31 I) mais ne présentent pas, en moyenne, de différence de taille (Figure 31 J) chez les animaux HFD-FC comparé aux animaux contrôles.

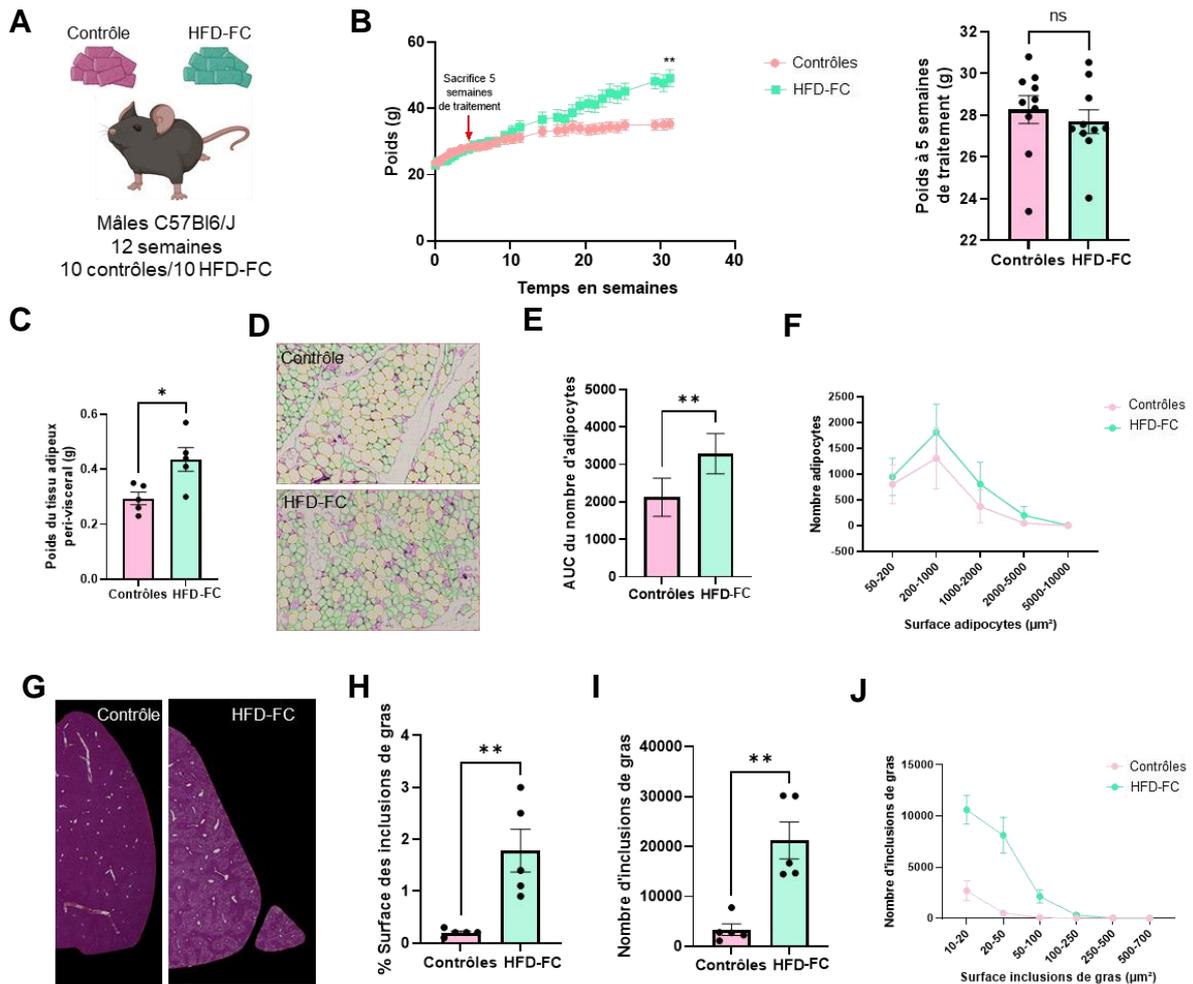


Figure 31 : Impact du régime HFD-FC sur le tissu adipeux peri-viscéral et le foie après 5 semaines de traitement

A. Modèle animal. Les animaux utilisés pour cette expérience sont des mâles C57Bl6/J, âgés de 7 semaines au début du traitement, donc 12 semaines au moment du sacrifice après 5 semaines de traitement. **B. Poids des animaux contrôles et HFD après 5 semaines de traitement.** Après 5 semaines de traitement, il n'y a aucune différence significative de poids entre les souris contrôles et HFD. **C-F. Impact du régime HFD sur le tissu adipeux peri-viscéral après 5 semaines de traitement.** **C. Masse du tissu adipeux peri-intestinal.** Après 5 semaines de traitement, la masse du tissu adipeux peri-viscéral des souris HFD est significativement plus élevée que celle des souris contrôles (test t non pairé ; $p = 0.0202$). **D. Illustration d'une coupe histologique de tissu adipeux.** Les adipocytes ont été délimités puis classés selon leur taille (50-200 μm^2 en magenta ; 200-1000 μm^2 en vert ; 1000-2000 μm^2 en jaune ; 2000-5000 μm^2 en orange ; 5000-10000 μm^2 en rouge). **E. Analyse de l'aire sous la courbe (AUC) de la distribution des adipocytes en fonction de leur taille.** L'analyse de l'AUC du graphique E montre une différence significative entre les souris HFD et contrôles. Le nombre d'adipocytes est donc significativement plus important chez les souris HFD comparé aux souris contrôles (test t non pairé ; $p = 0.0080$). **F. Distribution du nombre d'adipocytes en fonction de leur taille.** La distribution du nombre d'adipocytes en fonction de leur taille est similaire chez les souris contrôles et HFD, mais le nombre d'adipocytes, en particulier dans les classes 200-1000 μm^2 et 1000-2000 μm^2 est plus important chez les souris HFD comparé aux souris contrôles. **G-J. Impact du régime HFD sur le foie après 5 semaines de traitement.** **G. Illustration d'une coupe histologique de foie.** Le foie des animaux HFD a un aspect plus clair que celui des animaux contrôles en raison du développement d'une stéatose hépatique non alcoolique caractérisée par de nombreuses inclusions lipidiques (en blanc). **H. Comparaison de l'aire moyenne des inclusions lipidiques hépatiques entre les animaux contrôles et HFD.** L'aire moyenne des inclusions lipidiques hépatiques des animaux HFD a tendance à être supérieure à celle des animaux contrôles, mais ce résultat n'est pas significatif (test t non pairé ; $p = 0.0628$). **I. Comparaison du nombre global d'inclusions lipidiques hépatiques entre les animaux contrôles et HFD.** Le nombre d'inclusions lipidiques chez les animaux HFD est significativement supérieur à celui des animaux contrôles (Mann-Whitney ; $p = 0.0079$). **J. Distribution du nombre d'inclusions lipidiques en fonction de leur taille.** La distribution du nombre d'inclusions lipidiques en fonction de leur taille chez les animaux HFD suit la même tendance que celle des animaux contrôles, mais le nombre d'inclusions lipidiques est très nettement supérieur.

2.2. Impact du régime enrichi en gras, fructose et cholestérol sur l'hypothalamus médio-basal

Nous avons analysé si après 5 semaines d'un régime HFD-FC l'hypothalamus médio-basal présentait des particularités, notamment en ce qui concerne une éventuelle inflammation locale et/ou une anomalie du dépôt du PNN dont l'importance dans la régulation métabolique a été présentée en partie 2.

La consommation chronique d'un régime enrichi en gras provoque une inflammation métabolique, i.e. une inflammation chronique de bas grade couplée à des dysfonctionnement métaboliques, et favorise le développement de la stéatose hépatique non alcoolique (voir ci-dessus). En particulier, de façon très précoce, la consommation chronique d'une alimentation enrichie en gras induit une augmentation de la quantité d'acides gras saturés en provenance de la périphérie qui traversent la BHE. Ces acides gras provoquent une réponse inflammatoire dans les neurones hypothalamiques (Timper and Brüning 2017). Une étude a montré que le marqueur d'inflammation CD45 a été largement détecté dans des cas de stéatose hépatique non alcoolique (De Vito et al. 2012). CD45 est un marqueur pan-leucocytaire et permet donc de détecter les leucocytes présents dans la zone d'intérêt. L'augmentation du nombre de cellules CD45-positives traduit l'augmentation du nombre de leucocytes présents, marqueurs d'une inflammation locale. Nous n'avons pas observé de différence du nombre de cellules CD45-positives entre les animaux contrôles et HFD-FC (Figure 32 A).

Nous n'avons pas non plus observé de différence du marquage de l'ACAN à la frontière entre l'EM et l'ARH. De la même manière que chez les animaux contrôles, l'albumine reste bloquée dans le parenchyme de l'EM, et nous n'observons pas de différence de marquage de l'ACAN entre les animaux contrôles et HFD-FC (Figure 32 B).

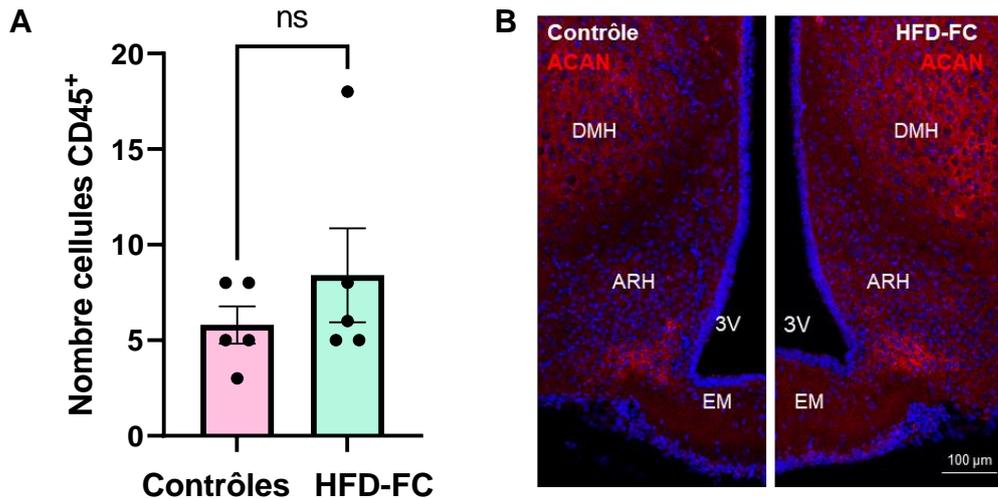


Figure 32 : Impact du régime enrichi en gras, en fructose et en cholestérol (HFD-FC) sur le cerveau après 5 semaines de traitement

A. Marqueur d'inflammation au niveau de l'éminence médiane (EM) et du noyau arqué (ARH). Le marquage CD45 a été utilisé comme marqueur de l'inflammation, état associé à la consommation chronique d'un régime riche en gras (HFD). Le nombre de cellules CD45 positives (CD45⁺) n'est pas significativement différent entre les souris contrôles et HFD-FC. **B.** Impact du régime HFD sur le dépôt d'ACAN à la frontière entre l'EM et l'ARH. Aucune différence au niveau du dépôt d'ACAN à la frontière entre l'EM et l'ARH entre les souris contrôles et HFD-FC n'a été observée.

3. Analyse du modèle d'obésité après plusieurs mois de régime alimentaire riche en gras, fructose et cholestérol

3.1. Impact du régime riche en gras, fructose et cholestérol sur les paramètres métaboliques

Les animaux n'ayant pas été sacrifiés au bout de 5 semaines de régime HFD-FC ont été maintenus sous ce même régime alimentaire jusqu'à leur sacrifice (31,5 semaines de traitement) (Figure 33 A). Durant cette période, ces animaux ont été soumis à divers tests métaboliques afin d'évaluer les dérégulations du métabolisme induites par le régime alimentaire. Parmi les tests métaboliques réalisés, les animaux ont été soumis à un test de tolérance au glucose (GTT, *Glucose Tolerance Test*) accompagné d'un prélèvement de sang pour doser le taux d'insuline circulant par ELISA (technique d'immuno-absorption par enzyme liée), et un test de tolérance à l'insuline (ITT, *Insulin Tolerance Test*). Le GTT a été réalisé à 26 semaines de régime HFD-FC et l'ITT à 28 semaines, ce qui a accordé aux animaux une période de récupération nécessaire entre chaque test afin de ne pas interférer sur les résultats. Les animaux ont été finalement sacrifiés après 31.5 semaines de régime HFD-FC.

Après 26 semaines de régime HFD-FC, le poids des souris est significativement plus élevé que celui des souris contrôles ($p = 0.0079$) (Figure 33 B). La masse de tissu adipeux peri-viscéral, déjà plus importante chez les souris HFD-FC comparé aux souris contrôles

au bout de 5 semaines de régime, est encore plus élevée après 31.5 semaines de traitement ($p < 0.0001$) (Figure 33 C). La distribution des adipocytes en fonction de leur taille montre que chez les animaux contrôles, il y a un nombre élevé d'adipocytes de taille moyenne, et très peu voire aucun adipocyte de très grande taille. En revanche, la répartition des adipocytes selon leur taille est plutôt homogène chez les animaux ayant suivi 31.5 semaines de traitement HFD-FC (Figure 33 D). Il est aussi intéressant de noter que le nombre d'adipocytes de très grande taille est significativement supérieur chez les animaux HFD-FC comparé aux animaux contrôles ($p = 0.0101$) (Figure 33 E).

L'alimentation chronique à base de nourriture HFD-FC pendant 31.5 semaines a conduit à une stéatose hépatique non alcoolique massive chez les souris HFD-FC, comparé aux souris contrôles dont le foie est sain (Figure 33 F). Outre le nombre plus élevé d'inclusions de gras dans ce tissu ($p = 0.0153$) (Figures 33 G, H), l'aire moyenne de ces inclusions est également supérieure chez les souris HFD-FC comparé aux souris contrôles ($p = 0.0001$) (Figure 33 I).

La réalisation d'un GTT sur ces souris a permis de mettre en évidence que les souris HFD-FC sont hyperglycémiques ($p < 0.0001$) (Figure 34 A). Le GTT montre également que la glycémie des souris HFD-FC ne retrouve pas un niveau basal même au bout de 2h30 après l'injection de glucose (Figure 34 B). Ce résultat est confirmé par l'analyse de l'aire sous la courbe, qui est significativement plus élevée chez les animaux HFD-FC que chez les animaux contrôles Figure 34 C). Ces résultats suggèrent que le glucose n'est pas recapturé correctement par le foie et les muscles, empêchant ainsi le retour de la glycémie à son état basal.

Durant le GTT, des prélèvements de sang ont été effectués afin de mesurer la concentration plasmatique d'insuline en réponse à l'injection de glucose. Les résultats du test ELISA montrent que les souris HFD-FC sont également hyper-insulinémiques ($p = 0.0168$) (Figure 34 D). Ils montrent également que les souris HFD-FC sécrètent bien de l'insuline en réponse à l'injection de glucose ($p = 0.0036$), tout comme les souris contrôles ($p = 0.0137$) (Figure 34 E). Toutefois, le GTT seul ne nous permet pas de conclure quant aux mécanismes à l'origine du problème de recapture du glucose. C'est pourquoi nous avons également réalisé un ITT, dans le but de déterminer si ce problème de recapture du glucose est dû à une résistance à l'insuline.

A partir des résultats de l'ITT obtenus, nous ne pouvons pas totalement exclure un effet de résistance à l'insuline dans la mesure où la diminution de la glycémie chez les souris HFD-FC en réponse à l'injection d'insuline est significativement moins importante

que chez les souris contrôles ($p = 0.0299$) (Figure 34 F), mais nous observons toutefois que la cinétique de diminution de la glycémie en réponse à l'injection d'insuline chez les animaux HFD-FC est tout à fait similaire à celle des animaux contrôles (Figure 34 G). Les résultats de l'ITT seuls ne pouvant expliquer complètement les résultats obtenus avec le GTT, il doit donc exister au moins un autre mécanisme à l'origine du problème de recapture du glucose.

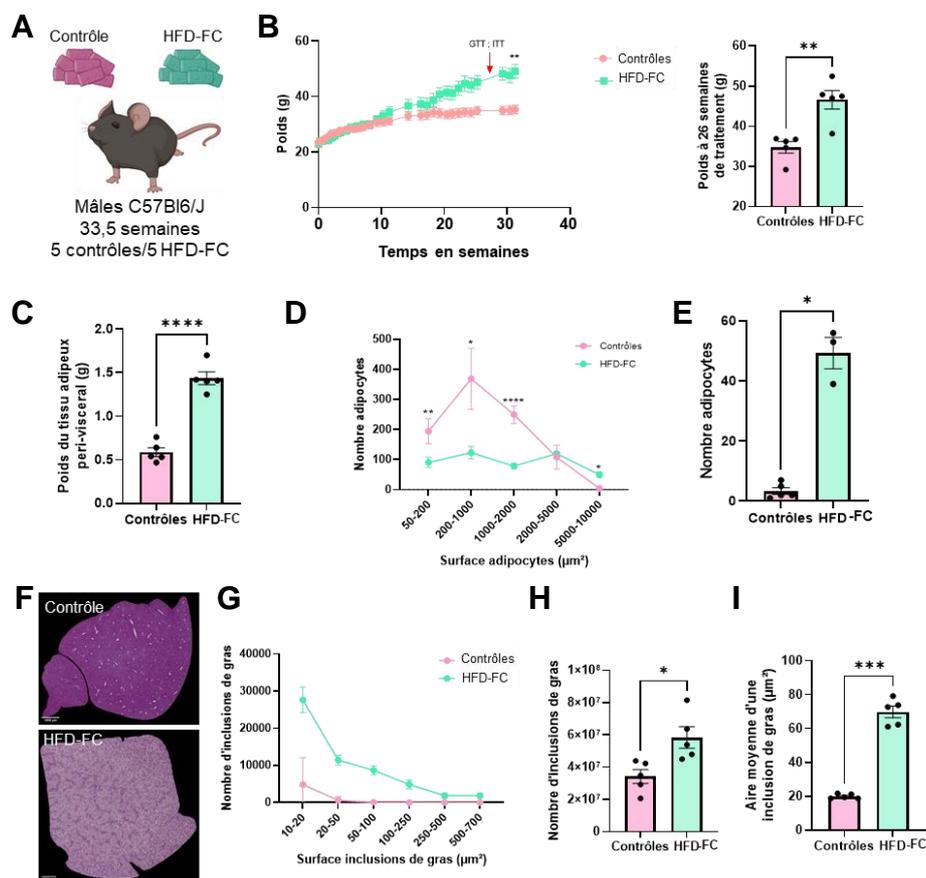


Figure 33 : Impact d'un régime enrichi en gras (HFD) sur le tissu adipeux peri-viscéral et le foie après 31.5 semaines de traitement

A. Modèle animal. Les animaux utilisés pour cette expérience sont des mâles C57Bl6/J, âgés de 7 semaines au début du traitement, donc 33.5 semaines au moment du sacrifice après 31.5 semaines de traitement. **B. Poids des animaux contrôles et HFD après 26 semaines de traitement.** Après 26 semaines de traitement, il y a une différence de poids significative entre les souris contrôles et HFD (Mann-Whitney ; $p = 0.0079$). **C-F. Impact du régime HFD sur le tissu adipeux peri-viscéral après 31.5 semaines de traitement.** **C. Masse du tissu adipeux peri-intestinal.** Après 31.5 semaines de traitement, la masse du tissu adipeux peri-viscéral des souris HFD est significativement plus élevée que celle des souris contrôles (test t non païré ; $p < 0.0001$). **D. Distribution du nombre d'adipocytes en fonction de leur taille.** La répartition du nombre d'adipocytes en fonction de leur taille montre une répartition relativement homogène des adipocytes chez les souris HFD-FC après 31.5 semaines de traitement. Chez les animaux contrôles, on remarque un nombre élevé d'adipocytes de taille moyenne, et très peu voire aucun adipocyte de très grande taille. **E. Comparaison du nombre d'adipocytes de très grande taille entre les animaux contrôles et HFD-FC.** Le nombre d'adipocytes de très grande taille est significativement supérieur chez les animaux HFD-FC comparé aux animaux contrôles ($p = 0.0101$; Test t non païré avec correction de Welch). **F-I. Impact du régime HFD sur le foie après 31.5 semaines de traitement.** **F. Illustration d'une coupe histologique de foie.** Le foie des animaux HFD a un aspect beaucoup plus clair que celui des animaux contrôles en raison du développement d'une stéatose hépatique non alcoolique caractérisée par de nombreuses inclusions lipidiques (en blanc). **G. Distribution du nombre d'inclusions lipidiques en fonction de leur taille.** La distribution du nombre d'inclusions lipidiques en fonction de leur taille chez les animaux HFD suit la même tendance que celle des animaux contrôles, mais le nombre d'inclusions lipidiques est très nettement supérieur. **H. Comparaison du nombre global d'inclusions lipidiques hépatiques entre les animaux contrôles et HFD.** Le nombre d'inclusions lipidiques chez les animaux HFD est significativement supérieur à celui des animaux contrôles (test t non païré ; $p = 0.0153$). **I. Comparaison de l'aire moyenne des inclusions lipidiques hépatiques entre les animaux contrôles et HFD.** L'aire moyenne des inclusions lipidiques hépatiques des animaux HFD après 31.5 semaines de traitement est très significativement supérieure à celle des animaux contrôles (test t non païré avec correction de Welch ; $p = 0.0001$).

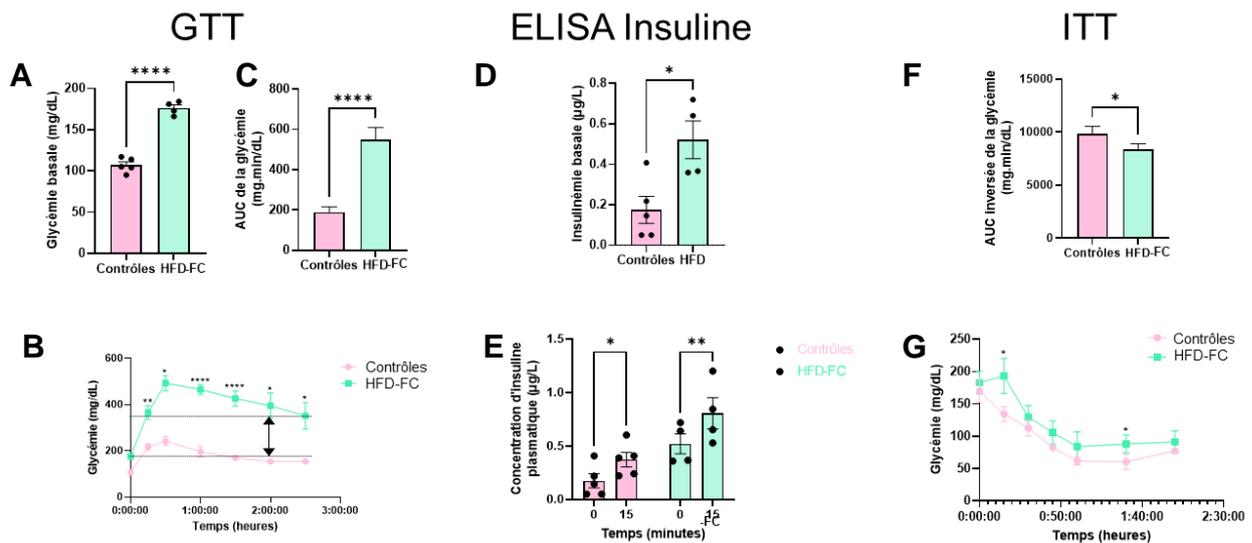


Figure 34 : Tests métaboliques après 26 semaines de traitement

A-C. Test de tolérance au glucose (GTT). **A.** Les souris HFD sont hyperglycémiques. La comparaison de la glycémie basale des souris contrôles et HFD montre que les souris HFD sont hyperglycémiques comparé aux souris contrôles (test t non pairé ; $p < 0.0001$). **B.** Cinétique de l'évolution de la glycémie après injection de glucose. L'évolution de la glycémie des animaux contrôles (en rose) après injection de glucose reproduit ce qui est décrit dans la littérature : la glycémie atteint un pic d'environ 240 mg/dL entre 15 et 30 minutes, puis décroît pour atteindre environ le niveau basal à partir de 90 minutes après l'injection. L'évolution de la glycémie des animaux HFD après injection de glucose augmente significativement plus que chez les animaux contrôles, et ne parvient pas à revenir au niveau basal même au bout de 2h30 après l'injection (Différence entre la glycémie basale et finale représentée par la double flèche noire). **C.** Analyse de la réponse à l'injection de glucose. L'analyse de l'aire sous la courbe (après correction de la différence apportée par la glycémie basale) montre que la concentration de glucose circulant est très significativement supérieure chez les animaux HFD comparé aux animaux contrôles (test t non pairé ; $p < 0.0001$). **D-E.** Analyse de la concentration plasmatique de l'insuline en réponse à une injection de glucose grâce au test ELISA. **D.** Les souris HFD sont hyper-insulinémiques. La concentration plasmatique d'insuline à l'état basal chez les souris HFD est significativement supérieure à celle des souris contrôles (test t non pairé ; $p = 0.0168$). **E.** Sécrétion d'insuline en réponse à une injection de glucose. Au bout de 15 minutes, la concentration plasmatique d'insuline a significativement augmenté aussi bien chez les souris contrôles que les souris HFD comparé à l'état basal (Two-Way ANOVA, test de comparaison multiple de Sidák ; $p = 0.0137$ et $p = 0.0036$ respectivement). **F-G.** Test de tolérance à l'insuline (ITT). **F.** Analyse de la réponse à l'injection d'insuline. L'analyse de l'aire sous la courbe inversée montre que celle-ci est significativement inférieure chez les souris HFD que chez les souris contrôles, impliquant une diminution de la sensibilité à l'insuline (test t non pairé ; $p = 0.0299$). **G.** Cinétique de l'évolution de la glycémie en réponse à l'injection d'insuline. La décroissance de la glycémie en réponse à l'injection d'insuline est légèrement moins efficace chez les souris HFD que chez les souris contrôles, la glycémie reste notamment supérieure à 15 minutes et 1h30, mais reste néanmoins tout à fait similaire à celle des souris contrôles.

3.2. Impact du régime riche en gras, fructose et cholestérol sur l'hypothalamus médio-basal

De la même manière qu'après 5 semaines de régime, nous avons réalisé un marquage CD45 sur des coupes de cerveau des souris après 31.5 semaines de régime HFD-FC. Nous n'observons pas de différence significative du nombre de cellules CD45 positives entre les deux groupes, même si ce nombre a tendance à être plus élevé chez les animaux HFD-FC que chez les animaux contrôles (Figure 35 A).

Parallèlement, nous avons analysé par immunomarquage le dépôt d'ACAN à la frontière EM/ARH chez les animaux après un long régime alimentaire HFD-FC. Aucune différence significative n'a pu être observée au niveau du dépôt d'ACAN, bien que celui-ci apparaisse plus épais chez les animaux HFD-FC que chez les animaux contrôles (Figure 35 B, droite). En revanche, nous avons observé un dense dépôt d'ACAN au

niveau du DMH chez les animaux HFD-FC, couvrant une large surface au niveau de ce noyau hypothalamique, à l'exception systématique d'une petite région de forme ovale proche de la paroi du 3V dont la nature reste à déterminer (Figure 35 B, gauche).

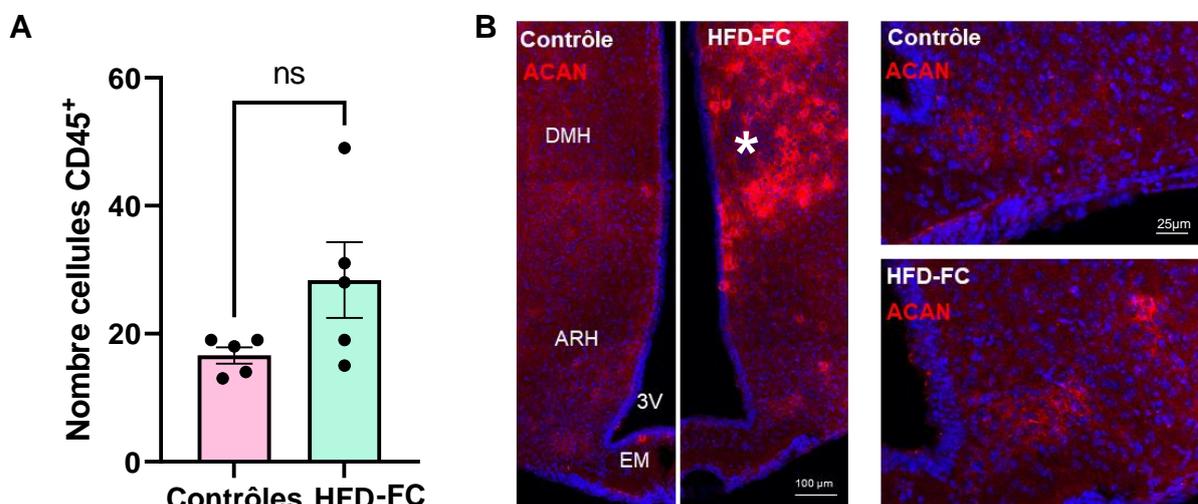


Figure 35 : Impact du régime HFD sur le cerveau après 31.5 semaines de traitement

A. Marqueur d'inflammation au niveau de l'éminence médiane (EM et du noyau arqué (ARH)). Le marquage CD45 a été utilisé comme marqueur de l'inflammation, état associé à la consommation chronique d'un régime riche en gras (HFD). Le nombre de cellules CD45 positives (CD45⁺) n'est pas significativement différent, mais tend à être supérieur chez les souris HFD comparé aux souris contrôles. **B-C.** Impact du régime HFD sur le dépôt d'aggrécane (ACAN) après 31.5 semaines de traitement. **B.** Apparition d'un dense dépôt d'ACAN au niveau du noyau ventro-médian de l'hypothalamus (VMH). Panneau gauche. Le marquage de l'ACAN (en rouge) montre l'apparition d'un dense et important dépôt d'ACAN étendu sur la surface du VMH chez les souris HFD uniquement, à l'exception systématique d'une petite région (astérisque blanche). Panneau droit. Impact du régime HFD sur le dépôt d'ACAN à la frontière entre l'EM et l'ARH. Aucune différence au niveau du dépôt d'ACAN à la frontière entre l'EM et l'ARH entre les souris contrôles et HFD n'a été observée.

L'ensemble de ces données nous permettent d'établir une première caractérisation de ce nouveau modèle HFD-FC. La prise de poids des animaux est lente puisque les animaux HFD-FC commencent à avoir un poids significativement supérieur à celui des contrôles après 20 semaines de traitement. Cette prise de poids est associée à la mise en place d'un phénotype de stéatose hépatique non alcoolique dès les premières semaines de traitement (5 semaines), ainsi qu'une hyperplasie des adipocytes du tissu adipeux peri-viscéral. Après un long traitement HFD-FC (31.5 semaines), les tests métaboliques montrent que les souris HFD-FC sont hyperglycémiques et hyperinsulinémiques. Ils montrent également un problème de recapture du glucose par le foie et les muscles chez les souris HFD-FC, qu'une résistance à l'insuline ne peut expliquer totalement. Enfin, un long traitement HFD-FC induit la mise en place d'une expression anormale de l'ACAN au niveau du DMH, à l'exception d'une petite région qu'il faut encore identifier. Il serait intéressant d'étudier ce modèle à des temps intermédiaires afin d'établir une caractérisation du modèle plus précise.

Discussion

Ce travail de thèse s'est focalisé sur une région cérébrale à l'interface entre la périphérie et le cerveau qui était décrite pour empêcher la diffusion des molécules circulantes vers le noyau arqué de l'hypothalamus, un centre clé des régulations métaboliques. Nous avons mis en évidence le rôle majeur de l'ACAN dans le contrôle de la diffusion des molécules circulantes depuis l'éminence médiane vers le noyau arqué en exploitant plusieurs modèles *in vivo* indépendants. Le remodelage de l'ACAN, que nous avons identifié en fonction du statut alimentaire, révèle l'importance de ce protéoglycane pour la régulation fine du dialogue entre la périphérie et le cerveau. Enfin, nous avons établi que l'ACAN module les réponses centrales de deux hormones métaboliques dont les fonctions sont essentielles pour la régulation de la prise alimentaire.

- **La frontière entre l'éminence médiane et le noyau arqué est une zone de communication stratégique entre la périphérie et le cerveau**

La bonne communication entre la périphérie et le cerveau est nécessaire à la régulation fine de nombreuses fonctions physiologiques, dont la prise alimentaire. En particulier l'ARH, localisé dans la partie ventrale de l'hypothalamus, est un organe clé pour les régulations métaboliques (Ciofi et al. 2009). En effet, deux populations neuronales présentes au sein de l'ARH, les neurones NPY/AgRP et les neurones POMC/CART sont connues pour leur implication dans la prise alimentaire (Elias et al. 1998; Hahn et al. 1998). Ces neurones expriment, entre autres, à leur surface les récepteurs de deux hormones métaboliques périphériques : la ghréline et la leptine (Baskin et al. 1999; Willesen et al. 1999), produites respectivement par l'estomac (Date et al. 2000; Kojima et al. 1999) et le tissu adipeux (Zhang et al. 1994). Ces hormones ont une action antagoniste sur la prise alimentaire. L'accès de ces hormones circulantes aux neurones du noyau arqué est donc crucial pour réguler la prise alimentaire et à terme maintenir l'homéostasie énergétique. Plusieurs voies d'accès pour ces hormones circulantes ont été identifiées. En effet, les capillaires fenêtrés, découverts à l'interface entre l'éminence médiane et le noyau arqué (Ciofi et al. 2009; Langlet et al. 2013) représentent une porte d'entrée pour les molécules circulantes permettant leur délivrance à proximité des neurones orexigènes et anorexigènes de l'ARH. La plasticité des fenestrations de ces capillaires en fonction du statut alimentaire (Langlet et al. 2013) témoigne de la nécessité de maîtriser précisément les communications entre la

périphérie et le cerveau. Les tanocytes, présents dans cette région, sont également capables d'assurer un transport actif des molécules périphériques, en particulier la leptine (Balland et al. 2014; Duquenne et al. 2021) pour les restituer au niveau de l'ARH. Dans notre étude, nous identifions l'ACAN comme un nouvel acteur dans l'accès des hormones périphériques aux neurones de l'ARH. En effet, le dépôt stratégique de l'ACAN à la frontière entre l'éminence médiane et l'ARH, génère une barrière qui empêche le passage des molécules circulantes qui gagnent l'EM. Etablir comment toutes ces voies d'accès pour les molécules périphériques vers l'ARH se coordonnent pour assurer une parfaite communication entre la périphérie et le cerveau reste à déterminer et sera essentiel pour la parfaite compréhension des régulations de l'homéostasie énergétique. Nous pouvons cependant estimer que l'ACAN jouera un rôle unique dans cette communication car sa participation à ce processus pourrait ne pas se limiter au blocage des molécules circulantes entre ces deux structures cérébrales. En effet, les rôles de l'ACAN à l'échelle cellulaire notamment son interférence possible avec la signalisation neuronale n'ont pas été, à ce jour, explorés. De même, le rôle de l'ACAN dans l'activité électrique des neurones reste à explorer. Le PNN est capable de moduler la fréquence des potentiels d'action des neurones qu'il entoure (Wingert and Sorg 2021). Il serait donc envisageable que le dépôt d'ACAN présent autour des neurones NPY/AgRP de l'ARH module l'activité électrique de ces neurones afin d'induire une réponse adaptée pour le maintien de l'équilibre énergétique. Des études électrophysiologiques ex vivo pourraient éclairer sur le rôle de l'ACAN dans l'activité électrique des neurones NPY/AgRP selon leur localisation et en fonction du statut métabolique de l'individu.

L'identification de ces divers rôles cellulaires de l'ACAN pourraient rapidement conduire à considérer ce protéoglycane comme un modulateur capital des réponses centrales aux hormones métaboliques.

- **Les propriétés de la barrière de diffusion entre EM et ARH restent encore obscures**

L'injection de Dextrans de tailles variables, allant de 3 à 40 kDa, nous a permis de déterminer que la barrière de diffusion entre l'EM et l'ARH pouvait bloquer des molécules de bas poids moléculaire à savoir de 3 kDa. Les données de la littérature concernant la capacité de la barrière EM/ARH à bloquer les molécules périphériques en fonction de leur poids moléculaires sont particulièrement contradictoires notamment car des résultats divergent quant aux molécules atteignant le parenchyme de l'EM. En effet, certaines

études estiment que les molécules de poids moléculaire supérieur à 10kDa ne diffusent pas dans le parenchyme de l'éminence médiane (Morita and Miyata 2012, 2013), d'autres suggèrent que les molécules de poids moléculaire supérieur à 70kDa ne peuvent pas atteindre le parenchyme de l'EM (Schaeffer et al. 2013) enfin, des immunoglobulines endogènes (IgG) dont le poids moléculaire est de 150kDa ont été détectées dans le parenchyme de l'EM ((Ciofi 2011) et nos propres résultats non présentés). Nos travaux ont d'autre part montré que l'albumine endogène (66kDa) s'accumule dans le parenchyme de l'éminence médiane et reste bloquée à la frontière EM/ARH. Une explication probable pour ces résultats incohérents repose sur les grandes variations de protocoles entre ces études notamment concernant la quantité de traceur injectée aux animaux et la voie d'injection. Nous pouvons ainsi facilement supposer que les injections périphériques de très grandes quantités de traceurs génèrent des encombrements stériques au niveau des fenestrations vasculaires ou au niveau de la barrière EM/ARH. Nous avons cherché à évaluer ce paramètre en injectant par voie intraveineuse le Dextran de 3 kDa à différentes concentrations (résultats non présentés dans ce manuscrit), mais, à ce jour, nous n'avons pas encore abouti à une conclusion suffisamment robuste. De même, des injections intraveineuses ou intrapéritonéales de traceurs n'aboutissent pas forcément à une concentration similaire de traceurs au niveau des fenestrations vasculaires ou de la barrière EM/ARH. Notre choix d'utiliser l'albumine, une molécule circulante endogène abondante dans la circulation sanguine, afin d'évaluer l'intégrité de la barrière EM/ARH nous a permis de travailler dans des conditions proches de la physiologie et d'éviter les biais liés aux concentrations de traceur injecté et au site d'injection.

Il est également primordial de considérer que le poids moléculaire n'est peut-être pas le seul paramètre à prendre en considération pour la diffusion des molécules au niveau de la barrière EM/ARH. En effet, la structure tridimensionnelle d'une molécule, qui peut être lâche ou à l'inverse très compactée, devrait également interférer avec sa diffusion ou son blocage à la frontière EM/ARH. Les Dextrans couplés aux fluorophores, fréquemment utilisés pour l'étude des propriétés de diffusion de la barrière, sont des polysaccharides et ont donc une structure linéaire.

La nature de la molécule peut également avoir une importance sur sa capacité à diffuser à travers la barrière EM/ARH. Comme précisé ci-dessus, les Dextrans utilisés

sont des polysaccharides, alors que la ghréline et la leptine au cœur de notre étude sont des protéines.

Enfin, les fluorophores couplés aux Dextrans, qui nous permettent de les repérer au sein des tissus, sont parfois porteurs de charges qui pourraient interférer avec leur diffusion ou leur blocage par la barrière EM/ARH. En l'occurrence, les fluorophores Cascade Blue et fluorescéine (couplés aux Dextrans 3 kDa et 40 kDa respectivement) ont une charge globale négative alors que le Texas Red a une charge neutre. Or, l'ACAN, constituant majeur de la barrière de diffusion, porte de nombreuses chaînes latérales dont les sulfatations confèrent au PG une charge globale négative. Afin d'évaluer si la charge globale de la molécule a un impact sur sa capacité à diffuser à travers la barrière EM/ARH, nous avons comparé l'injection à la même concentration du Dextrans 3 kDa couplé au Cascade Blue et au Texas Red (résultats non présentés dans ce manuscrit) mais n'avons pas observé de différence de diffusion entre ces deux traceurs. Ainsi, les propriétés de diffusion de la barrière EM/ARH restent encore largement méconnues et méritent d'être examinées avec précision en explorant l'influence de la charge, de la structure et de la nature de la molécule qui atteint cette région cérébrale.

- **Le remodelage du dépôt d'ACAN à la frontière entre l'EM et l'ARH rendrait la barrière de diffusion plastique en fonction du statut métabolique**

Notre étude a révélé un remodelage de l'ACAN en fonction du statut alimentaire en démontrant des variations transcriptionnelles et protéiques pour ce protéoglycane chez les animaux à jeun comparés aux souris nourries ou renourries après un jeûne. Ce remodelage de l'ACAN avec le statut alimentaire souligne son rôle majeur dans la régulation de la prise alimentaire.

Il aurait été intéressant de compléter notre analyse en évaluant l'état de sulfatation de l'ACAN dans cette région cérébrale chez des animaux à jeun ou nourris. En effet, l'état de sulfatation des GAGs portés par l'ACAN jouent un rôle crucial dans l'établissement des fonctions physiologiques de ce protéoglycane (Testa et al. 2019). Parallèlement, il aurait été intéressant d'évaluer les variations d'expression transcriptionnelle, d'expression protéique ou le degré de sulfatation de l'ACAN en fonction du rythme circadien. En effet, le blocage ou la diffusion du glucose au sein de l'ARH semble être liée aux phases diurne ou nocturne chez la souris (Rodríguez-Cortés et al. 2022). Il est alors envisageable que l'ACAN subisse un remodelage en fonction du rythme circadien

afin de moduler les communications entre la périphérie et le cerveau pour répondre au besoin de l'organisme.

Des auteurs ont montré l'existence d'un dépôt de PNN dans le parenchyme de l'EM, également remodelé en fonction du statut métabolique de l'animal (Kohnke et al. n.d.). D'après nos résultats, ce dépôt de PNN ne comporte pas d'ACAN. Nous pouvons imaginer que les différences de composition entre ces deux dépôts de PNN sous-tendent des fonctions physiologiques distinctes.

Bien que nous ayons mis en évidence la plasticité du dépôt d'ACAN au cours du jeûne, permettant une adaptation de la barrière de diffusion à la frontière EM/ARH en fonction de l'état nutritionnel afin d'ajuster les communications périphérie/cerveau de l'organisme pour maintenir l'homéostasie énergétique, les mécanismes qui régissent cette restructuration ne sont pas connus. Des études de l'ACAN dans le cartilage ont montré que ce PG est clivé par les MMPs et les aggrecanases appartenant à la famille des ADAMTS (Flannery et al. 1992; Fosang et al. 1993; Hughes et al. 1995; Ilic et al. 1992). Ces protéases sont également exprimées dans le cerveau. Il serait donc intéressant de déterminer si les niveaux d'expression de ces protéases dans cette région du cerveau varient également en fonction du statut alimentaire. Il n'est pas non plus exclu que des inhibiteurs de protéases (TIMPs) inhibant les MMPs (Nagase, Visse, and Murphy 2006) soient également impliqués dans le remodelage de l'ACAN dans cette région cérébrale. En particulier, TIMP-3, capable d'inhiber les ADAMTS (Hashimoto et al. 2001; Kashiwagi et al. 2001) pourrait aussi participer aux régulations du remodelage protéique de l'ACAN. Enfin, il restera à déterminer quel mécanisme moléculaire conduit à une augmentation de l'expression transcriptionnelle de l'ACAN au cours du jeune. Deux hypothèses pourraient être explorées : 1) des variations de taux d'hormones métaboliques circulantes ou 2) des variations de taux de nutriments circulants.

- **L'ACAN modulerait la bio-distribution des hormones périphériques métaboliques aux neurones de l'ARH selon un mécanisme qui reste à identifier**

Les résultats obtenus quant à l'activation des neurones NPY/AgRP par la ghréline, avec ou sans destruction de la barrière, suggèrent que le rôle répressif de l'ACAN sur l'effet orexigène de la ghréline est en fait dû à la capacité de ce PG à limiter la biodistribution de cette hormone métabolique. La signalisation de la ghréline sur les neurones stimulant l'appétit situés au-delà de la frontière EM/ARH est de ce fait retardée.

En revanche, le rôle promoteur de l'ACAN sur l'effet anorexigène de la leptine ne semble pas être uniquement dû à une régulation de la bio-distribution de cette hormone métabolique par ce protéoglycane. En effet, lorsque la bio-distribution de la leptine a été améliorée par la rupture de l'ACAN, nous n'avons pas observé une augmentation du nombre de neurones POMC activés par la leptine au-delà de la frontière ME/ARH lorsque les animaux sont nourris. Ce résultat suggère que l'activation des neurones à POMC par la leptine n'est pas limitée par la barrière ME/ARH. Inversement, la barrière est absolument essentielle à l'effet inhibiteur de la leptine sur les neurones NPY/AgRP en état de jeûne. L'enchevêtrement des neurones NPY/AgRP par l'ACAN pourrait participer non seulement à l'accumulation de la leptine autour de ces neurones mais aussi à la signalisation de cette hormone métabolique.

Des études menées sur l'ACAN dans le cartilage montrent la capacité de l'ACAN à séquestrer de nombreuses molécules telles que des cytokines, des facteurs de croissance, des récepteurs de surface cellulaire, des molécules d'adhésion ou encore des enzymes grâce aux GAGs fixés le long de la core protéine (Shi, Sheng, and Chi 2021; Vo et al. 2013; Zhang and Chi 2021). Il serait donc intéressant de déterminer si à l'instar de l'ACAN présent dans le cartilage, l'ACAN au niveau du cerveau est capable de fixer des molécules et en particulier des hormones métaboliques telles que la ghréline ou la leptine, et ainsi expliquer le mécanisme permettant le blocage de ces molécules à la frontière EM/ARH.

- **La barrière EM/ARH générée par l'ACAN pourrait-elle présenter un dimorphisme sexuel ?**

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit a été réalisé chez des souris C57BL/6J mâles. Il est absolument indispensable d'envisager une étude similaire chez des souris femelles afin d'établir si la barrière de diffusion à la frontière ME/ARH pourrait varier entre les mâles et les femelles. Cette hypothèse n'est pas du tout exclue car les neurones de l'hypothalamus sont sensibles aux estrogènes (Stincic, Rønnekleiv, and Kelly 2018) et cette sensibilité pourrait contribuer à moduler l'expression de l'ACAN de façon différente à la frontière EM/ARH entre les femelles et les mâles. Les modifications possibles de la barrière de diffusion à la frontière ME/ARH sont ainsi également envisageables en fonction du cycle estral des souris femelles au moment où les taux d'estrogène varient. De même, au moment de la ménopause quand les taux d'estrogène circulant s'effondrent, il est possible que l'expression de l'ACAN soit également affectée.

Mettre en évidence des différences au niveau de l'expression transcriptionnelle ou protéique de l'ACAN ou au niveau de son degré de sulfatation entre les mâles et les femelles ouvrirait de nouvelles voies à explorer quant au dimorphisme sexuel envers le comportement alimentaire ou l'homéostasie énergétique.

- **La barrière EM/ARH générée par l'ACAN est-elle présente chez l'Homme ?**

Notre étude s'est focalisée sur l'analyse de la barrière à la frontière entre l'éminence médiane et l'ARH chez la souris et n'a pas encore abordé l'étude de celle-ci chez l'homme. Il sera particulièrement important d'examiner cette barrière chez l'homme notamment ses altérations possibles en fonction de pathologies métaboliques. Il est déjà établi que du PNN est retrouvé à la frontière entre l'éminence médiane et l'ARH chez l'Homme (Mirzadeh et al. 2019), suggérant que cette barrière existerait chez l'homme. Il reste à ce jour à évaluer si, comme chez la souris, l'ACAN est le principal constituant présent à la frontière entre l'EM et l'ARH. Si tel était le cas, l'analyse du dépôt d'ACAN à la frontière EM/ARH pourrait être envisagé dans des situations d'obésité, de syndrome de Prader Willis (Cassidy et al. 2012), d'anorexie, de boulimie etc. A ce jour, il n'est pas exclu que cette barrière de diffusion puisse aussi être affectée dans d'autres pathologies telle que les maladies neurodégénératives et son analyse pourra être à terme envisager dans ces diverses situations.

Conclusion générale

Alors que la nature de la barrière à la frontière entre l'EM et l'ARH n'était pas clairement définie, nos résultats ont non seulement démontré le rôle majeur de l'ACAN pour le blocage des molécules dans cette zone cérébrale, mais aussi le remodelage dynamique du dépôt d'ACAN en fonction du statut métabolique de l'animal. Cette plasticité induit une modification des propriétés de diffusion de la barrière formée par l'ACAN à la frontière entre l'EM et l'ARH, et de ce fait également l'accès des molécules périphériques aux neurones de l'ARH. Toutefois, les mécanismes régissant la restructuration de la barrière demeurent inexplorés. Ces travaux soulignent également le lien particulier entre l'ACAN localisé à la frontière entre l'EM et l'ARH et les neurones NPY/AgRP de l'ARH. Il reste pourtant à établir comment l'ACAN influence les propriétés des neurones à NPY/AgRP en particulier son impact sur la signalisation induite par les hormones métaboliques circulantes au niveau de ces cellules.

Enfin, ce travail a également permis la mise en place et la caractérisation d'un modèle murin d'obésité utilisant une nourriture riche en gras, en fructose et en cholestérol, montrant l'induction anormale d'une forte expression de l'ACAN au niveau du DMH. Il serait intéressant d'évaluer la cinétique d'apparition de ce dépôt anormal d'ACAN dans le DMH au cours de l'évolution de la pathologie, et d'établir éventuellement, dans ces conditions, comment change le dépôt d'ACAN à la frontière entre l'EM et l'ARH.

Prises dans leur ensemble, les données de ce travail de thèse ont mis en lumière pour la première fois le rôle de l'ACAN en tant que modulateur de l'accès des molécules métaboliques périphériques aux neurones de l'ARH, et donc son importance dans la régulation centrale de la consommation alimentaire.

Matériel et méthodes

1. Les animaux

Les animaux provenant de la lignée transgénique NPY-GFP (B6.FVB-Tg^{(Npy-hrGFP)1Lowl/J}) ainsi que des animaux sauvages C57BL/6J ont été utilisés pour les expériences décrites dans ce manuscrit. La lignée AgRP-Cre Tomato a été obtenue par croisement entre des mâles $AgRP^{tm1(cre)Lowl/J}$ et des femelles ROSA-tdTomato^{loxP-STOP-loxP}). La lignée B6.FVB-Tg^{(Npy-hrGFP)1Lowl/J} provient de Jackson Laboratory et a été maintenue au laboratoire sur fond génétique C57BL/6J. Les souris C57BL/6J ont été fournies par Charles River. Les animaux utilisés pour l'ensemble des expériences étaient des mâles âgés entre 7 et 12 semaines. A l'exception des expériences nécessitant un suivi individuel de la prise alimentaire, les animaux sont placés 4 à 5 par cage avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Les animaux suivent un cycle jour/nuit de 12h : 12h, et les suivis de prise alimentaire sont réalisés durant la phase diurne.

Des cerveaux de souris issues d'un modèle présentant une mutation hypomorphique pour l'ACAN ($Acan^{CreERT2}$ ou $Agc1^{CreERT2}$) ainsi que d'un modèle déficient pour l'ACAN par recombinaison homologue nous ont gracieusement été fournis par Dr Paolo Alberton et Dr Attila Aszodi du département d'orthopédie et de chirurgie traumatologique, Centre universitaire musculo-squelettique de Munich, en Allemagne.

Les études réalisées sur les animaux ont été effectuées avec l'accord du Comité d'Éthique Institutionnel régional pour le soin et l'utilisation d'animaux expérimentaux (CEEA75) et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (APAFIS#29172), et sous les directives définies par le conseil de l'Union Européenne du 22 septembre 2010 (2010/63/EU). Cette procédure est une continuité d'un protocole précédemment évalué et validé par le comité d'éthique (APAFIS#2617).

2. Mise à jeun pour l'étude de la plasticité

Une semaine avant le début de l'expérience, les animaux sont séparés en trois groupes : les groupes nourris, correspondant au groupe contrôle, ainsi que les groupes à jeun et renourris. Sur la base de l'article de Kohnke et al. de 2021, les animaux des groupes à jeun et renourris ont été mis à jeun la veille au soir juste avant le début de leur phase nocturne (19 heures) pour une durée de 16 heures. Les groupes nourris et à jeun sont donc sacrifiés le lendemain à 11 heures, alors que les animaux du groupe renourri reçoivent de la nourriture pour une durée de 4 heures et sont sacrifiés à 15 heures. Les

cerveaux des souris de chacun des groupes sont soit directement récupérés en PFA 4% (voir § Tissu fixé), soit en RNAlater (cf. « Microdissections ») dans le but de procéder à une analyse qPCR.

3. Cohorte High fat diet (HFD)

3.1. Régime enrichi en gras

La cohorte de départ comprend 20 souris mâles C57BL/6J adultes. Celle-ci est divisée en deux groupes de taille égale : le groupe contrôle, dont la nourriture comporte 10% de matière grasse (Ref. : D09100304), et le groupe dont la nourriture est enrichie en graisse en fructose et en cholestérol (HFD-FC, 40%kCal de matière grasse, 15%kCal de fructose et 2% de cholestérol (Ref. : D09100310). Au début du régime, les souris étaient âgées entre 6 et 7 semaines. Au moment du sacrifice le cerveau, le pancréas, le foie et le gras péri-viscéral ont été collectés dans du PFA 4%, ainsi que du sang grâce aux tubes Microvette® cb 300 EDTA k2 à capillaire. Le plasma a été récupéré après 20 minutes de centrifugation à 2000 g. Les aliquots de plasma sont conservés à -80°C.

3.2. Test de tolérance au glucose (GTT)

Afin de réaliser ce test, les souris sont pesées et mises à jeun la veille au soir juste avant leur phase nocturne (19 heures) pour une durée de 14h et placées dans une nouvelle cage pour éviter la consommation des fèces durant la nuit. Le lendemain les souris sont pesées de nouveau et au temps 0 minutes – temps correspondant à l'injection de D-glucose (Sigma) –, les souris sont injectées 10 fois leur poids avec une solution de glucose concentrée à 150 mg/mL et préparée dans de l'eau stérile. La glycémie est mesurée 30 minutes avant l'injection de glucose et juste avant l'injection (temps 0) pour obtenir la glycémie basale, puis elle est mesurée à 15, 30, 60, 90, 120 et 150 minutes après l'injection de glucose. Du sang est également prélevé dans des tubes héparinés 30 minutes avant et 15 minutes après l'injection pour doser l'insuline par ELISA. La collecte de sang se fait par massage sur la longueur de la queue de l'animal, après en avoir très légèrement coupé l'extrémité en biseau. La glycémie est toujours mesurée avant la collecte de sang pour l'ELISA.

3.3. Test de tolérance à l'insuline (ITT)

Les animaux sont mis à jeun à 8 heures soit 5 heures avant le début de l'expérience. Comme pour le GTT décrit ci-dessus, la glycémie est prise 30 minutes avant et juste au moment de l'injection d'insuline – pour obtenir la glycémie basale. Les souris sont injectées 10 fois leur poids avec une solution d'insuline (Tableau 1) préparée en eau stérile et concentrée à 0.075U/mL. Suite à l'injection, la glycémie est prise aux temps 15, 30, 45, 60, 90 et 120 minutes. Une attention particulière est portée à l'ensemble des souris sur toute la durée de l'expérience afin d'éviter un coma hypoglycémique pouvant mener à la mort de l'animal. Si la glycémie devient trop faible et/ou que la souris montre des signes de faiblesse, l'animal est injecté 10 fois son poids avec une solution de D-glucose de 150 mg/mL préparée en eau stérile. Si cela se produit, l'animal est exclu de l'expérience pour les analyses.

3.4. ELISA insuline

Le test ELISA a été réalisé avec le kit *Ultrasensitive Mouse Insulin* de Mercodia et en suivant le protocole du fournisseur. Les analyses ont été réalisées sur 10 µL de plasma dilué dans 15 µL du calibrateur 0. La sensibilité du kit permet de détecter des concentrations d'insuline circulante chez la souris comprises entre 0.025 et 1.5 µg/mL.

4. Injections

4.1. Injections intracérébrales (Stéréotaxie)

Les souris sont anesthésiées sous isoflurane (5% puis 1,5%) durant toute la durée de l'opération. Elles sont maintenues sur un tapis chauffant et leurs yeux sont protégés du dessèchement par du gel (Ocrygel). Une seringue Hamilton de 2 µL (Hamilton® syringe, 7000 series, 2.0 µL, Neuros Syringe, Model 7002 KH, 30 gauge, Point Style 3) et le cadre stéréotaxique KopF® Instruments (California : Model 963/962 Ultra Precise Small Animal Stereotaxic) sont utilisés pour les injections. La chondroïtinase ABC (ChABC) ou l'ADAMTS5 (Tableau 2) ont été injectés en bilatéral au niveau de l'ARH aux coordonnées suivantes : axe antéro-postérieur = -1.1mm ; axe médio-latéral = +/- 0.3mm ; axe dorso-ventral = -6mm en référence au bregma. Les coordonnées ont été déterminées à l'aide de l'atlas de Paxinos (Paxinos and Franklin 2001). 100 nL de chaque enzyme ont été injectés à une vitesse de 25 nL/min dans chaque hémisphère cérébral de souris C57BL/6J ou NPY-GFP, et un temps de stabilisation de 4 minutes est attendu avant le

retrait de la seringue Hamilton. La peau du crâne est ensuite refermée à l'aide d'agrafes, et l'animal placé dans sa cage sur tapis chauffant et surveillé jusqu'à son réveil. Les animaux sont sacrifiés 48 heures après l'injection de ChABC ou ADAMTS-5. Les cerveaux sont ensuite soit récupérés en PFA 4% (voir paragraphe sur le traitement des cerveaux), soit immédiatement congelés (voir paragraphe sur le traitement des cerveaux).

4.2. Injections par voie rétro-orbitale

Les injections intraveineuses des Dextrans (Tableau 2) sont faites par la voie rétro-orbitale sur des souris C57BL/6J préalablement anesthésiées sous isoflurane. Le volume maximum injecté est de 100 μ L. Les animaux sont sacrifiés 20 minutes après l'injection, et le cerveau immédiatement récupéré en PFA 4% (voir paragraphe sur le traitement des cerveaux).

4.3. Injections intrapéritonéales

Les injections de ghréline, leptine, glucose et insuline sont faites par voie intrapéritonéale (Tableau 2) au niveau de l'abdomen de souris C57BL/6J ou NPY-GFP sans anesthésie préalable des animaux.

Tableau 2 : Liste des différents produits injectés

Produit	Fournisseur	Référence	Lot	Dose/concentration	Mode d'injection
* PBS 1X	Gibco	14200-067	2458833	10X (dilué au 1X en eau MilliQ)	Intracérébral Intrapéritonéal
Chondroitinase ABC	Proteus vulgaris	C3667	0000128063	$1.5 \cdot 10^{-3}$ M en PBS 1X	Intracérébral
rhADAMTS-5	R&D Systems	2198-AD	OLY1620091	1 μ g/ μ L	Intracérébral
Dextran 3 kDa Texas Red	Invitrogen	D3328	2295039	$1.5/3/6 \cdot 10^{-4}$ M en PBS 1X	Intraveineux
Dextran 10 kDa Texas Red	Invitrogen	D1863	2071940	$3 \cdot 10^{-4}$ M en PBS 1X	Intraveineux
Dextran 40 kDa Fluorescein	Invitrogen	D1845	2170306	$3 \cdot 10^{-4}$ M en PBS 1X	Intraveineux
Ghréline (rat)	Tocris Bioscience	1465	28A	2 mg/kg en NaCl 0.9%	Intrapéritonéal
Leptine (murine)	PeptoTech	450-31	111676 K1716	3 mg/kg en PBS 1X	Intrapéritonéal
D-glucose	Sigma	G7021	SLCJ1325	150 mg/mL en eau stérile	Intrapéritonéal
Insuline	Lilly Pharma	Umuline	Ø	0.075 U/mL	Intrapéritonéal

* PBS 10X composition : Chlorure de potassium (KCl) à 2 g/L ; Phosphate de monopotassium (KH_2PO_4) à 2 g/L ; Chlorure de sodium (NaCl) à 80 g/L ; Phosphate de sodium dibasique heptahydraté ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) à 21.6 g/L

5. Les challenges ghréline et leptine sur animaux

Ces expériences nécessitant un suivi individuel des animaux pour la prise alimentaire, les animaux sont individualisés une semaine avant l'expérience.

5.1. Challenges ghréline et leptine sans mise à jeun

48 heures après l'injection stéréotaxique (voir paragraphe Injections Injections intracérébrales (Stéréotaxie)) de PBS 1X pour les contrôles ou d'ADAMTS5, les animaux sont injectés soit avec de la ghréline soit avec de la leptine par voie intrapéritonéale aux concentrations indiquées dans le paragraphe injections intrapéritonéales). Leur prise alimentaire suivant les 30 minutes après l'injection intrapéritonéale est mesurée par pesée directe de la nourriture avant et après injection. Les animaux sont sacrifiés 30 minutes après injection par décapitation suite à une anesthésie à l'isoflurane. Les cerveaux sont immédiatement récupérés en PFA 4% (voir paragraphe traitement des cerveaux).

5.2. Challenge leptine avec mise à jeun

Le protocole suivi est le même que celui décrit ci-dessus, à l'exception d'une mise à jeun des animaux la veille de l'injection intrapéritonéale au début de la phase nocturne (19 heures) pour une durée de 16 heures. Le lendemain de la mise à jeun, les animaux sont injectés en intrapéritonéal avec de la leptine à la concentration indiquée dans le Tableau 1.

6. Préparation des tissus

Tous les animaux sont anesthésiés à l'isoflurane préalablement au sacrifice par décapitation, afin de limiter le stress et la douleur de l'animal autant que possible.

6.1. Préparation des cerveaux

6.1.1. Tissu frais

Après le sacrifice de l'animal, le cerveau est extrait de la boîte crânienne et est immédiatement inclus en OCT et congelé avec de la carboglace. Afin d'homogénéiser le processus de congélation, le bloc d'OCT est placé dans une cuve remplie d'isopentane, elle-même refroidie par la carboglace.

6.1.2. Tissu fixé

Immédiatement après le sacrifice de l'animal, le cerveau est plongé dans 10 volumes de paraformaldéhyde (PFA) 4% préparée en tampon phosphate salin (PBS 1X) et y est conservé jusqu'au lendemain à 4°C. Le cerveau est ensuite lavé 3 fois 10 minutes en PBS 1X avant d'être transféré dans une solution de sucrose 15% préparée en PBS, puis en solution de sucrose 30% afin de cryoprotéger le tissu. Après ces traitements, il est finalement placé en OCT et congelé avec de la carboglace. Afin d'homogénéiser le processus de congélation, le bloc d'OCT est placé dans une cuve remplie d'isopentane, elle-même refroidie par la carboglace.

6.1.3. Microdissections

Le cerveau est rapidement extrait de la boîte crânienne et est immédiatement plongé en RNAlater (Qiagen, #1018087) afin de préserver les ARNs. Le noyau arqué de l'hypothalamus (ARH) et l'éminence médiane (EM) sont microdisséqués dans le RNAlater sous loupe binoculaire puis placés dans un tube Eppendorf 2 mL et immédiatement congelés à sec dans de l'azote liquide. L'ensemble des échantillons est ensuite conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

6.2. Préparation des organes périphériques

Le foie, le pancréas et la graisse péri-viscérale prélevés sur les souris ayant suivi un régime enrichi en gras (HFD-FC) ont été fixés sur la nuit dans du PFA 4% à 4°C. Ils ont ensuite été lavés 3 fois 10 minutes avec du PBS 1X, puis déshydraté en les passant 3 fois 10 minutes dans de l'éthanol 30%, et en les laissant ensuite la nuit à 4°C dans de l'éthanol 70%. Les échantillons sont traités par la section Histologie de la plateforme Bicel de Lille, où ils sont préparés pour être inclus en paraffine. Les organes ont ensuite été coupés à 5 µm d'épaisseur et colorés en hématoxyline/éosine (HE ; Hématoxyline :

Papanicolaou Harris hematoxylin. BIO-OPTICA, ref 05-12011 / Eosine Y 1% en eau MilliQ (ACROS ORGANICS, ref 152881000) et rouge Sirius (RS ; Rouge Sirius ALFA AESAR, Direct red 80 ref B21693 à 0,1% dans l'acide picrique à saturation dans l'eau Milli-Q / Hématoxyline de Weigert) pour analyse.

7. Coupe des cerveaux congelés

Les cerveaux sont coupés au cryostat (Leica, CM3050 S), et les tranches sont récupérées directement sur lame pour les tissus frais (18 µm d'épaisseur) et sur lame (14µm d'épaisseur) ou en flottant (35 µm d'épaisseur) pour les tissus fixés. La température de la chambre est fixée à -20°C, et la température objet à -18°C. Les lames sont conservées à -20°C et les coupes flottantes à 4°C dans du PBS 1X 0.05% NaN₃.

8. Immunohistochimie

Les différents immunomarquages ont été réalisés sur les tranches de cerveau de souris C57BL/6J ou issues des lignées NPY-GFP, *Acan^{CreERT2}* ou déficients pour l'ACAN (*Acan^{+/-}*).

8.1. Immunohistochimie sur coupes flottantes de cerveau

Les tranches sont incubées 1 heure dans un tampon de blocage (5% NDS ; 0.3% Triton X-100 en PBS 1X) à température ambiante, puis 48 heures avec la lectine WFA (Sigma ; L1516 ; lot : SLBX7496) pour le PNN ou l'anticorps primaire (albumine, ensemble des CSPGs, POMC, du cfos et tyrosine hydroxylase), ou sur la nuit (Iba-1 et CD45) à 4°C aux concentrations indiquées dans le tableau 2. Au terme de l'incubation avec l'anticorps primaire, les tranches sont lavées 3 fois 10 minutes avec du PBS 1X, puis incubées 2 heures à l'abris de la lumière avec l'anticorps secondaire (Tableau 4) + 0.3% Triton X-100 dilués en PBS 1X. Les tranches sont ensuite lavées 3 fois 10 minutes au PBS 1X, contre-colorées au DAPI (1/5000 concentration 5 mg/mL en PBS 1X) 5 minutes, puis lavées 2 fois 10 minutes en PBS 1X avant d'être montées sur lame au Mowiol.

Le marquage cfos nécessite une étape supplémentaire d'amplification du signal. Après l'incubation avec l'anticorps primaire (48 heures à 4°C), les tranches sont incubées

dans une solution contenant un anticorps anti-lapin biotinylé (voir Tableau 3) + 0.3% de Triton X-100 + 0.25% de BSA dilués en PBS 1X pendant 90 minutes à température ambiante. Après 3 lavages de 10 minutes en PBS 1X, les tranches sont incubées 2 heures à température ambiante dans la solution d'anticorps secondaire décrite ci-dessus avec de la streptavidine conjuguée à un fluorophore. La fin du protocole est identique à celle décrite ci-dessus.

8.2. Immunohistochimie sur coupes de cerveau adhérentes

Le double marquage ZO-1/Collagène IV (Coll IV) est réalisé à partir de tranches de cerveaux récupérées sur lame. Les lames sont fixées 1 minute à -20°C dans un mélange 50% acétone + 50% méthanol froid, puis séchées 5 à 10 minutes sous hotte avant d'être lavées 3 fois 10 minutes en PBS 1X. Les tranches sont ensuite incubées 1 heure à température ambiante dans la solution de blocage (5% serum + 0.3% Triton X-100 dilués en PBS 1X), puis sur la nuit à 4°C dans la solution d'incubation des anticorps primaires (5% serum + 0.3% Triton X-100 contenant l'anticorps primaires à la concentration indiquée dans le Tableau 2 et dilués en PBS 1X). Les lames sont ensuite rincées 6 fois 10 minutes en PBS1X, avant d'incuber les coupes 2 heures à température ambiante dans la solution d'anticorps secondaires (5% serum + 0.3% Triton X-100 contenant l'anticorps secondaires à la concentration indiquée dans le Tableau 3 et dilués en PBS 1X). Enfin, les lames sont rincées 3 fois 10 minutes en PBS 1X, contre-colorées au DAPI (5 mg/mL, 1/5000 en PBS 1X) et lavées à nouveau 2 fois 10 minutes avant d'être montées au Mowiol.

Pour le marquage phosphor-mTOR, un démasquage des antigènes est nécessaire. Pour cela, les coupes sont incubées dans une solution de citrate de sodium à 10 mM à 80°C pour 20 minutes. Elles sont ensuite incubées dans la solution de blocage décrite ci-dessus, puis dans la solution d'anticorps primaire (voir Tableau 2) pour 72 heures à 4°C. La suite du protocole est ensuite identique à celle décrite ci-dessus.

Tableau 3 : Liste des anticorps primaires

Anticorps primaires	Fournisseur	Référence	Lot	Espèce hôte	Concentration	Dilution
Aggrecan	EMD Millipore	AB1031	3530679	Rabbit	0.5 mg/mL	1/500
Versican	Abcam	ab19345	Ø	Rabbit	Ø	1/250
HABP	EMD Millipore	385911	3274405		0.5 mg/mL	1/50
Neurocan	R&D Systems	AF5800	CDGF022002 B	Sheep	2.310 mg/mL	5 µg/mL
Tenascine R	R&D Systems	AF3865	YLM022002B	Goat	0.256 mg/mL	5 µg/mL

p-mTOR (S2448)	Cell Signalling	2976S	8	Rabbit	∅	1/60
c-fos	Synaptic Systems	226003	226003	Rabbit	50 µg	1/1000
Tyrosine hydroxylase	Abcam	ab113	GR3277795-25	Sheep	0.15 mg/mL	1/1000
Albumine	Abcam	ab8940	GR3234407-10	Sheep	19.7 mg/mL	1/500
Zo-1	Invitrogen	61-7300	SH252320	Rabbit	0.25 mg/mL	1/500
Coll IV	EMD Millipore	AB769	3166053	Goat	0.4 mg/mL	1/500
POMC	Phoenix Laboratory	H-029-30	2	Rabbit	∅	1/1000
Iba-1		019-19741	CAG5175	Rabbit	50 µg	1/500
CD45	BD Biosciences	550539	3354831	Rat	0.0625 mg/mL	1/500

Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires

Anticorps secondaires	Fluorophore	Fournisseur	Dilution
Donkey α Rabbit	Alexa Fluor 488	Jackson Immuno Research	1/500
Donkey α Rabbit	Alexa Fluor 568	Jackson Immuno Research	1/500
Donkey α Rabbit	Alexa Fluor 647	Jackson Immuno Research	1/500
Donkey α Sheep	Alexa Fluor 568	Jackson Immuno Research	1/500
Donkey α Sheep	Alexa Fluor 647	Jackson Immuno Research	1/500
Donkey α Goat	Alexa Fluor 488	Jackson Immuno Research	1/500
Donkey α Rabbit biotinylé	Alexa Fluor 568	Jackson Immuno Research	1/500
Streptavidine	Alexa Fluor 568	Invitrogen	1/1000

9. Hybridation *in situ* par RNAscope

Seules les coupes de tissus frais ont été utilisées pour réaliser des analyses d'hybridation *in situ* par RNAscope. Pour ces expériences, nous avons suivi le protocole fourni par ACDbio (« RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit V2 Assay »). L'ensemble des sondes utilisées est répertorié dans le Tableau 4.

Tableau 5 : Liste des sondes RNAscope

Sonde	Référence	Lot	Fluorophore	Dilution du fluorophore
ACAN (C1)	439101	20349C	Cy3	1/1500
NPY (C2)	313321	20363A	Cy3 /Cy5	1/2000
POMC (C2)	314081	21034C	Cy3 /Cy5	1/2000

10. Analyses par RT-qPCR

▣ **Extraction des ARNs** : les kits RNeasy® Mini Kit de Qiagen (ref: 74104) ou E.Z.N.A. Total RNA Kit II (Omega Bio-Tek, R6934-02) ont été utilisés selon les instructions du fournisseur. Les tissus ont été broyés à l'aide d'un polytron. Chaque échantillon est

ensuite dosé au NanoDrop (NanoDrop One ; ThermoFischer) et sa qualité est déterminé grâce aux ratios d'absorbance A260/A280 et A260/A230. Les ARNs sont ensuite conservés à -20°C.

▣ **RT-PCR** : Le kit *High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems™, ref 4368814)* a été utilisé. Pour chaque échantillon, 1 µg d'ARN a été ajouté à 10 µL du mélange de réverse transcription préparé selon les instructions du fabricant. Les échantillons sont ensuite chauffés à 25°C 10 minutes puis à 37°C 120 minutes et enfin à 85°C pendant 5 minutes dans le thermocycler Veriti (Applied Biosystems) : Les ADNc obtenus sont ensuite dilués 10 fois dans de l'eau ultra pure et conservés à -20°C.

▣ **qPCR** : Les ADNc dilués sont ajoutés au mélange TaqMan Master mix avec la sonde d'intérêt (décrite dans le Tableau 5). Le mélange réactionnel par puits est : 10 µL de Taqman Master Mix, 4 µL d'eau ultrapure, 1 µL de sonde Taqman et 5 µL d'ADNc dilué. La PCR en temps réel a été réalisée sur un appareil de PCR Applied Biosystems 7900HT en utilisant des tests d'expression génique TaqMan® spécifiques aux différentes sondes décrites au sein du tableau 5. Les échantillons sont chauffés à 50°C pendant 2 minutes puis 95°C pendant 10 minutes puis subissent 40 cycles de 15 secondes à 90°C et 1 minute à 60°C. Les niveaux d'expression pour les différents échantillons sont calculés par la méthode du $2^{-\Delta\Delta CT}$ en utilisant l'actine comme standard interne.

Tableau 6 : Liste des sondes TaqMan pour la qPCR

Fournisseur	Protéine	Nom du gène	Référence	Fluorophore
Thermo Fisher	ACAN	<i>Acan</i>	Mm00545794_m1	FAM
Applied Biosystems	ACTINE	<i>Actine</i>	4351315	VIC

11. Mesure de la surface occupée par l'aggrecan sur les coupes de cerveau après immunomarquage

Afin de mesurer la surface occupée par l'ACAN sur les coupes de cerveaux après immunomarquages dans nos différentes expériences, une macro ImageJ a été utilisée. Elle a permis de délimiter une surface fixe autour du marquage de l'ACAN, puis de calculer le ratio suivant : $\left(\frac{\text{surface couverte par le signal positif}}{\text{surface totale}} \right) * 100$. Cette analyse a été réalisée à partir d'images 2D (projection orthogonale de l'image brute en 3D) réalisées au microscope confocal à partir des cerveaux immunomarqués pour l'ACAN. La surface couverte par le signal positif (marquage ACAN) a été obtenue en calculant la surface

formée par l'ensemble des pixels dont l'intensité était supérieure à un seuil prédéterminé. Cette mesure est exprimée en unité arbitraire.

12. Comptage des neurones activés

Les comptages des neurones activés ont été réalisés à partir d'images prises au confocal à partir des coupes de cerveaux immunomarqués pour cFos. L'ensemble des images a été acquis et traité avec les mêmes paramètres. Seuls les marquages situés dans l'ARH ont été pris en considération pour le comptage des neurones. L'ARH a été divisé en 2 parties (dorsale et ventrale) et chaque hémisphère cérébral a été considéré de façon indépendante (Figure 35).

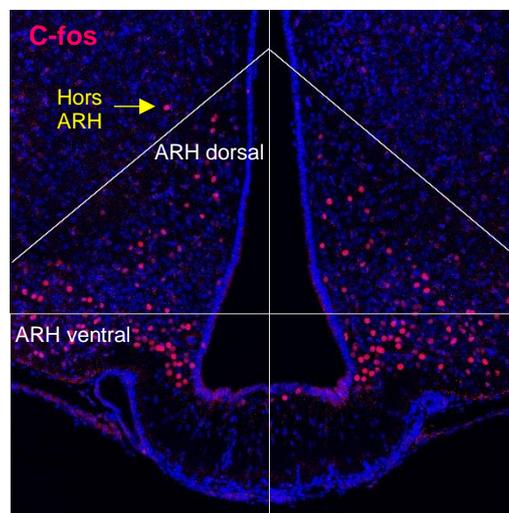


Figure 36 : Zones de comptage pour les challenges ghréline et leptine

Délimitation des zones de comptage : les deux hémisphères sont d'abord séparés par la ligne blanche centrale verticale. Le noyau arqué de l'hypothalamus (ARH) est délimité de chaque côté à l'aide du marquage DAPI (bleu) par les deux lignes blanches en diagonale. Enfin, les parties ventrales et dorsale de l'ARH sont séparées par la ligne blanche horizontale. Seul les neurones c-fos⁺ (en rouge) dans l'ARH sont comptés. La flèche jaune pointe un exemple de marquage non compté pour les analyses.

13. Analyses statistiques

Les données sont présentées sous forme de moyennes et d'erreurs standard de la moyenne (S.E.M.). Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9 (GraphPad, San Diego, CA). La distribution normale des échantillons a été testée grâce au test de Shapiro-Wilk. Pour comparer deux groupes dont la distribution est normale et ne présentant pas de différence significative des variances, un test t de Student non pairé a été utilisé. Si la distribution des échantillons est normale mais qu'il y a une différence significative entre les variances, la correction de

Welch est appliquée au test t. Dans le cas d'une distribution non-gaussienne des échantillons, le test de Mann-Whitney a été effectué. La comparaison de trois groupes ou plus dont la distribution est normale a été réalisée avec une analyse de variance (ANOVA) à un ou deux facteur(s), suivie du test de comparaison multiple. Si la distribution des échantillons n'est pas gaussienne ou que leur nombre est trop petit pour en assumer la normalité, le test de Kruskal-Wallis suivi de la comparaison multiple de Dunn a été préféré. Des ANOVA à mesures répétées ont été utilisées lorsque plusieurs mesures ont été effectuées au fil du temps dans les mêmes groupes. Les valeurs $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Bibliographie

- Abbott, Caroline R., Caroline J. Small, Adam R. Kennedy, Nicola M. Neary, Arshia Sajedi, Mohammad A. Ghatei, and Stephen R. Bloom. 2005. "Blockade of the Neuropeptide Y Y2 Receptor with the Specific Antagonist BIIIE0246 Attenuates the Effect of Endogenous and Exogenous Peptide YY(3-36) on Food Intake." *Brain Research* 1043(1–2):139–44.
- Abbott, N. Joan, Lars Rönnbäck, and Elisabeth Hansson. 2006. "Astrocyte-Endothelial Interactions at the Blood-Brain Barrier." *Nature Reviews. Neuroscience* 7(1):41–53.
- Abbruscato, Thomas J., Steve P. Lopez, Karen S. Mark, Brian T. Hawkins, and Thomas P. Davis. 2002. "Nicotine and Cotinine Modulate Cerebral Microvascular Permeability and Protein Expression of ZO-1 through Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed on Brain Endothelial Cells." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91(12):2525–38.
- Adrian, T. E., G. L. Ferri, A. J. Bacarese-Hamilton, H. S. Fuessl, J. M. Polak, and S. R. Bloom. 1985. "Human Distribution and Release of a Putative New Gut Hormone, Peptide YY." *Gastroenterology* 89(5):1070–77.
- Ahlma, R. S., D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier, and J. S. Flier. 1996. "Role of Leptin in the Neuroendocrine Response to Fasting." *Nature* 382(6588):250–52.
- Ahrén, Bo, Sven Månsson, Ronald L. Gingerich, and Peter J. Havel. 1997. "Regulation of Plasma Leptin in Mice: Influence of Age, High-Fat Diet, and Fasting." *The American Journal of Physiology* 273(1 Pt 2).
- Alberton, Paolo, Hans Christian Dugonitsch, Bastian Hartmann, Ping Li, Zsuzsanna Farkas, Maximilian Michael Saller, Hauke Clausen-Schaumann, and Attila Aszodi. 2019. "Aggrecan Hypomorphism Compromises Articular Cartilage Biomechanical Properties and Is Associated with Increased Incidence of Spontaneous Osteoarthritis." *International Journal of Molecular Sciences* 20(5).
- Alonge, Kimberly M., Zaman Mirzadeh, Jarrad M. Scarlett, Aric F. Logsdon, Jenny M. Brown, Elaine Cabrales, Christina K. Chan, Karl J. Kaiyala, Marie A. Bentsen, William A. Banks, Miklos Guttman, Thomas N. Wight, Gregory J. Morton, and Michael W. Schwartz. 2020. "Hypothalamic Perineuronal Net Assembly Is Required for Sustained Diabetes Remission Induced by Fibroblast Growth Factor 1 in Rats." *Nature Metabolism* 2(10):1025–33.
- Anand, Bal K., and John R. Brobeck. 1951. "Localization of a 'Feeding Center' in the Hypothalamus of the Rat." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 77(2):323–25.
- Antonsson, P., D. Heinegard, and A. Oldberg. 1989. "The Keratan Sulfate-Enriched Region of Bovine Cartilage Proteoglycan Consists of a Consecutively Repeated Hexapeptide Motif." *Journal of Biological Chemistry* 264(27):16170–73.
- Argraves, W. S., P. J. McKeown-Longo, and P. F. Goetinck. 1981. "Absence of Proteoglycan Core Protein in the Cartilage Mutant Nanomelia." *FEBS Letters* 131(2):265–68.

- Asada, Masahiro, Michiyo Shinomiya, Masashi Suzuki, Emi Honda, Rika Sugimoto, Masahiko Ikekita, and Toru Imamura. 2009. "Glycosaminoglycan Affinity of the Complete Fibroblast Growth Factor Family." *Biochimica et Biophysica Acta* 1790(1):40–48.
- Aspberg, Anders. 2012. "The Different Roles of AggreCAN Interaction Domains." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 60(12):987.
- Aspberg, Anders, Christoph Binkert, and Erkki Ruoslahti. 1995. "The Versican C-Type Lectin Domain Recognizes the Adhesion Protein Tenascin-R." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(23):10590.
- De Backer, Marijke W. A., Susanne E. La Fleur, and Roger A. H. Adan. 2011. "Both Overexpression of Agouti-Related Peptide or Neuropeptide Y in the Paraventricular Nucleus or Lateral Hypothalamus Induce Obesity in a Neuropeptide- and Nucleus Specific Manner." *European Journal of Pharmacology* 660(1):148–55.
- Bailey, Percival, and Frédéric Bremer. 1921. "Experimental Diabetes Insipidus." *Undefined* 28(6):773–803.
- Balland, Eglantine, Julie Dam, Fanny Langlet, Emilie Caron, Sophie Steculorum, Andrea Messina, S. Rasika, Anthony Falluel-Morel, Youssef Anouar, Bénédicte Dehouck, Eric Trinquet, Ralf Jockers, Sebastien G. Bouret, and Vincent Prévot. 2014. "Hypothalamic Tanycytes Are an ERK-Gated Conduit for Leptin into the Brain." *Cell Metabolism*.
- Balmer, Timothy S. 2016. "Perineuronal Nets Enhance the Excitability of Fast-Spiking Neurons." *ENeuro* 3(4):745–51.
- Banks, William A. 2008. "The Blood-Brain Barrier: Connecting the Gut and the Brain." *Regulatory Peptides* 149(1–3):11.
- Banks, William A., Abba J. Kastin, Weitao Huang, Jonathan B. Jaspan, and Lawrence M. Maness. 1996. "Leptin Enters the Brain by a Saturable System Independent of Insulin." *Peptides* 17(2):305–11.
- Banks, William A., Matthias Tschöp, Sandra M. Robinson, and Mark L. Heiman. 2002. "Extent and Direction of Ghrelin Transport across the Blood-Brain Barrier Is Determined by Its Unique Primary Structure." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302(2):822–27.
- Barritt, A. W., M. Davies, F. Marchand, R. Hartley, J. Grist, P. Yip, S. B. McMahon, and Elizabeth J. Bradbury. 2006. "Chondroitinase ABC Promotes Sprouting of Intact and Injured Spinal Systems after Spinal Cord Injury." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26(42):10856–67.
- Baskin, Denis G., Michael W. Schwartz, Randy J. Seeley, Stephen C. Woods, Daniel Porte, John F. Breininger, Zoë Jonak, Jonathan Schaefer, Michael Krouse, Charles Burghardt, L. Arthur Campfield, Paul Burn, and Jarema P. Kochan. 1999. "Leptin Receptor Long-Form Splice-Variant Protein Expression in Neuron Cell Bodies of the Brain and Co-Localization with Neuropeptide Y mRNA in the Arcuate Nucleus." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society* 47(3):353–62.
- Bauer, Paige V., Sophie C. Hamr, and Frank A. Duca. 2016. "Regulation of Energy Balance by a Gut-Brain Axis and Involvement of the Gut Microbiota." *Cellular and*

Molecular Life Sciences : CMLS 73(4):737–55.

- Baura, G. D., D. M. Foster, D. Porte, S. E. Kahn, R. N. Bergman, C. Cobelli, and M. W. Schwartz. 1993. "Saturable Transport of Insulin from Plasma into the Central Nervous System of Dogs in Vivo. A Mechanism for Regulated Insulin Delivery to the Brain." *The Journal of Clinical Investigation* 92(4):1824–30.
- Bazzoni, Gianfranco, and Elisabetta Dejana. 2004. "Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis." *Physiological Reviews* 84(3):869–901.
- Becker, Dominique J., Lumbe N. Ongemba, Vincent Brichard, Jean Claude Henquin, and Sonia M. Brichard. 1995. "Diet- and Diabetes-Induced Changes of Ob Gene Expression in Rat Adipose Tissue." *FEBS Letters* 371(3):324–28.
- Bednarek, M. A., S. D. Feighner, S. S. Pong, K. K. McKee, D. L. Hreniuk, M. V. Silva, V. A. Warren, A. D. Howard, L. H. Y. Van der Ploeg, and J. V. Heck. 2000. "Structure-Function Studies on the New Growth Hormone-Releasing Peptide, Ghrelin: Minimal Sequence of Ghrelin Necessary for Activation of Growth Hormone Secretagogue Receptor 1a." *Journal of Medicinal Chemistry* 43(23):4370–76.
- Benoit, Stephen C., Ellen L. Air, Lique M. Coolen, Richelle Strauss, Alana Jackman, Deborah J. Clegg, Randy J. Seeley, and Stephen C. Woods. 2002. "The Catabolic Action of Insulin in the Brain Is Mediated by Melanocortins." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22(20):9048–52.
- Bernacki, Jacek, Aleksandra Dobrowolska, Katarzyna Nerwińska, and Andrzej Małecki. 2008. "Physiology and Pharmacological Role of the Blood-Brain Barrier." *Pharmacological Reports* 60(5):600–622.
- BERNSTEIN, L. M., and M. I. GROSSMAN. 1956. "An Experimental Test of the Glucostatic Theory of Regulation of Food Intake." *The Journal of Clinical Investigation* 35(6):627–33.
- Berthoud, Hans Rudolf. 2002. "Multiple Neural Systems Controlling Food Intake and Body Weight." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26(4):393–428.
- Bjørnbæk, Christian, Joel K. Elmquist, Patrick Michl, Rexford S. Ahima, Antonia van Bueren, Anthony L. McCall, and Jeffrey S. Flier. 1998. "Expression of Leptin Receptor Isoforms in Rat Brain Microvessels." *Endocrinology* 139(8):3485–91.
- Borison, Herbert L., and Kenneth R. Brizzee. 1951. "Morphology of Emetic Chemoreceptor Trigger Zone in Cat Medulla Oblongata." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 77(1):38–42.
- Broadwell, R. D., B. J. Balin, M. Salcman, and R. S. Kaplan. 1983. "Brain-Blood Barrier? Yes and No." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80(23):7352–56.
- Brobeck, J. R. 1946. "Mechanism of the Development of Obesity in Animals with Hypothalamic Lesions." *Physiological Reviews* 26(4):541–59.
- Brobeck, John R., Jay Tepperman, and C. N. H. Long. 1943. "Experimental Hypothalamic Hyperphagia in the Albino Rat." *The Yale Journal of Biology and Medicine* 15(6):831.

- Brückner, G., J. Grosche, S. Schmidt, W. Härtig, R. U. Margolis, B. Delpech, C. I. Seidenbecher, R. Czaniera, and M. Schachner. 2000. "Postnatal Development of Perineuronal Nets in Wild-Type Mice and in a Mutant Deficient in Tenascin-R - PubMed." *Journal of Comparative Neurology*. Retrieved September 13, 2022 (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11077416/>).
- Brückner, Gert, Kurt Brauer, Wolfgang Härtig, Joachim R. Wolff, Michael J. Rickmann, Amin Derouiche, Bertrand Delpech, Nicole Girard, Wolfgang H. Oertel, and Andreas Reichenbach. 1993. "Perineuronal Nets Provide a Polyanionic, Glia-Associated Form of Microenvironment around Certain Neurons in Many Parts of the Rat Brain." *Glia* 8(3):183–200.
- Bruning, J. C., D. Gautam, D. J. Burks, J. Gillette, M. Schubert, P. C. Orban, R. Klein, W. Krone, D. Muller-Wieland, and C. R. Kahn. 2000. "Role of Brain Insulin Receptor in Control of Body Weight and Reproduction." *Science (New York, N.Y.)* 289(5487):2122–25.
- Campbell, John N., Evan Z. Macosko, Henning Fenselau, Tune H. Pers, Anna Lyubetskaya, Danielle Tenen, Melissa Goldman, Anne M. J. Versteegen, Jon M. Resch, Steven A. McCarroll, Evan D. Rosen, Bradford B. Lowell, and Linus T. Tsai. 2017. "A Molecular Census of Arcuate Hypothalamus and Median Eminence Cell Types." *Nature Neuroscience* 20(3):484–96.
- Campfield, L. Arthur, Peter Brandon, and Francoise J. Smith. 1985. "On-Line Continuous Measurement of Blood Glucose and Meal Pattern in Free-Feeding Rats: The Role of Glucose in Meal Initiation." *Brain Research Bulletin* 14(6):605–16.
- Campfield, L. Arthur, Françoise J. Smith, Yves Guisez, Rene Devos, and Paul Burn. 1995. "Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks." *Science (New York, N.Y.)* 269(5223):546–49.
- Cannon, Walter B. 1929. "Organization for Physiological Homeostasis." *Physiological Reviews* 9(3):399–431.
- Carpenter, David O., Dean B. Briggs, and Norman Strominger. 1983. "Responses of Neurons of Canine Area Postrema to Neurotransmitters and Peptides." *Cellular and Molecular Neurobiology* 3(2):113–26.
- Carulli, Daniela, Kate E. Rhodes, David J. Brown, Timothy P. Bonnert, Scott J. Pollack, Kevin Oliver, Piergiorgio Strata, and James W. Fawcett. 2006. "Composition of Perineuronal Nets in the Adult Rat Cerebellum and the Cellular Origin of Their Components." *The Journal of Comparative Neurology* 494(4):559–77.
- Cassidy, Suzanne B., Stuart Schwartz, Jennifer L. Miller, and Daniel J. Driscoll. 2012. "Prader-Willi Syndrome."
- Celio, Marco R., Roberto Spreafico, Silvia De Biasi, and Laura Vitellaro-Zuccarello. 1998. "Perineuronal Nets: Past and Present." *Trends in Neurosciences* 21(12):510–15.
- Chaudhri, Owais B., Katie Wynne, and Stephen R. Bloom. 2008. "Can Gut Hormones Control Appetite and Prevent Obesity?" *Diabetes Care* 31 Suppl 2.
- Cheung, Clement C., Donald K. Clifton, and Robert A. Steiner. 1997.

- "Proopiomelanocortin Neurons Are Direct Targets for Leptin in the Hypothalamus." *Endocrinology* 138(10):4489–92.
- Ciofi, Philippe. 2011. "The Arcuate Nucleus as a Circumventricular Organ in the Mouse." *Neuroscience Letters* 487(2):187–90.
- Ciofi, Philippe, Maurice Garret, Olivier Lapirot, Pierrette Lafon, Anne Loyens, Vincent Prévot, and Jon E. Levine. 2009. "Brain-Endocrine Interactions: A Microvascular Route in the Mediobasal Hypothalamus." *Endocrinology* 150(12):5509–19.
- Clapper, Jason R., Michelle D. Hendricks, Guibao Gu, Carrie Wittmer, Carrie S. Dolman, John Herich, Jennifer Athanacio, Christiane Villescaz, Soumitra S. Ghosh, Joseph S. Heilig, Carolyn Lowe, and Jonathan D. Roth. 2013. "Diet-Induced Mouse Model of Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis Reflecting Clinical Disease Progression and Methods of Assessment." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 305(7).
- Clasadonte, Jerome, and Vincent Prevot. 2018. "The Special Relationship: Glia-Neuron Interactions in the Neuroendocrine Hypothalamus." *Nature Reviews Endocrinology* 14(1):25–44.
- Collden, Gustav, Eglantine Balland, Jyoti Parkash, Emilie Caron, Fanny Langlet, Vincent Prevot, and Sebastien G. Bouret. 2015. "Neonatal Overnutrition Causes Early Alterations in the Central Response to Peripheral Ghrelin." *Molecular Metabolism* 4(1):15.
- Cone, Roger D. 2005. "Anatomy and Regulation of the Central Melanocortin System." *Nature Neuroscience* 8(5):571–78.
- Corvetti, Luigi, and Ferdinando Rossi. 2005. "Degradation of Chondroitin Sulfate Proteoglycans Induces Sprouting of Intact Purkinje Axons in the Cerebellum of the Adult Rat." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25(31):7150–58.
- Cowley, Michael A., James L. Smart, Marcelo Rubinstein, Marcelo G. Cerdán, Sabrina Diano, Tamas L. Horvath, Roger D. Cone, and Malcolm J. Low. 2001. "Leptin Activates Anorexigenic POMC Neurons through a Neural Network in the Arcuate Nucleus." *Nature* 411(6836):480–84.
- Cragg, B. 1979. "Brain Extracellular Space Fixed for Electron Microscopy." *Neuroscience Letters* 15(2–3):301–6.
- Crespo, Carmen Sobrino, Aránzazu Perianes Cachero, Lilian Puebla Jiménez, Vicente Barrios, and Eduardo Arilla Ferreiro. 2014. "Peptides and Food Intake." *Frontiers in Endocrinology* 5(APR):58.
- Cummings, David E., and Joost Overduin. 2007. "Gastrointestinal Regulation of Food Intake." *The Journal of Clinical Investigation* 117(1):13–23.
- Cummings, David E., Jonathan Q. Purnell, R. Scott Frayo, Karin Schmidova, Brent E. Wisse, and David S. Weigle. 2001. "A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans." *Diabetes* 50(8):1714–19.
- Dagogo-Jack, Samuel. 2001. "Human Leptin Regulation and Promise in Pharmacotherapy." *Current Drug Targets* 2(2):181–95.
- Date, Y., M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M. S. Mondal, T. Suganuma, S.

- Matsukura, K. Kangawa, and M. Nakazato. 2000. "Ghrelin, a Novel Growth Hormone-Releasing Acylated Peptide, Is Synthesized in a Distinct Endocrine Cell Type in the Gastrointestinal Tracts of Rats and Humans." *Endocrinology* 141(11):4255–61.
- Dawson, Ralph, Mary Ann Pelleymounter, William J. Millard, Steve Liu, and Baerbel Eppler. 1997. "Attenuation of Leptin-Mediated Effects by Monosodium Glutamate-Induced Arcuate Nucleus Damage." *The American Journal of Physiology* 273(1 Pt 1).
- Deepa, Sarama Sathyaseelan, Daniela Carulli, Clare Galtrey, Kate Rhodes, Junko Fukuda, Tadahisa Mikami, Kazuyuki Sugahara, and James W. Fawcett. 2006. "Composition of Perineuronal Net Extracellular Matrix in Rat Brain: A Different Disaccharide Composition for the Net-Associated Proteoglycans." *The Journal of Biological Chemistry* 281(26):17789–800.
- Delhanty, Patric J. D., Sebastian J. Neggers, and Aart J. Van Der Lely. 2014. "Should We Consider Des-Acyl Ghrelin as a Separate Hormone and If so, What Does It Do?" *Frontiers of Hormone Research* 42:163–74.
- Dempsey, Edward W. 1973. "Neural and Vascular Ultrastructure of the Area Postrema in the Rat." *The Journal of Comparative Neurology* 150(2):177–99.
- Denver, Robert J., Ronald M. Bonett, and Graham C. Boorse. 2011. "Evolution of Leptin Structure and Function." *Neuroendocrinology* 94(1):21–38.
- Doege, K. J., M. Sasaki, T. Kimura, and Y. Yamada. 1991. "Complete Coding Sequence and Deduced Primary Structure of the Human Cartilage Large Aggregating Proteoglycan, Aggrecan. Human-Specific Repeats, and Additional Alternatively Spliced Forms." *Journal of Biological Chemistry* 266(2):894–902.
- Domowicz, Miriam, Hao Li, Ann Hennig, Judith Henry, Barbara M. Vertel, and Nancy B. Schwartz. 1995. "The Biochemically and Immunologically Distinct CSPG of Notochord Is a Product of the Aggrecan Gene." *Developmental Biology* 171(2):655–64.
- Domowicz, Miriam S., Melissa M. Mueller, Todd E. Novak, Lauren E. Schwartz, and Nancy B. Schwartz. 2003. "Developmental Expression of the HNK-1 Carbohydrate Epitope on Aggrecan during Chondrogenesis." *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 226(1):42–50.
- Dumoulin, ValÉrie, Taoufiq Dakka, Pascale Plaisancie, Jean Alain Chayvialle, and Jean Claude Cuber. 1995. "Regulation of Glucagon-like Peptide-1-(7-36) Amide, Peptide YY, and Neurotensin Secretion by Neurotransmitters and Gut Hormones in the Isolated Vascularly Perfused Rat Ileum." *Endocrinology* 136(11):5182–88.
- Duquenne, Manon, Cintia Folgueira, Cyril Bourouh, Marion Millet, Anisia Silva, Jérôme Clasadonte, Monica Imbernon, Daniela Fernandois, Ines Martinez-Corral, Soumya Kusumakshi, Emilie Caron, S. Rasika, Eleonora Deliglia, Nathalie Jouy, Asturo Oishi, Massimiliano Mazzone, Eric Trinquet, Jan Tavernier, Young Bum Kim, Stéphane Ory, Ralf Jockers, Markus Schwaninger, Ulrich Boehm, Ruben Nogueiras, Jean Sébastien Annicotte, Stéphane Gasman, Julie Dam, and Vincent Prévot. 2021. "Leptin Brain Entry via a Tanycytic LepR-EGFR Shuttle Controls Lipid Metabolism and Pancreas Function." *Nature Metabolism* 3(8):1071–90.
- Dyck, Scott M., and Soheila Karimi-Abdolrezaee. 2015. "Chondroitin Sulfate

- Proteoglycans: Key Modulators in the Developing and Pathologic Central Nervous System." *Experimental Neurology* 269:169–87.
- Elias, Carol F., Charlotte Lee, Joseph Kelly, Carl Aschkenasi, Rexford S. Ahima, Pastor R. Couceyro, Michael J. Kuhar, Clifford B. Saper, and Joel K. Elmquist. 1998. "Leptin Activates Hypothalamic CART Neurons Projecting to the Spinal Cord." *Neuron* 21(6):1375–85.
- Elliott, R. M., L. M. Morgan, J. A. Tredger, S. Deacon, J. Wright, and V. Marks. 1993. "Glucagon-like Peptide-1 (7-36)Amide and Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Secretion in Response to Nutrient Ingestion in Man: Acute Post-Prandial and 24-h Secretion Patterns." *The Journal of Endocrinology* 138(1):159–66.
- Elmquist, Joel K., Carol F. Elias, and Clifford B. Saper. 1999. "From Lesions to Leptin: Hypothalamic Control of Food Intake and Body Weight." *Neuron* 22(2):221–32.
- Epstein, A. N., and P. Teitelbaum. 1967. "Specific Loss of the Hypoglycemic Control of Feeding in Recovered Lateral Rats." *The American Journal of Physiology* 213(5):1159–67.
- Faulconbridge, Lucy F., David E. Cummings, Joel M. Kaplan, and Harvey J. Grill. 2003. "Hyperphagic Effects of Brainstem Ghrelin Administration." *Diabetes* 52(9):2260–65.
- Fawcett, James W., Toshitaka Oohashi, and Tommaso Pizzorusso. 2019. "The Roles of Perineuronal Nets and the Perinodal Extracellular Matrix in Neuronal Function." *Nature Reviews. Neuroscience* 20(8):451–65.
- Figlewicz, Dianne P. 2003. "Adiposity Signals and Food Reward: Expanding the CNS Roles of Insulin and Leptin." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 284(4).
- Fischer, S., M. Wobben, H. H. Marti, D. Renz, and W. Schaper. 2002. "Hypoxia-Induced Hyperpermeability in Brain Microvessel Endothelial Cells Involves VEGF-Mediated Changes in the Expression of Zonula Occludens-1." *Microvascular Research* 63(1):70–80.
- Flannery, C. R., M. W. Lark, and J. D. Sandy. 1992. "Identification of a Stromelysin Cleavage Site within the Interglobular Domain of Human Aggrecan. Evidence for Proteolysis at This Site in Vivo in Human Articular Cartilage." *Journal of Biological Chemistry* 267(2):1008–14.
- Fosang, A. J., and T. E. Hardingham. 1989. "Isolation of the N-Terminal Globular Protein Domains from Cartilage Proteoglycans. Identification of G2 Domain and Its Lack of Interaction with Hyaluronate and Link Protein." *The Biochemical Journal* 261(3):801–9.
- Fosang, A. J., K. Last, V. Knauper, P. J. Neame, G. Murphy, T. E. Hardingham, H. Tschesche, and J. A. Hamilton. 1993. "Fibroblast and Neutrophil Collagenases Cleave at Two Sites in the Cartilage Aggrecan Interglobular Domain." *Biochemical Journal* 295(Pt 1):273.
- Fosang, Amanda J., Fraser M. Rogerson, Charlotte J. East, and Heather Stanton. 2008. "ADAMTS-5: The Story so Far." *European Cells & Materials* 15:11–26.
- Foster, Michelle T., C. Kay Song, and Timothy J. Bartness. 2010. "Hypothalamic

Paraventricular Nucleus Lesion Involvement in the Sympathetic Control of Lipid Mobilization." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 18(4):682–89.

- Fraile, Julia M., Soumya Palliyil, Caroline Barelle, Andrew J. Porter, and Marina Kovaleva. 2021. "Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH) - A Review of a Crowded Clinical Landscape, Driven by a Complex Disease." *Drug Design, Development and Therapy* 15:3997–4009.
- Frederich, Robert C., Andreas Hamann, Stephen Anderson, Bettina Löllmann, Bradford B. Lowell, and Jeffrey S. Flier. 1995. "Leptin Levels Reflect Body Lipid Content in Mice: Evidence for Diet-Induced Resistance to Leptin Action." *Nature Medicine* 1(12):1311–14.
- Fry, Mark, and Alastair V. Ferguson. 2007. "The Sensory Circumventricular Organs : Brain Targets for Circulating Signals Controlling Ingestive Behavior." *Physiology & Behavior* 91(4):413–23.
- Galtrey, Clare M., and James W. Fawcett. 2007. "The Role of Chondroitin Sulfate Proteoglycans in Regeneration and Plasticity in the Central Nervous System." *Brain Research Reviews* 54(1):1–18.
- Garfield, Alastair S., Christa Patterson, Susanne Skora, Fiona M. Gribble, Frank Reimann, Mark L. Evans, Martin G. Myers, and Lora K. Heisler. 2012. "Neurochemical Characterization of Body Weight-Regulating Leptin Receptor Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract." *Endocrinology* 153(10):4600.
- Gasche, Yvan, Paola Marina Soccia, Michiko Kanemitsu, and Jean Christophe Copin. 2006. "Matrix Metalloproteinases and Diseases of the Central Nervous System with a Special Emphasis on Ischemic Brain." *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 11(2 P.1199-1590):1289–1301.
- Giamanco, K. A., M. Morawski, and R. T. Matthews. 2010. "Perineuronal Net Formation and Structure in Aggrecan Knockout Mice." *Neuroscience* 170(4):1314–27.
- Gibbons, Catherine, Graham Finlayson, Phillipa Caudwell, Dominic Luc Webb, Per M. Hellström, Erik Näslund, and John E. Blundell. 2016. "Postprandial Profiles of CCK after High Fat and High Carbohydrate Meals and the Relationship to Satiety in Humans." *Peptides* 77:3–8.
- Gibbs, James, Robert C. Young, and Gerard P. Smith. 1973. "Cholecystokinin Decreases Food Intake in Rats." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 84(3):488–95.
- Glenn Stanley, B., Stavroula E. Kyrkouli, Sharon Lampert, and Sarah F. Leibowitz. 1986. "Neuropeptide Y Chronically Injected into the Hypothalamus: A Powerful Neurochemical Inducer of Hyperphagia and Obesity." *Peptides* 7(6):1189–92.
- Glowa, John R., James E. Barrett, Jonetta Russell, and Phil W. Gold. 1992. "Effects of Corticotropin Releasing Hormone on Appetitive Behaviors." *Peptides* 13(3):609–21.
- Green, J. D., and G. W. Harris. 1947. "The Neurovascular Link between the Neurohypophysis and Adenohypophysis." *The Journal of Endocrinology* 5(3):136–46.
- Grill, H. J., and J. M. Kaplan. 1992. "Sham Feeding in Intact and Chronic Decerebrate Rats." *The American Journal of Physiology* 262(6 Pt 2).

- Grill, Harvey J., and Ralph Norgren. 1978. "Chronically Decerebrate Rats Demonstrate Satiation But Not Bait Shyness." *Science* 201(4352):267–69.
- Grill, Harvey J., Michael W. Schwartz, Joel M. Kaplan, James S. Foxhall, John Breininger, and Denis G. Baskin. 2002. "Evidence That the Caudal Brainstem Is a Target for the Inhibitory Effect of Leptin on Food Intake." *Endocrinology* 143(1):239–46.
- Gross, P. M., and A. Weindl. 1987. "Peering through the Windows of the Brain." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 7(6):663–72.
- Guerra, Maria M., César González, Teresa Caprile, Maryoris Jara, Karin Vío, Rosa I. Muñoz, Sara Rodríguez, and Esteban M. Rodríguez. 2015. "Understanding How the Subcommissural Organ and Other Periventricular Secretory Structures Contribute via the Cerebrospinal Fluid to Neurogenesis." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9(DEC):480.
- Gutierrez, Jesus A., Patricia J. Solenberg, Douglas R. Perkins, Jill A. Willency, Michael D. Knierman, Zhaoyan Jin, Derrick R. Witcher, Shuang Luo, Jude E. Onyia, and John E. Hale. 2008. "Ghrelin Octanoylation Mediated by an Orphan Lipid Transferase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(17):6320–25.
- Hahn, Tina M., John F. Breininger, Denis G. Baskin, and Michael W. Schwartz. 1998. "Coexpression of Agrp and NPY in Fasting-Activated Hypothalamic Neurons." *Nature Neuroscience* 1(4):271–72.
- Halaas, Jeffrey L., Ketan S. Gajiwala, Margherita Maffei, Steven L. Cohen, Brian T. Chait, Daniel Rabinowitz, Roger L. Lallone, Stephen K. Burley, and Jeffrey M. Friedman. 1995. "Weight-Reducing Effects of the Plasma Protein Encoded by the Obese Gene." *Science (New York, N. Y.)* 269(5223):543–46.
- Hardingham, T. E., and A. J. Fosang. 1995. "The Structure of Aggrecan and Its Turnover in Cartilage." *Journal of Rheumatology* 22(SUPPL. 43):86–90.
- Hardingham, T. E., A. J. Fosang, and J. Dudhia. 1994. "The Structure, Function and Turnover of Aggrecan, the Large Aggregating Proteoglycan from Cartilage." *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry: Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 32(4):249–57.
- Hashimoto, Gakuji, Takanori Aoki, Hiroyuki Nakamura, Kazuhiko Tanzawa, and Yasunori Okada. 2001. "Inhibition of ADAMTS4 (Aggrecanase-1) by Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4)." *FEBS Letters* 494(3):192–95.
- Havel, P. J., S. Kasim-Karakas, W. Mueller, P. R. Johnson, R. L. Gingerich, and J. S. Stern. 1996. "Relationship of Plasma Leptin to Plasma Insulin and Adiposity in Normal Weight and Overweight Women: Effects of Dietary Fat Content and Sustained Weight Loss." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81(12):4406–13.
- Havrankova, Jana, Jesse Roth, and Michael Brownstein. 1978. "Insulin Receptors Are Widely Distributed in the Central Nervous System of the Rat." *Nature* 1978 272:5656 272(5656):827–29.
- Hawkins, Brian T., and Thomas P. Davis. 2005. "The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease." *Pharmacological Reviews* 57(2):173–85.

- Henry, Fredrick E., Ken Sugino, Adam Tozer, Tiago Branco, and Scott M. Sternson. 2015. "Cell Type-Specific Transcriptomics of Hypothalamic Energy-Sensing Neuron Responses to Weight-Loss." *ELife* 4(September 2015).
- Herrera, Daniel G., and Harold A. Robertson. 1996. "Activation of C-Fos in the Brain." *Progress in Neurobiology* 50(2–3):83–107.
- Hetherington, A. W. 1944. "Non-Production of Hypothalamic Obesity in the Rat by Lesions Rostral or Dorsal to the Ventro-Medial Hypothalamic Nuclei." *Journal of Comparative Neurology* 80(1):33–45.
- Hetherington, A. W., and S. W. Ranson. 1940. "Hypothalamic Lesions and Adiposity in the Rat." *The Anatomical Record* 78(2):149–72.
- Hirosue, Y., A. Inui, A. Teranishi, M. Miura, M. Nakajima, M. Okita, Y. Nakajima, N. Himori, S. Baba, and M. Kasuga. 1993. "Cholecystokinin Octapeptide Analogues Suppress Food Intake via Central CCK-A Receptors in Mice." *The American Journal of Physiology* 265(3 Pt 2).
- Holst, Birgitte, and Thue W. Schwartz. 2004. *Constitutive Ghrelin Receptor Activity as a Signaling Set-Point in Appetite Regulation*.
- Horii-Hayashi, Noriko, Takayo Sasagawa, Wataru Matsunaga, and Mayumi Nishi. 2015. "Development and Structural Variety of the Chondroitin Sulfate Proteoglycans-Contained Extracellular Matrix in the Mouse Brain." *Neural Plasticity* 2015.
- Horii-Hayashi, Noriko, Takayo Sasagawa, and Mayumi Nishi. 2017. "Insights from Extracellular Matrix Studies in the Hypothalamus: Structural Variations of Perineuronal Nets and Discovering a New Perifornical Area of the Anterior Hypothalamus." *Anatomical Science International* 92(1):18–24.
- Hosoi, Toru, Toru Kawagishi, Yasunobu Okuma, Jun Tanaka, and Yasuyuki Nomura. 2002. "Brain Stem Is a Direct Target for Leptin's Action in the Central Nervous System." *Endocrinology* 143(9):3498–3504.
- Huber, Jason D., Richard D. Egleton, and Thomas P. Davis. 2001. "Molecular Physiology and Pathophysiology of Tight Junctions in the Blood-Brain Barrier." *Trends in Neurosciences* 24(12):719–25.
- Hughes, C. E., B. Caterson, A. J. Fosang, P. J. Roughley, and J. S. Mort. 1995. "Monoclonal Antibodies That Specifically Recognize Neopeptide Sequences Generated by 'aggrecanase' and Matrix Metalloproteinase Cleavage of Aggrecan: Application to Catabolism in Situ and in Vitro." *Biochemical Journal* 305(3):799–804.
- Hylin, Michael J., Sara A. Orsi, Anthony N. Moore, and Pramod K. Dash. 2013. "Disruption of the Perineuronal Net in the Hippocampus or Medial Prefrontal Cortex Impairs Fear Conditioning." *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 20(5):267–73.
- Ilic, Mirna Z., Christopher J. Handley, H. Clem Robinson, and Meng Tuck Mok. 1992. "Mechanism of Catabolism of Aggrecan by Articular Cartilage." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 294(1):115–22.
- Jakovljević, Ana, Milena Tucić, Michaela Blažiková, Andrej Korenić, Yannis Missirlis, Vera Stamenković, and Pavle Andjus. 2021. "Structural and Functional Modulation of Perineuronal Nets: In Search of Important Players with Highlight on Tenascins."

Cells 10(6).

- Jiang, Hong, Sarah Gallet, Paul Klemm, Pia Scholl, Kat Folz-Donahue, Janine Altmüller, Jens Alber, Christian Heilinger, Christian Kukat, Anne Loyens, Helge Müller-Fielitz, Sivaraj Sundaram, Markus Schwaninger, Vincent Prevot, and Jens C. Brüning. 2020. "MCH Neurons Regulate Permeability of the Median Eminence Barrier." *Neuron* 107(2):306.
- Joly, Jean Stéphane, Joana Osório, Alessandro Alunni, Hélène Auger, Shungo Kano, and Sylvie Rétaux. 2007. "Windows of the Brain: Towards a Developmental Biology of Circumventricular and Other Neurohemal Organs." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18(4):512–24.
- Kamegai, Jun, Hideki Tamura, Takako Shimizu, Shinya Ishii, Hitoshi Sugihara, and Ichiji Wakabayashi. 2001. "Chronic Central Infusion of Ghrelin Increases Hypothalamic Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein mRNA Levels and Body Weight in Rats." *Diabetes* 50(11):2438–43.
- Kartasova, Tonja, Nadine Darwiche, Yohko Kohno, Hiroko Koizumi, Shin Ichi Osada, Nam Ho Huh, Ulrike Lichti, Peter M. Steinert, and Toshio Kuroki. 1996. "Sequence and Expression Patterns of Mouse SPR1: Correlation of Expression with Epithelial Function." *Journal of Investigative Dermatology* 106(2):294–304.
- Kashiwagi, Masahide, Micky Tortorella, Hideaki Nagase, and Keith Brew. 2001. "TIMP-3 Is a Potent Inhibitor of Aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and Aggrecanase 2 (ADAM-TS5)." *The Journal of Biological Chemistry* 276(16):12501–4.
- Keeseey, Richard E., and Terry L. Powley. 2008. "Body Energy Homeostasis." *Appetite* 51(3):442.
- Keim, Nancy L., Judith S. Stern, and Peter J. Havel. 1998. "Relation between Circulating Leptin Concentrations and Appetite during a Prolonged, Moderate Energy Deficit in Women." *The American Journal of Clinical Nutrition* 68(4):794–801.
- Kennedy, G. C. 1950. "The Hypothalamic Control of Food Intake in Rats." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 137(889):535–49.
- Kennedy, G. C. 1953. "The Role of Depot Fat in the Hypothalamic Control of Food Intake in the Rat." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 140(901):578–96.
- Kiani, Chris, Liwen Chen, Yao Jiong Wu, Albert J. Yee, and Burton B. Yang. 2002. *Structure and Function of Aggrecan*. Vol. 12.
- King, Bruce M., Cari A. Zansler, Robert E. Michel, Theresa Kelly, and Lawrence A. Frohman. 1989. "Comparison of Radio-Frequency and Electrolytic Lesions of the Paraventricular Hypothalamic Nucleus." *Physiology & Behavior* 46(2):321–25.
- Kleiber, Max. 1932. "Body Size and Metabolism." *Hilgardia* 6(11):315–53.
- Koch, Christopher D., Chan Mi Lee, and Suneel S. Apte. 2020. "Aggrecan in Cardiovascular Development and Disease." *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 68(11):777–95.
- Koda, Shuichi, Yukari Date, Noboru Murakami, Takuya Shimbara, Takeshi Hanada, Koji Toshinai, Akira Niijima, Mayumi Furuya, Norio Inomata, Kazuhiro Osuye, and

- Masamitsu Nakazato. 2005. "The Role of the Vagal Nerve in Peripheral PYY3-36-Induced Feeding Reduction in Rats." *Endocrinology* 146(5):2369–75.
- Kohnke, Sara, Sophie Buller, Danae Nuzzaci, Katherine Ridley, Brian Lam, Helena Pivonkova, Marie A. Bentsen, Kimberly M. Alonge, Chao Zhao, John Tadross, Staffan Holmqvist, Takahiro Shimizo, Hannah Hathaway, Huiliang Li, Wendy Macklin, Michael W. Schwartz, William D. Richardson, Giles S. H. Yeo, Robin J. M. Franklin, Ragnhildur T. Karadottir, David H. Rowitch, and Clemence Blouet. 2021. "Nutritional Regulation of Oligodendrocyte Differentiation Regulates Perineuronal Net Remodeling in the Median Eminence." *Cell Reports* 36(2).
- Kohnke, Sara, Brian Lam, Sophie Buller, Chao Zhao, Danae Nuzzaci, John Tadross, Staffan Holmqvist, Katherine Ridley, Hannah Hathaway, Wendy Macklin, Giles Sh Yeo, Robin Jm Franklin, David H. Rowitch, and Clemence Blouet. n.d. "Nutritional Signals Rapidly Activate Oligodendrocyte Differentiation in the Adult Hypothalamic Median Eminence."
- Kohno, Daisuke, Hong Zhi Gao, Shinji Muroya, Sakae Kikuyama, and Toshihiko Yada. 2003. "Ghrelin Directly Interacts With Neuropeptide-Y-Containing Neurons in the Rat Arcuate Nucleus Ca²⁺ Signaling via Protein Kinase A and N-Type Channel-Dependent Mechanisms and Cross-Talk With Leptin and Orexin." *Diabetes* 52(4):948–56.
- Kojima, Masayasu, Hiroshi Hosoda, Yukari Date, Masamitsu Nakazato, Hisayuki Matsuo, and Kenji Kangawa. 1999. "Ghrelin Is a Growth-Hormone-Releasing Acylated Peptide from Stomach." *Nature* 402(6762):656–60.
- Kow, Lee Ming, and D. W. Pfaff. 1991. "The Effects of the TRH Metabolite Cyclo(His-Pro) and Its Analogs on Feeding." *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 38(2):359–64.
- Krisch, B., H. Leonhardt, and W. Buchheim. 1978. "The Functional and Structural Border between the CSF- and Blood-Milieu in the Circumventricular Organs (Organum Vasculosum Laminae Terminalis, Subfornical Organ, Area Postrema) of the Rat." *Cell and Tissue Research* 195(3):485–97.
- Krueger, Richard C., Kiyoto Kurima, and Nancy B. Schwartz. 1999. "Completion of the Mouse Aggrecan Gene Structure and Identification of the Defect in the Cmd-Bc Mouse as a near Complete Deletion of the Murine Aggrecan Gene." *Mammalian Genome : Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 10(12):1119–25.
- Kwok, Jessica C. F., Daniela Carulli, and James W. Fawcett. 2010. "In Vitro Modeling of Perineuronal Nets: Hyaluronan Synthase and Link Protein Are Necessary for Their Formation and Integrity." *Journal of Neurochemistry* 114(5):1447–59.
- Kwok, Jessica C. F., Gunnar Dick, Difei Wang, and James W. Fawcett. 2011. "Extracellular Matrix and Perineuronal Nets in CNS Repair." *Developmental Neurobiology* 71(11):1073–89.
- Langlet, Fanny, Amandine Mullier, Sebastien G. Bouret, Vincent Prevot, and Benedicte Dehouck. 2013. "Tanycyte-like Cells Form a Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier in the Circumventricular Organs of the Mouse Brain." *The Journal of Comparative Neurology* 521(15):3389–3405.
- Lark, Michael W., Ellen K. Bayne, Jamie Flanagan, Coral F. Harper, Lori A. Hoerrner,

- Nancy I. Hutchinson, Irwin I. Singer, Susan A. Donatelli, Jeffrey R. Weidner, Hollis R. Williams, Richard A. Mumford, and L. Stefan Lohmander. 1997. "Aggrecan Degradation in Human Cartilage Aggrecan Degradation in Human Cartilage Evidence for Both Matrix Metalloproteinase and Aggrecanase Activity in Normal, Osteoarthritic, and Rheumatoid Joints." *J. Clin. Invest* 100(1):93–106.
- Larue-Achagiotis, Christiane, and Jacques Le Magnen. 1979. "The Different Effects of Continuous Night and Day-Time Insulin Infusion on the Meal Pattern of Normal Rats: Comparison with the Meal Pattern of Hyperphagic Hypothalamic Rats." *Physiology & Behavior* 22(3):435–39.
- Lau, Lorraine W., Rowena Cua, Michael B. Keough, Sarah Haylock-Jacobs, and V. Wee Yong. 2013. "Pathophysiology of the Brain Extracellular Matrix: A New Target for Remyelination." *Nature Reviews. Neuroscience* 14(10):722–29.
- Lewis, Simon A., P. Traub, and Christian M. Spilker. 2003. "The N-Terminal Domain of Vimentin Alters Bladder Permeability." *The Journal of Urology* 170(5):2091–94.
- Li, Zheng, Xin Yu, Jinqian Liang, William Ka Kei Wu, Jun Yu, and Jianxiong Shen. 2014. "Leptin Downregulates Aggrecan through the P38-ADAMST Pathway in Human Nucleus Pulposus Cells." *PLOS ONE* 9(10):e109595.
- Li, Ziru, Michael Mulholland, and Weizhen Zhang. 2016. "Ghrelin O-Acyltransferase (GOAT) and Energy Metabolism." *Science China Life Sciences* 2016 59:3 59(3):281–91.
- Likuski, H. J., A. F. Debons, and R. J. Cloutier. 1967. "Inhibition of Gold Thioglucose-Induced Hypothalamic Obesity by Glucose Analogues." *The American Journal of Physiology* 212(3):669–76.
- Lim, Daniel A., Yin Cheng Huang, and Arturo Alvarez-Buylla. 2007. "The Adult Neural Stem Cell Niche: Lessons for Future Neural Cell Replacement Strategies." *Neurosurgery Clinics of North America* 18(1):81–92.
- liu, Jie, Lie Cao, Xueming Gao, Zhixin Chen, Shifang Guo, Zongru He, Yaowen Qian, Yongzhi Yu, and Gang Wang. 2018. "Ghrelin Prevents Articular Cartilage Matrix Destruction in Human Chondrocytes." *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 98:651–55.
- Liu, Tiegang, Maher M. Ghamloush, Ali Aldawood, Rod Warburton, Deniz Toksoz, Nicholas S. Hill, Dale D. Tang, and Usamah S. Kayyali. 2014. "Modulating Endothelial Barrier Function by Targeting Vimentin Phosphorylation." *Journal of Cellular Physiology* 229(10):1484–93.
- Louis-Sylvestre, J., and J. Le Magnen. 1980. "A Fall in Blood Glucose Level Precedes Meal Onset in Free-Feeding Rats." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 4(SUPPL. 1):13–15.
- Luquet, Serge, Colin T. Phillips, and Richard D. Palmiter. 2007. "NPY/AgRP Neurons Are Not Essential for Feeding Responses to Glucoprivation." *Peptides* 28(2):214–25.
- MacKay, Eaton M., James W. Callaway, and Richard H. Barnes. 1940. "Hyperalimantation in Normal Animals Produced by Protamine Insulin Three Figures." *The Journal of Nutrition* 20(1):59–66.
- Marco, Asaf, Mariana Schroeder, and Aron Weller. 2009. "Microstructural Pattern of

- Palatable Food Intake From Weaning to Adulthood in Male and Female OLETF Rats." *Behavioral Neuroscience* 123(6):1251–60.
- Mark, Karen S., and Thomas P. Davis. 2002. "Cerebral Microvascular Changes in Permeability and Tight Junctions Induced by Hypoxia-Reoxygenation." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 282(4).
- Martinez, Joe L., and Leonard Koda. 1988. "Penetration of Fluorescein into the Brain: A Sex Difference." *Brain Research* 450(1–2):81–85.
- Martins, Luís, Diana Fernández-Mallo, Marta G. Novelle, María J. Vázquez, Manuel Tena-Sempere, Rubén Nogueiras, Miguel López, and Carlos Diéguez. 2012. "Hypothalamic MTOR Signaling Mediates the Orexigenic Action of Ghrelin." *PLoS ONE* 7(10):46923.
- Marty, Nell, Michel Dallaporta, and Bernard Thorens. 2007. "Brain Glucose Sensing, Counterregulation, and Energy Homeostasis." *Physiology (Bethesda, Md.)* 22(4):241–51.
- Masuzaki, Hiroaki, Yoshihiro Ogawa, Naohi Isse, Noriko Satoh, Taku Okazaki, Michika Shigemoto, Kiyoshi Mori, Naohisa Tamura, Kiminori Hosoda, Yasunao Yoshimasa, Hisato Jingami, Teruo Kawada, and Kazuwa Nakao. 1995. "Human Obese Gene Expression. Adipocyte-Specific Expression and Regional Differences in the Adipose Tissue." *Diabetes* 44(7):855–58.
- Matthews, Russell T., Gail M. Kelly, Cynthia A. Zerillo, Grace Gray, Michael Tiemeyer, and Susan Hockfield. 2002. "Aggrecan Glycoforms Contribute to the Molecular Heterogeneity of Perineuronal Nets." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22(17):7536–47.
- Mayer, C. H., H. Fink, A. Rex, and J. P. Voigt. 2006. "Changes in Extracellular Hypothalamic Glucose in Relation to Feeding." *The European Journal of Neuroscience* 24(6):1695–1701.
- Mayer, Jean. 1953. "Glucostatic Mechanism of Regulation of Food Intake." *The New England Journal of Medicine* 249(1):13–16.
- McKeown, Paula J., and Paul F. Goetinck. 1979. "A Comparison of the Proteoglycans Synthesized in Meckel's and Sternal Cartilage from Normal and Nanomelic Chick Embryos." *Developmental Biology* 71(2):203–15.
- Mercer, Julian G., Kim M. Moar, Patricia A. Findlay, Nigel Hoggard, and Clare L. Adam. 1998. "Association of Leptin Receptor (OB-Rb), NPY and GLP-1 Gene Expression in the Ovine and Murine Brainstem." *Regulatory Peptides* 75–76:271–78.
- Miller, Alan D., and Ronald A. Leslie. 1994. "The Area Postrema and Vomiting." *Frontiers in Neuroendocrinology* 15(4):301–20.
- Mirzadeh, Zaman, Kimberly M. Alonge, Elaine Cabrales, Vicente Herranz-Pérez, Jarrad M. Scarlett, Jenny M. Brown, Rim Hassouna, Miles E. Matsen, Hong T. Nguyen, Jose Manuel Garcia-Verdugo, Lori M. Zeltser, and Michael W. Schwartz. 2019. "Perineuronal Net Formation during the Critical Period for Neuronal Maturation in the Hypothalamic Arcuate Nucleus." *Nature Metabolism* 1(2):212–21.
- Mizuno, Yuji, and Yutaka Oomura. 1984. "Glucose Responding Neurons in the Nucleus Tractus Solitarius of the Rat: In Vitro Study." *Brain Research* 307(1–2):109–16.

- MK, Nguyen, and Kurtz I. 2006. "Physiologic Interrelationships between Gibbs-Donnan Equilibrium, Osmolality of Body Fluid Compartments, and Plasma Water Sodium Concentration." *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*.
- Moran, T. H., P. J. Ameglio, G. J. Schwartz, and P. R. McHugh. 1992. "Blockade of Type A, Not Type B, CCK Receptors Attenuates Satiety Actions of Exogenous and Endogenous CCK." *The American Journal of Physiology* 262(1 Pt 2).
- Moran, Timothy H., Anne R. Baldessarini, Cynthia F. Salorio, Terese Lowery, and Gary J. Schwartz. 1997. "Vagal Afferent and Efferent Contributions to the Inhibition of Food Intake by Cholecystokinin." *The American Journal of Physiology* 272(4 Pt 2).
- Morawski, M., G. Brückner, T. Arendt, and R. T. Matthews. 2012. "Aggrecan: Beyond Cartilage and into the Brain." *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 44(5):690–93.
- Morita, Shoko, and Seiji Miyata. 2012. "Different Vascular Permeability between the Sensory and Secretory Circumventricular Organs of Adult Mouse Brain." *Cell and Tissue Research* 349(2):589–603.
- Morita, Shoko, and Seiji Miyata. 2013. "Accessibility of Low-Molecular-Mass Molecules to the Median Eminence and Arcuate Hypothalamic Nucleus of Adult Mouse." *Cell Biochemistry and Function* 31(8):668–77.
- Morton, G. J., D. E. Cummings, D. G. Baskin, G. S. Barsh, and M. W. Schwartz. 2006. "Central Nervous System Control of Food Intake and Body Weight."
- Mullier, Amandine, Sebastien G. Bouret, Vincent Prevot, and Bénédicte Dehouck. 2010. "Differential Distribution of Tight Junction Proteins Suggests a Role for Tanycytes in Blood-Hypothalamus Barrier Regulation in the Adult Mouse Brain." *Journal of Comparative Neurology*.
- Myers, Martin G., Michael A. Cowley, and Heike Münzberg. 2008. "Mechanisms of Leptin Action and Leptin Resistance." *Annual Review of Physiology* 70:537–56.
- Nagase, Hideaki, Robert Visse, and Gillian Murphy. 2006. "Structure and Function of Matrix Metalloproteinases and TIMPs." *Cardiovascular Research* 69(3):562–73.
- Nakazato, Masamitsu, Noboru Murakami, Yukari Date, Masayasu Kojima, Hisayuki Matsuo, Kenji Kangawa, and Shigeru Matsukura. 2001. "A Role for Ghrelin in the Central Regulation of Feeding." *Nature* 409(6817):194–98.
- Natah, S. S., A. Mouihate, Q. J. Pittman, and Keith A. Sharkey. 2005. "Disruption of the Blood–Brain Barrier during TNBS Colitis." *Neurogastroenterology & Motility* 17(3):433–46.
- Nicholson, Charles, and Eva Syková. 1998. "Extracellular Space Structure Revealed by Diffusion Analysis." *Trends in Neurosciences* 21(5):207–15.
- Nicolaidis, S., and N. Rowland. 1976. "Metering of Intravenous versus Oral Nutrients and Regulation of Energy Balance." *The American Journal of Physiology* 231(3):661–68.
- Nimer, Emad, Rosa Schneiderman, and Alice Maroudas. 2003. "Diffusion and Partition of Solutes in Cartilage under Static Load." *Biophysical Chemistry* 106(2):125–46.
- Ollmann, Michael M., Brent D. Wilson, Ying Kui Yang, Julie A. Kerns, Yanru Chen, Ira

- Gantz, and Gregory S. Barsh. 1997. "Antagonism of Central Melanocortin Receptors in Vitro and in Vivo by Agouti-Related Protein." *Science (New York, N. Y.)* 278(5335):135–38.
- Oohashi, Toshitaka, Midori Edamatsu, Yoko Bekku, and Daniela Carulli. 2015. *The Hyaluronan and Proteoglycan Link Proteins: Organizers of the Brain Extracellular Matrix and Key Molecules for Neuronal Function and Plasticity*. Vol. 274. Academic Press Inc.
- Paxinos, G., and K. B. J. Franklin. 2001. "The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd Edition." *Academic Press*. Retrieved October 13, 2022 ([https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjct55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2090083](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjct55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=2090083)).
- Pelleymounter, Mary Ann, Mary Jane Cullen, Mary Beth Baker, Randy Hecht, Dwight Winters, Thomas Boone, and Frank Collins. 1995. "Effects of the Obese Gene Product on Body Weight Regulation in Ob/Ob Mice." *Science (New York, N. Y.)* 269(5223):540–43.
- Petrov, Theodor, Andrew G. Howarth, Teresa L. Krukoff, and Bruce R. Stevenson. 1994. "Distribution of the Tight Junction-Associated Protein ZO-1 in Circumventricular Organs of the CNS." *Brain Research. Molecular Brain Research* 21(3–4):235–46.
- Phillips, Robert J., and Terry L. Powley. 1996. "Gastric Volume Rather than Nutrient Content Inhibits Food Intake." *The American Journal of Physiology* 271(3 Pt 2).
- Phillips, Robert J., and Terry L. Powley. 1998. "Gastric Volume Detection after Selective Vagotomies in Rats." *The American Journal of Physiology* 274(6).
- Pirnik, Z., Z. Majercikova, M. Holubova, R. Pirnik, B. Zelezna, L. Maletinska, and Alexander Kiss. 2014. "Effect of Ghrelin Receptor Agonist and Antagonist on the Activity of Arcuate Nucleus Tyrosine Hydroxylase Containing Neurons in C57BL/6 Male Mice Exposed to Normal or High Fat Diet." *Journal of Physiology and Pharmacology* 65(4):477–86.
- Pizzorusso, Tommaso, Paolo Medini, Nicoletta Berardi, Sabrina Chierzi, James W. Fawcett, and Lamberto Maffei. 2002. "Reactivation of Ocular Dominance Plasticity in the Adult Visual Cortex." *Science (New York, N. Y.)*.
- Pócsai, Károly, and Mihály Kálmán. 2014. "Extracellular Matrix Components Mark the Territories of Circumventricular Organs." *Neuroscience Letters* 566:36–41.
- Polonsky, K. S., B. D. Given, L. Hirsch, E. T. Shapiro, H. Tillil, C. Beebe, J. A. Galloway, B. H. Frank, T. Karrison, and E. Van Cauter. 1988. "Quantitative Study of Insulin Secretion and Clearance in Normal and Obese Subjects." *The Journal of Clinical Investigation* 81(2):435–41.
- Prevot, Vincent, Bénédicte Dehouck, Ariane Sharif, Philippe Ciofi, Paolo Giacobini, and Jerome Clasadonte. 2018. "The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism." *Endocrine Reviews* 39(3):333–68.
- Primorac, D., M. L. Stover, S. H. Clark, and D. W. Rowe. 1994. "Molecular Basis of Nanomelia, a Heritable Chondrodystrophy of Chicken." *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 14(4):297–305.
- Prinz, Robert D., Catherine M. Willis, Toin H. Van Kuppevelt, and Michael Klüppel.

2014. "Biphasic Role of Chondroitin Sulfate in Cardiac Differentiation of Embryonic Stem Cells through Inhibition of Wnt/ β -Catenin Signaling." *PLOS ONE* 9(3):e92381.
- Pyka, Martin, Christian Wetzel, Ainhara Aguado, Maren Geissler, Hanns Hatt, and Andreas Faissner. 2011. "Chondroitin Sulfate Proteoglycans Regulate Astrocyte-Dependent Synaptogenesis and Modulate Synaptic Activity in Primary Embryonic Hippocampal Neurons." *The European Journal of Neuroscience* 33(12):2187–2202.
- Qu, Ruize, Xiaomin Chen, Wenhan Wang, Cheng Qiu, Miaomiao Ban, Linlin Guo, Krasimir Vasilev, Jianying Chen, Weiwei Li, and Yunpeng Zhao. 2018. "Ghrelin Protects against Osteoarthritis through Interplay with Akt and NF-KB Signaling Pathways." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32(2):1044–58.
- Rauch, U. 2004. "Extracellular Matrix Components Associated with Remodeling Processes in Brain." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 61(16):2031–45.
- Raybould, Helen E. 2007. "Mechanisms of CCK Signaling from Gut to Brain." *Current Opinion in Pharmacology* 7(6):570–74.
- Reese, T. S., and M. J. Karnovsky. 1967. "Fine Structural Localization of a Blood-Brain Barrier to Exogenous Peroxidase." *The Journal of Cell Biology* 34(1):207–17.
- Rentsch, Juerg, Nigel Levens, and Michele Chiesi. 1995. "Recombinant Ob-Gene Product Reduces Food Intake in Fasted Mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 214(1):131–36.
- Rhodes, K. E., and J. W. Fawcett. 2004. "Chondroitin Sulphate Proteoglycans: Preventing Plasticity or Protecting the CNS?" *Journal of Anatomy* 204(1):33–48.
- Ritter, Robert C. 2004. "Gastrointestinal Mechanisms of Satiation for Food." *Physiology and Behavior* 81(2):249–73.
- Rodríguez-Cortés, Betty, Gabriela Hurtado-Alvarado, Ricardo Martínez-Gómez, Luis A. León-Mercado, Masha Prager-Khoutorsky, Ruud M. Buijs, Betty Rodriguez-Cortés, Gabriela Hurtado-Alvarado, Ricardo Martinez-Gomez, Luis A. Leon-Mercado, Masha Prager-Khoutorsky, and Ruud M. Buijs. 2022. "Suprachiasmatic Nucleus-Mediated Glucose Entry into the Arcuate Nucleus Determines the Daily Rhythm in Blood Glycemia Elsevier Enhanced Reader." *Current Biology* 32(4):796–805.
- Rodriguez, E. M. 1976. "The Cerebrospinal Fluid as a Pathway in Neuroendocrine Integration." *The Journal of Endocrinology* 71(3):407–43.
- Rodríguez, Esteban M., Juan L. Blázquez, and Montserrat Guerra. 2010. "The Design of Barriers in the Hypothalamus Allows the Median Eminence and the Arcuate Nucleus to Enjoy Private Milieus: The Former Opens to the Portal Blood and the Latter to the Cerebrospinal Fluid." *Peptides* 31(4):757–76.
- Rodriguez, Esteban M., Sara Rodriguez, and Silvia Hein. 1998. "The Sub-Commissural Organ." *Microscopy Research and Technique* 41:156–60.
- Rossi, M., M. S. Kim, D. G. A. Morgan, C. J. Small, C. M. B. Edwards, D. Sunter, S. Abusnana, A. P. Goldstone, S. H. Russell, S. A. Stanley, D. M. Smith, K. Yagaloff, M. A. Ghatei, and S. R. Bloom. 1998. "A C-Terminal Fragment of Agouti-Related Protein Increases Feeding and Antagonizes the Effect of Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone in Vivo." *Endocrinology* 139(10):4428–31.

- Roughley, Peter J., and John S. Mort. 2014. "The Role of Aggrecan in Normal and Osteoarthritic Cartilage." *Journal of Experimental Orthopaedics* 1(1):1–11.
- Rowlands, Daire, Kristian K. Lensjø, Tovy Dinh, Sujeong Yang, Melissa R. Andrews, Torkel Hafting, Marianne Fyhn, James W. Fawcett, and Gunnar Dick. 2018. "Aggrecan Directs Extracellular Matrix-Mediated Neuronal Plasticity." *Journal of Neuroscience* 38(47):10102–13.
- Sachot, C., C. Rummel, A. F. Bristow, and Giamal N. Luheshi. 2007. "The Role of the Vagus Nerve in Mediating the Long-Term Anorectic Effects of Leptin." *Journal of Neuroendocrinology* 19(4):250–61.
- Saladin, Régis, Piet De Vos, Michele Guerre-Millot, Armelle Leturque, Jean Girard, Bart Staels, and Johan Auwerx. 1995. "Transient Increase in Obese Gene Expression after Food Intake or Insulin Administration." *Nature* 377(6549):527–28.
- Sandy, J. D., P. J. Neame, R. E. Boynton, and C. R. Flannery. 1991. "Catabolism of Aggrecan in Cartilage Explants: Identification of a Major Cleavage Site within the Interglobular Domain." *Journal of Biological Chemistry* 266(14):8683–85.
- Satoh, Noriko, Yoshihiro Ogawa, Goro Katsuura, Minoru Hayase, Tetsuo Tsuji, Keiichi Imagawa, Yasunao Yoshimasa, Shigeo Nishi, Kiminori Hosoda, and Kazuwa Nakao. 1997. "The Arcuate Nucleus as a Primary Site of Satiety Effect of Leptin in Rats." *Neuroscience Letters* 224(3):149–52.
- Schaeffer, Marie, Fanny Langlet, Chrystel Lafont, François Molino, David J. Hodson, Thomas Roux, Laurent Lamarque, Pascal Verdié, Emmanuel Bourrier, Bénédicte Dehouck, Jean Louis Banéres, Jean Martinez, Pierre François Méry, Jacky Marie, Eric Trinquet, Jean Alain Fehrentz, Vincent Prévot, and Patrice Mollard. 2013. "Rapid Sensing of Circulating Ghrelin by Hypothalamic Appetite-Modifying Neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(4):1512–17.
- Schulz, Martina, and Britta Engelhardt. 2005. "The Circumventricular Organs Participate in the Immunopathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Cerebrospinal Fluid Research* 2.
- Schwartz, N. B. 1977. "Regulation of Chondroitin Sulfate Synthesis. Effect of Beta-Xylosides on Synthesis of Chondroitin Sulfate Proteoglycan, Chondroitin Sulfate Chains, and Core Protein." *Journal of Biological Chemistry* 252(18):6316–21.
- Schwartz, W. Michael, Stephen C. Woods, Daniel Porte Jr, Randy J. Seely, and Denis G. Baskin. 2000. *Model for Energy Homeostasis*.
- Seeley, R. J., G. Van Dijk, L. A. Campfield, F. J. Smith, P. Burn, J. A. Nelligan, S. M. Bell, D. G. Baskin, S. C. Woods, and M. W. Schwartz. 1996. "Intraventricular Leptin Reduces Food Intake and Body Weight of Lean Rats but Not Obese Zucker Rats." *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Métabolisme* 28(12):664–68.
- Shaver, Steven W., Judy J. Pang, Dan S. Wainman, Katharine M. Wall, and Paul M. Gross. 1992. "Morphology and Function of Capillary Networks in Subregions of the Rat Tuber Cinereum." *Cell and Tissue Research* 1992 267:3 267(3):437–48.
- Shi, Deling, Anran Sheng, and Lianli Chi. 2021. "Glycosaminoglycan-Protein Interactions and Their Roles in Human Disease." *Frontiers in Molecular*

Biosciences 8.

- Silver, Ian A., and Maria Erecińska. 1998. "Glucose-Induced Intracellular Ion Changes in Sugar-Sensitive Hypothalamic Neurons." *Journal of Neurophysiology* 79(4):1733–45.
- Sirko, Svetlana, Alexander Von Holst, Anika Weber, Andrea Wizenmann, Ursula Theocharidis, Magdalena Götz, and Andreas Faissner. 2010. "Chondroitin Sulfates Are Required for Fibroblast Growth Factor-2-Dependent Proliferation and Maintenance in Neural Stem Cells and for Epidermal Growth Factor-Dependent Migration of Their Progeny." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28(4):775–87.
- Smith, G. P., and A. N. Epstein. 1969. "Increased Feeding in Response to Decreased Glucose Utilization in the Rat and Monkey." *The American Journal of Physiology* 217(4):1083–87.
- Smith, George M., and H. David Shine. 1992. "Immunofluorescent Labeling of Tight Junctions in the Rat Brain and Spinal Cord." *International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 10(5):387–92.
- Soleman, S., M. A. Filippov, A. Dityatev, and J. W. Fawcett. 2013. "Targeting the Neural Extracellular Matrix in Neurological Disorders." *Neuroscience* 253:194–213.
- Sorg, Barbara A., X. Sabina Berretta, X. Jordan M. Blacktop, X. James W. Fawcett, X. Hiroshi Kitagawa, X. Jessica C. F. Kwok, X. Marta Miquel, Sabina Berretta, Jordan M. Blacktop, James W. Fawcett, Hiroshi Kitagawa, Jessica C. F. Kwok, and Marta Miquel. 2016. "Casting a Wide Net: Role of Perineuronal Nets in Neural Plasticity." Pp. 11459–68 in *Journal of Neuroscience*. Vol. 36. Society for Neuroscience.
- Steffens, A. B. 1969. "The Influence of Insulin Injections and Infusions on Eating and Blood Glucose Level in the Rat." *Physiology & Behavior* 4(5):823–28.
- Sterner, Eric, Luciana Meli, Seok Joon Kwon, Jonathan S. Dordick, and Robert J. Linhardt. 2013. "FGF-FGFR Signaling Mediated through Glycosaminoglycans in Microtiter Plate and Cell-Based Microarray Platforms." *Biochemistry* 52(50):9009.
- Stevenson, B. R., J. D. Siliciano, M. S. Mooseker, and D. A. Goodenough. 1986. "Identification of ZO-1: A High Molecular Weight Polypeptide Associated with the Tight Junction (Zonula Occludens) in a Variety of Epithelia." *The Journal of Cell Biology* 103(3):755–66.
- Stincic, Todd L., Oline K. Rønnekleiv, and Martin J. Kelly. 2018. "Diverse Actions of Estradiol on Anorexigenic and Orexigenic Hypothalamic Arcuate Neurons." *Hormones and Behavior* 104:146–55.
- Stirpe, Norine S., W. Scott Argraves, and Paul F. Goetinck. 1987. "Chondrocytes from the Cartilage Proteoglycan-Deficient Mutant, Nanomelia, Synthesize Greatly Reduced Levels of the Proteoglycan Core Protein Transcript." *Developmental Biology* 124(1):77–81.
- Stricker, Edward M., and Neil Rowland. 1978. "Hepatic versus Cerebral Origin of Stimulus for Feeding Induced by 2-Deoxy-d-Glucose in Rats." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 92(1):126–32.
- Stroke, National institute of neurological disorders and. 2001. "Stroke Progress Review Group | National Institute of Neurological Disorders and Stroke." *Stroke Progress*

- Review Group*. Retrieved August 30, 2022 (<https://www.ninds.nih.gov/stroke-progress-review-group>).
- Sugiishi, Aya, Masaki Kimura, Ryo Kamiya, Satomi Ueki, Mikiko Yoneya, Yoshimasa Saito, and Hidetsugu Saito. 2013. "Derangement of Ghrelin Secretion after Long-Term High-Fat Diet Feeding in Rats."
- Tang-Christensen, Mads, Jens J. Holst, Bolette Hartmann, and Niels Vrang. 1999. "The Arcuate Nucleus Is Pivotal in Mediating the Anorectic Effects of Centrally Administered Leptin." *Neuroreport* 10(6):1183–87.
- Testa, Damien, Alain Prochiantz, and Ariel A. Di Nardo. 2019. "Perineuronal Nets in Brain Physiology and Disease." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 89:125–35.
- Tian, Ye, Wen Yuan, Nobuyuki Fujita, Jianru Wang, Hua Wang, Irving M. Shapiro, and Makarand V. Risbud. 2013. "Inflammatory Cytokines Associated with Degenerative Disc Disease Control Aggrecanase-1 (ADAMTS-4) Expression in Nucleus Pulposus Cells through MAPK and NF-KB." *The American Journal of Pathology* 182(6):2310.
- Tiesjema, Birgitte, Roger A. H. Adan, Mienke C. M. Luijendijk, Andries Kalsbeek, and Susanne E. La Fleur. 2007. "Differential Effects of Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Neuropeptide Y Overexpression in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus and Lateral Hypothalamus on Feeding Behavior." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27(51):14139–46.
- Timper, Katharina, and Jens C. Brüning. 2017. "Hypothalamic Circuits Regulating Appetite and Energy Homeostasis: Pathways to Obesity." *DMM Disease Models and Mechanisms* 10(6):679–89.
- Van Den Top, Marco, Kevin Lee, Andrew D. Whyment, Andrew M. Blanks, and David Spanswick. 2004. "Orexigen-Sensitive NPY/AgRP Pacemaker Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus." *Nature Neuroscience* 7(5):493–94.
- Trayhum, Paul, Jacqueline S. Duncan, Nigel Hoggard, and D. Vernon Rayner. 1998. "Regulation of Leptin Production: A Dominant Role for the Sympathetic Nervous System?" *The Proceedings of the Nutrition Society* 57(3):413–19.
- Trayhurn, Paul, Moira E. A. Thomas, Jacqueline S. Duncan, and D. Vernon Rayner. 1995. "Effects of Fasting and Refeeding on Ob Gene Expression in White Adipose Tissue of Lean and Obese (Ob/Ob) Mice." *FEBS Letters* 368(3):488–90.
- Trevaskis, James L., Peter S. Griffin, Carrie Wittmer, Brent A. Neuschwander-Tetri, Elizabeth M. Brunt, Carrie S. Dolman, Mary R. Erickson, James Nopora, David G. Parkes, and Jonathan D. Roth. 2012. "Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonism Improves Metabolic, Biochemical, and Histopathological Indices of Nonalcoholic Steatohepatitis in Mice." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 302(8).
- Trivedi, Arjun, Sandra Babic, Mark Heiman, William T. Gibson, and Jean Pierre Chanoine. 2017. "Ghrelin, Ghrelin O -Acyltransferase, and Carbohydrate Metabolism during Pregnancy in Calorie-Restricted Mice." *Hormone and Metabolic Research* 49(1):64–72.
- Tschop, M., D. L. Smiley, and M. L. Heiman. 2000. "Ghrelin Induces Adiposity in

- Rodents." *Nature* 407(6806):908–13.
- Unger, J. W., A. M. Moss, and J. N. Livingston. 1991. "Immunohistochemical Localization of Insulin Receptors and Phosphotyrosine in the Brainstem of the Adult Rat." *Neuroscience* 42(3):853–61.
- Valassi, Elena, Massimo Scacchi, and Francesco Cavagnini. 2008. "Neuroendocrine Control of Food Intake." *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 18(2):158–68.
- del Valle, Jaume, Antoni Camins, Mercè Pallàs, Jordi Vilaplana, and Carme Pelegrí. 2008. "A New Method for Determining Blood-Brain Barrier Integrity Based on Intracardiac Perfusion of an Evans Blue-Hoechst Cocktail." *Journal of Neuroscience Methods* 174(1):42–49.
- Vertel, B. M., B. L. Grier, H. Li, and N. B. Schwartz. 1994. "The Chondrodystrophy, Nanomelia: Biosynthesis and Processing of the Defective Aggrecan Precursor." *Biochemical Journal* 301(Pt 1):211.
- Vertel, B. M., L. M. Walters, B. Grier, and N. Maine. 1993. "Nanomelic Chondrocytes Synthesize, but Fail to Translocate, a Truncated Aggrecan Precursor." *Journal of Cell Science* 104 (Pt 3)(3):939–48.
- Vitellaro-Zuccarello, Laura, Paola Bosisio, Samanta Mazzetti, Claudia Monti, and Silvia De Biasi. 2007. "Differential Expression of Several Molecules of the Extracellular Matrix in Functionally and Developmentally Distinct Regions of Rat Spinal Cord." *Cell and Tissue Research* 327(3):433–47.
- De Vito, Rita, Anna Alisi, Andrea Masotti, Sara Ceccarelli, Nadia Panera, Arianna Citti, Michele Salata, Luca Valenti, Ariel E. Feldstein, and Valerio Nobili. 2012. "Markers of Activated Inflammatory Cells Correlate with Severity of Liver Damage in Children with Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *International Journal of Molecular Medicine* 30(1):49–56.
- Vo, Tam, Daniela Carulli, Erich M. E. Ehlert, Jessica C. F. Kwok, Gunnar Dick, Vasil Mecollari, Elizabeth B. Moloney, Gera Neufeld, Fred de Winter, James W. Fawcett, and Joost Verhaagen. 2013. "The Chemorepulsive Axon Guidance Protein Semaphorin3A Is a Constituent of Perineuronal Nets in the Adult Rodent Brain." *Molecular and Cellular Neurosciences* 56:186–200.
- Vrang, Niels, Curtis B. Phifer, Michele M. Corkern, and Hans Rudolf Berthoud. 2003. "Gastric Distension Induces C-Fos in Medullary GLP-1/2-Containing Neurons." *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 285(2 54-2):470–78.
- Wadden, Danny, Farrell Cahill, Peyvand Amini, Edward Randell, Sudesh Vasdev, Yanqing Yi, Weizhen Zhang, and Guang Sun. 2012. "Serum Acylated Ghrelin Concentrations in Response to Short-Term Overfeeding in Normal Weight, Overweight, and Obese Men." *PLOS ONE* 7(9):e45748.
- Walcz, Erzsébet, Ferenc Deák, Peter Erhardt, Silvija N. Coulter, Csaba Fülöp, Peter Horvath, Kurt J. Doege, and Tibor T. Glant. 1994. "Complete Coding Sequence, Deduced Primary Structure, Chromosomal Localization, and Structural Analysis of Murine Aggrecan." *Genomics* 22(2):364–71.
- Wang, J. H., F. Wang, M. J. Yang, D. F. Yu, W. N. Wu, J. Liu, L. Q. Ma, F. Cai, and J.

- G. Chen. 2008. "Leptin Regulated Calcium Channels of Neuropeptide Y and Proopiomelanocortin Neurons by Activation of Different Signal Pathways." *Neuroscience* 156(1):89–98.
- Wang, R., X. Liu, S. T. Hentges, A. A. Dunn-Meynell, B. E. Levin, W. Wang, and Vanessa H. Routh. 2004. "The Regulation of Glucose-Excited Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus by Glucose and Feeding-Relevant Peptides." *Diabetes* 53(8):1959–65.
- Watanabe, H., L. Gao, S. Sugiyama, K. Doege, K. Kimata, and Y. Yamada. 1995. "Mouse Aggrecan, a Large Cartilage Proteoglycan: Protein Sequence, Gene Structure and Promoter Sequence." *Biochemical Journal* 308(Pt 2):433.
- Watanabe, Hideto, Sau C. Cheung, Naoki Itano, Koji Kimata, and Yoshihiko Yamada. 1997. "Identification of Hyaluronan-Binding Domains of Aggrecan." *The Journal of Biological Chemistry* 272(44):28057–65.
- Watanabe, Hideto, Koji Kimata, Sergio Line, Dave Strong, Luo Yi Gao, Christine A. Kozak, and Yoshihiko Yamada. 1994. "Mouse Cartilage Matrix Deficiency (Cmd) Caused by a 7 Bp Deletion in the Aggrecan Gene." *Nature Genetics* 7(2):154–57.
- Watanabe, Hideto, Ken Nakata, Koji Kimata, Isao Nakanishi, and Yoshihiko Yamada. 1997. "Dwarfism and Age-Associated Spinal Degeneration of Heterozygote Cmd Mice Defective in Aggrecan." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(13):6943.
- Watanabe, Hideto, Yoshihiko Yamada, and Koji Kimata. 1998. "Roles of Aggrecan, a Large Chondroitin Sulfate Proteoglycan, in Cartilage Structure and Function." *Journal of Biochemistry* 124(4):687–93.
- Wellman, Martin, and Alfonso Abizaid. 2015. "Knockdown of Central Ghrelin O-Acyltransferase by Vivo-Morpholino Reduces Body Mass of Rats Fed a High-Fat Diet." *Peptides* 70:17–22.
- Wilde, Peter J. 2009. "Eating for Life: Designing Foods for Appetite Control." *Journal of Diabetes Science and Technology* 3(2):366.
- Willesen, Mette Georgi, Peter Kristensen, and John Rømer. 1999. "Co-Localization of Growth Hormone Secretagogue Receptor and NPY mRNA in the Arcuate Nucleus of the Rat." *Neuroendocrinology* 70(5):306–16.
- Williams, G., J. A. Harrold, and D. J. Cutler. 2000. "The Hypothalamus and the Regulation of Energy Homeostasis: Lifting the Lid on a Black Box." *The Proceedings of the Nutrition Society* 59(3):385–96.
- Wilson, J. T. 1906. "On the Anatomy of the Calamus Region in the Human Bulb; with an Account of a Hitherto Undescribed 'Nucleus Postremus.': Part I." *Journal of Anatomy and Physiology* 40(Pt 3):210.
- Wingert, Jereme C., and Barbara A. Sorg. 2021. "Impact of Perineuronal Nets on Electrophysiology of Parvalbumin Interneurons, Principal Neurons, and Brain Oscillations: A Review." *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 13.
- Wislocki, George B., and Lester S. King. 1936. "The Permeability of the Hypophysis and Hypothalamus to Vital Dyes, with a Study of the Hypophyseal Vascular Supply." *American Journal of Anatomy* 58(2):421–72.

- Wislooki, George B., and Elizabeth H. Leduc. 1952. "Vital Staining of the Hematoencephalic Barrier by Silver Nitrate and Trypan Blue, and Cytological Comparisons of the Neurohypophysis, Pineal Body, Area Postrema, Intercolumnar Tubercle and Supraoptic Crest." *The Journal of Comparative Neurology* 96(3):371–413.
- Wolburg, Hartwig, Jochen Neuhaus, Uwe Kniesel, Bodo Krauß, Eva Maria Schmid, Múcella Öcalan, Catherine Farrell, and Werner Risau. 1994. "Modulation of Tight Junction Structure in Blood-Brain Barrier Endothelial Cells. Effects of Tissue Culture, Second Messengers and Cocultured Astrocytes." *Journal of Cell Science* 107 (Pt 5)(5):1347–57.
- Wolburg, Hartwig, Susan Noell, Karen Wolburg-Buchholz, Andreas MacK, and Petra Fallier-Becker. 2009. "Agrin, Aquaporin-4, and Astrocyte Polarity as an Important Feature of the Blood-Brain Barrier." *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 15(2):180–93.
- Woods, Stephen C., Elizabeth C. Lotter, L. David McKay, and Daniel Porte. 1979. "Chronic Intracerebroventricular Infusion of Insulin Reduces Food Intake and Body Weight of Baboons." *Nature* 282(5738):503–5.
- Woods, Stephen C., Randy J. Seeley, Daniel Porte, and Michael W. Schwartz. 1998. "Signals That Regulate Food Intake and Energy Homeostasis." *Science (New York, N.Y.)* 280(5368):1378–83.
- Xu, Jie, Christopher L. Bartolome, Cho Shing Low, Xinchu Yi, Cheng Hao Chien, Peng Wang, and Dong Kong. 2018. "Genetic Identification of Leptin Neural Circuits in Energy and Glucose Homeostases." *Nature* 556(7702):505–9.
- Yamaguchi, Y. 2000. *Review Lecticans: Organizers of the Brain Extracellular Matrix*. Vol. 57.
- Yaykasli, Kursat Oguz, Omer Faruk Hatipoglu, Emine Yaykasli, Kubra Yildirim, Ertugrul Kaya, Mustafa Ozsahin, Mustafa Uslu, and Esra Gunduz. 2015. "Leptin Induces ADAMTS-4, ADAMTS-5, and ADAMTS-9 Genes Expression by Mitogen-Activated Protein Kinases and NF- κ B Signaling Pathways in Human Chondrocytes." *Cell Biology International* 39(1):104–12.
- Zhang, Bin, and Lianli Chi. 2021. "Chondroitin Sulfate/Dermatan Sulfate-Protein Interactions and Their Biological Functions in Human Diseases: Implications and Analytical Tools." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9:2186.
- Zhang, Weizhen, Chao Zhang, Danielle Fritze, Biaoxin Chai, Jiyao Li, and Michael W. Mulholland. 2013. "Modulation of Food Intake by MTOR Signalling in the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus in Male Rats: Focus on Ghrelin and Nesfatin-1." *Experimental Physiology* 98(12):1696–1704.
- Zhang, Xiaobing, and Anthony N. Van Den Pol. 2016. "Hypothalamic Arcuate Nucleus Tyrosine Hydroxylase Neurons Play Orexigenic Role in Energy Homeostasis." *Nature Neuroscience* 19(10):1341–47.
- Zhang, Yiyang, Ricardo Proenca, Margherita Maffei, Marisa Barone, Lori Leopold, and Jeffrey M. Friedman. 1994. "Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue." *Nature* 372(6505):425–32.
- Zheng, Huiyuan, and Hans Rudi Berthoud. 2008. "Neural Systems Controlling the Drive

to Eat: Mind versus Metabolism.” *Physiology* 23(2):75–83.

Zigman, Jeffrey M., Juli E. Jones, Charlotte E. Lee, Clifford B. Saper, and Joel K. Elmquist. 2006. “Expression of Ghrelin Receptor mRNA in the Rat and the Mouse Brain.” *The Journal of Comparative Neurology* 494(3):528–48.

Zlokovic, Berislav V. 2008. “The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders.” *Neuron* 57(2):178–201.