Rôle de l'inflammation hypothalamique dans les dérégulations de la balance énergétique

Ophélia Le Thuc

▶ **To cite this version:**

Ophélia Le Thuc. Rôle de l'inflammation hypothalamique dans les dérégulations de la balance énergétique. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2015. Français. NNT : 2015NICE4122 . tel-01674177v2

HAL Id: tel-01674177
https://theses.hal.science/tel-01674177v2

Submitted on 2 Jan 2018

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

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

UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS – UFR Sciences

Ecole Doctorale de Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences
de l'Université Nice Sophia Antipolis

Spécialité : Interactions Moléculaires et Cellulaires

présentée par

Ophélia LE THUC

Rôle de l'inflammation hypothalamique dans les dérégulations de la balance énergétique

Thèse dirigée par le Dr Carole ROVERE-JOVENE

Soutenue le 14 décembre 2015

Devant le jury composé de :

Pr Jacques NOEL	Président
Dr Serge LUQUET	Rapporteur
Dr Vincent PREVOT	Rapporteur
Dr Alexandre BENANI	Examinateur
Dr Christine POITOU-BERNERT	Examinatrice
Dr Carole ROVERE-JOVENE	Directrice de thèse

CC BY NC

UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS – UFR Sciences

Ecole Doctorale de Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

pour obtenir le titre de

Docteur en Sciences
de l'Université Nice Sophia Antipolis

Spécialité : Interactions Moléculaires et Cellulaires

présentée par

Ophélia LE THUC

Rôle de l'inflammation hypothalamique dans les dérégulations de la balance énergétique

Thèse dirigée par le Dr Carole ROVERE-JOVENE

Soutenue le 14 décembre 2015

Devant le jury composé de :

Pr Jacques NOEL	Président
Dr Serge LUQUET	Rapporteur
Dr Vincent PREVOT	Rapporteur
Dr Alexandre BENANI	Examinateur
Dr Christine POITOU-BERNERT	Examinatrice
Dr Carole ROVERE-JOVENE	Directrice de thèse

CC BY NC

CC BY NC

« L'imagination est plus importante que le savoir. »

Albert Einstein

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à adresser mes remerciements aux membres du jury. Je remercie chaleureusement le professeur Jacques Noël d'avoir accepté la tâche d'être président du jury ainsi que les rapporteurs, les docteurs Serge Luquet et Vincent Prévot, et les examinateurs, les docteurs Alexandre Benani et Christine Poitou-Bernert, d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Jean-Louis, je vous remercie de m'avoir accueillie avec bienveillance dans votre équipe dès mon stage de Master 2. Je vous ai vu très occupé par vos multiples casquettes tout au long de ces trois ans et demi, et malgré tout, vous avez toujours été disponible et de bon conseil. Je vous remercie aussi de ne m'avoir jamais refusé aucun congrès, aidant ainsi d'une autre manière encore, ma découverte du monde scientifique, mais aussi d'avoir financé la fin de ma thèse. De plus, je n'oublierai pas que j'ai découvert la bière munichoise en votre compagnie ! Pour ces raisons et sûrement bien d'autres, je vous remercie.

Carole, après ces trois années de thèse durant lesquelles tu m'as dirigée, c'est amusant de se souvenir que je n'ai pas osé te tutoyer avant d'avoir obtenu cette fameuse bourse de thèse ! Notre relation a en effet bien évolué et nous avons appris, je pense, à nous connaître. A ce moment précis, je suis heureuse que notre relation ne soit pas seulement « professionnelle » et je te remercie de ton soutien moral au cours de ces années, d'avoir su être à l'écoute. Ta bonne humeur, ta décontraction et ton recul sont des qualités essentielles qui ont été salutaires pour compenser certains de mes travers. J'aime penser que, même si j'ai encore du chemin à parcourir, j'ai su progresser de mon côté et si c'est bien le cas, nous savons que tu y as participé ! Je te remercie pour tes enseignements, d'avoir su, à la fois, être disponible et me faire suffisamment confiance pour me laisser mon autonomie tout au long de ma thèse. Merci de tout cœur de m'avoir donné, à de nombreuses reprises, l'opportunité de présenter mes résultats et de rencontrer la communauté scientifique en me « trimbalant » dans les congrès, je réalise pleinement la chance que j'ai eue. Je te suis reconnaissante de m'avoir poussée à prendre la parole, à faire entendre ma voix à chaque occasion qui se présentait. Nicolas disait que tu te comportes un peu comme une mère avec tes étudiants, cela pourrait paraître péjoratif, mais pour moi, aujourd'hui tu es un peu la mère qui pousse son enfant hors du nid et le laisse prendre son envol. J'espère ne pas te décevoir et surtout, ne perds pas le Feu ! Merci pour tout !

Je voudrais aussi remercier le reste de l'équipe GENE. Une « petite famille » qui s'est bien agrandie récemment.

Françoise, j'ai apprécié ta disponibilité, tes remises en question, ta spontanéité entre autres… Ton implication dans les enseignements, la recherche et les « à-côtés », qui ne sont pas toujours des moindres, force le respect.

Nadège, je voudrais te remercier pour ton soutien au long de ma thèse, et particulièrement la dernière année où je l'ai souvent sollicité, tant au niveau professionnel que personnel. Professionnellement, j'admire ta flexibilité, cette capacité à être sur tous les fronts, et toujours volontaire. Par ailleurs, tu es quelqu'un d'exceptionnellement disponible pour les autres, une personne sur laquelle on peut s'appuyer pour retrouver l'équilibre quand on perd un peu pied. J'apprécie ta bienveillance et ta faculté à dire les choses avec tact mais sans inutiles détours pour autant. Merci, beaucoup et « An bald » !

Pour les « petits nouveaux », la relève : ce ne fut que quelques mois mais la bonne humeur, le dynamisme : un vrai bol d'air frais ! Je ne suis pas certaine de vous l'avoir rendu (vous n'êtes pas arrivés au moment le plus facile pour moi, malheureusement pour vous !), mais merci et bonne continuation à vous Céline, Katharina et Kévin !

Nicolas, je vous ai souvent donné du fil à retordre ! Vous avez frôlé l'exaspération à plusieurs reprises, je le crains, mais vous avez été présent aux moments importants et notamment, je n'aurais pas réussi à obtenir ma bourse de thèse sans votre coaching : je vous remercie d'avoir cru en moi à l'époque et de me l'avoir montré ! Je vous remercie aussi de vos enseignements et les brainstormings du lundi notamment ont été d'un grand enseignement scientifique. Si j'ai manqué quelques occasions de progresser encore, j'estime avoir beaucoup appris à votre contact et vous en remercie. Votre sens critique et votre exigence ont été très formateurs ! Par ailleurs, si je manque encore un peu de recul, je garde en tête certains conseils que vous m'avez prodigués sur un plan humain. Merci de votre investissement. J'espère que cela n'aura pas été en vain ! Enfin, je vous remercie d'être un tourbillon qui trompe toujours l'ennui et qui ne s'encombre guère de faux-semblants !

Puis, il y a les « 4 fantastiques ». Cette histoire a commencé à la fin de la licence, il y a environ 5 ans. Je me souviens des heures passées à réviser à la BU. Je me souviens des « mauvaises » blagues, des situations cocasses dans lesquelles nous nous sommes retrouvés parfois… Merci Anissa, Thomas et Miled ! Je vous remercie d'avoir fait une place à la fille très réservée que j'étais. Tous les 4 embarqués dans la « galère » de la thèse, nous restons solidaires ! Anissa et Thomas, j'ai le sentiment que, malgré la distance et le temps qui passe, nous pourrons toujours partager avec la même spontanéité de bons moments !

Je n'en garde que de bons souvenirs, et ces moments et ces souvenirs m'ont aidée à traverser la thèse. Merci d'avoir été là.

Associés de très près à ce « noyau dur », je dois aussi remercier Hadi et Julie V.
Hadi, aussi banal que cela pourrait paraître, ta bonne humeur et ton sourire, mais aussi tes pantalons colorés, moins banals, étaient un rafraîchissement quotidien et me manqueront ! Merci d'oser amener de la légèreté, mais pas que !
Julie V, un caractère bien trempé, une fille piquante avec qui on ne s'ennuie pas ! Au labo et en dehors, tu as été une oreille attentive, une épaule sur laquelle se reposer. Tu as été présente dans les bons moments et dans les plus mauvais, je t'en remercie. J'aime me souvenir des bons moments à La Casa et ailleurs ! Merci d'avoir été là.

Miled, c'est sans excès que je pense pouvoir dire que, sans toi, je n'en serais probablement pas là aujourd'hui. Pendant plus de 5 ans, toujours au plus près et au quotidien, nous avons tout partagé. C'est avec ton aide que j'ai pu traverser la plupart des épreuves auxquelles j'ai été confrontée et tu m'as poussée à aller plus loin. Tu m'as aidée à sortir un peu de ma carapace, puis à m'en forger une nouvelle, mieux adaptée à la vie. J'ai le sentiment qu'on a grandi ensemble. Je te remercie d'avoir su croire en moi envers et contre tout, et surtout contre moi : il ne s'agit pas de chercher absolument à briller mais de donner le meilleur de soi-même et ne rien regretter. Merci pour tous les bons moments passés ensemble, les fous rires et d'avoir été mon confident. Je garderai avec moi l'image de ton sourire chaleureux !

Je tiens à remercier ma famille, sans laquelle, évidemment, rien de tout cela n'aurait été possible. Tantes, oncles, cousines et cousins, je vous remercie de ce soutien indéfectible qui m'a donné la force d'avancer !!!

Je voudrais remercier ma grand-mère Aimée, le soutien le moins objectif de tous ! Tu étais une femme exceptionnellement généreuse, forte et courageuse et ton absence se fait terriblement au sentir, au quotidien. J'aurais tant aimé que tu sois là aujourd'hui.

Enfin, je voudrais remercier mes parents « uniques et préférés » sans lesquels je ne serais pas là, évidemment. Vous m'avez supportée et avez été mes supporters n°1 pendant toutes ces années. Vous avez toujours cru en moi, m'avez laissée suivre ma voie et m'avez toujours poussée à donner le meilleur de moi-même. J'ai la chance immense de toujours pouvoir compter sur vous à tout point de vue et je vous dois tant. Vous êtes ma plus grande force ! Je ne trouverai ni suffisamment de mots, ni de mots suffisamment forts pour exprimer toute ma gratitude et mon affection, mais j'ose croire que vous ne m'en tiendrez pas rigueur et j'espère vous avoir rendus fiers.

Résumé

L'hypothalamus est une aire cérébrale clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique qui contrôle notamment la prise alimentaire et les dépenses énergétiques. Pour cela, l'hypothalamus intègre des signaux humoraux, neuraux ainsi que des informations directement données par les différents nutriments. Les neurones et les cellules gliales hypothalamiques agissent de concert pour réguler dans le temps et l'espace les fonctions métaboliques de l'hypothalamus. Aussi il pourrait exister un lien causal entre inflammation hypothalamique et les dérégulations du comportement alimentaire, comme la perte de poids ou l'obésité. Cette neuroinflammation perturberait l'activité cellulaire ainsi que la synthèse et/ou la sécrétion de multiples neurotransmetteurs/médiateurs, dérégulant l'homéostasie énergétique.

Les objectifs de cette thèse portaient sur le rôle de l'inflammation hypothalamique dans le développement d'une perte ou d'un gain de poids excessifs. Nous avons cherché à identifier les relais moléculaires entre l'inflammation centrale ou systémique et les systèmes neuropeptidergiques de l'hypothalamus impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique, en nous concentrant sur les chimiokines.

D'une part, nous avons identifié la chimiokine CCL2 et son récepteur CCR2 comme des éléments de signalisation essentiels dans la perte de poids associée à une inflammation aigue chez la souris induite par l'injection centrale de lipopolysaccharide bactérien. L'activation de CCR2 exercerait des effets inhibiteurs directs sur les neurones hypothalamiques exprimant la MCH, peptide connu pour ses effets orexigènes, qui contribueraient à la perte de poids induite par l'injection de lipopolysaccharide ou de CCL2.

D'autre part, nous nous sommes intéressés à la réponse inflammatoire dans l'hypothalamus suite à une consommation de régimes hyperlipidiques, entraînant, à terme, un gain de poids voire une obésité. Nous avions trois objectifs : 1) identifier une chimiokine pouvant lier inflammation hypothalamique et augmentation de la prise alimentaire et/ou du poids ; 2) déterminer si la nature des lipides contenus dans le régime hyperlipidique peut influencer le développement de l'obésité, et 3) identifier l'impact de la consommation d'un régime hyperlipidique à très court-terme, sur la plasticité gliale dans l'hypothalamus.

Nous avons trouvé, dans des modèles murins d'obésité nutritionnelle, que 1) la chimiokine CCL5 favoriserait la prise de poids, possiblement en augmentant l'activité des neurones hypothalamiques à MCH ; 2) modifier la nature des lipides composant un régime hyperlipidique a un impact sur la cinétique de développement de l'obésité, en lien avec des changements du profil inflammatoire et 3) la consommation excessive de lipides peut induire une astrogliose et une microgliose très précoces dans l'hypothalamus médio-basal. En conclusion, la consommation excessive de lipides, notamment saturés, peut entraîner une inflammation centrale, qui elle-même, pourrait contribuer à l'obésité en activant des réseaux de neuropeptides hypothalamiques.

L'ensemble de nos résultats qui identifient les chimiokines comme cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des dérégulations du comportement alimentaire, souligne l'intérêt de cibler l'inflammation hypothalamique dans ces pathologies.

Mots-clés : neuroinflammation, perte de poids, obésité, comportement alimentaire, hypothalamus, chimiokines, neuropeptides, régimes hyperlipidiques.

Abstract

The hypothalamus is a key brain region in the regulation of energy homeostasis, in particular by controlling food intake and energy storage and expenditure. It integrates humoral, neural and nutrient-related signals and cues to ensure balance between energy intake and expenditure. Hypothalamic neurons and glial cells orchestrate together, both spatially and temporally, correctly regulated metabolic functions of the hypothalamus.

Numerous studies suggest a causal link between hypothalamic inflammation and the deregulations of feeding behavior, such as weight-loss (symptom of a primary disease) or obesity. This inflammation would disrupt cellular activity together with synthesis and/or secretion of multiple neurotransmitters/mediators that are involved in the maintenance of energy homeostasis.

The general goal of this thesis was to increase our knowledge on the role of the hypothalamic inflammation in the occurrence of excessive weight loss or gain. Furthermore, we sought to identify mediators that could act as intermediaries between central or systemic inflammation and neuropeptidergic systems of the hypothalamus that are involved in the regulation of energy homeostasis, focusing on chemokines.

First, we studied the effect of a central injection of bacterial lipopolysaccharide, mimicking a acute and strong inflammation state in mice. We identified the chemokine CCL2 and its receptor CCR2 as essential signaling elements in the weight-loss induced by this treatment. The activation of CCR2 would exert direct inhibitory effects on hypothalamic neurons expressing MCH, a peptide known to have orexigenic and energy conservative effects, thus contributing to the weight-loss elicited by a lipopolysaccharide or CCL2 injection.

Second, we were interested in the inflammatory response of the hypothalamus to high-fat feeding, which, eventually, induces weight-gain and possibly obesity. We determined three main objectives: 1) to identify a chemokine that could link hypothalamic inflammation and food intake increase and/or weight-gain in an obese context; 2) to determine if the nature of the lipids entering the composition of a high-fat diet can alter the kinetics of obesity development and 3) to identify the impact of very brief high-fat feeding on glial plasticity in the hypothalamus. We found in murine models that: 1) the chemokine CCL5 would promote weight-gain, possibly by enhancing the activity of hypothalamic MCH neurons; 2) altering the lipid composition of a high-fat diet changes the kinetics of the development of diet-induced obesity, together with changes in the inflammatory profile of mice and 3) an excessive dietary lipid intake can induce very early astrogliosis and microgliosis in the mediobasal hypothalamus. In conclusion, excessive dietary intake, in particular saturated fatty acids, can induce a central inflammation, which can, in turn, promote the development of obesity through activation of specific neuropeptidergic circuits in the hypothalamus.

Taken together, our results underline the interest of reducing hypothalamic inflammation to fight feeding behavior deregulations and identify chemokines as putative therapeutic targets.

Key words: neuroinflammation, weight-loss, obesity, feeding behavior, hypothalamus, chemokines, neuropeptides, high-fat diets.

Table des matières

Remerciements **7**
Résumé **11**
Abstract **12**
Table des matières **13**
Abréviations **17**
Liste des figures **21**
Liste des tableaux **23**
Avant-propos **25**
INTRODUCTION **27**
1. Régulation centrale du comportement alimentaire et du poids corporel **29**
1.1. Régulation hédonique du comportement alimentaire par le système limbique ... 29
1.2. Régulation homéostatique du comportement alimentaire 32
1.2.1. Le tronc cérébral 32
1.2.2. L'hypothalamus 33
1.2.3. Régulation homéostatique du comportement alimentaire à court-terme 48
1.2.4. Régulation homéostatique du comportement alimentaire à long-terme 51
2. L'inflammation **55**
2.1. Les cellules participant à la réponse immunitaire 56
2.1.1. Les lymphocytes 57
2.1.2. Les mastocytes et polynucléaires basophiles et éosinophiles 57
2.1.3. Les phagocytes 57
2.1.4. Les cellules « immunitaires » du système nerveux central 58
2.2. Les acteurs moléculaires de l'inflammation 59
2.2.1. Les cytokines 59
2.2.2. Les chimiokines 65
3. Inflammation et troubles de la régulation centrale du comportement alimentaire et du poids corporel **77**
3.1. Inflammation et perte de poids involontaire 77
3.1.1. Généralités sur la perte de poids involontaire 77
3.1.2. L'inflammation de haut-grade dans la pathogenèse de la perte de poids involontaire 78
3.2. Inflammation et obésité 82
3.2.1. Généralités sur l'obésité 82
3.2.2. L'inflammation de bas-grade dans la pathogenèse et le maintien de l'obésité 84
4. Objectifs **98**

RÉSULTATS 99

1. CCL2 médie la perte de poids induite par une inflammation centrale en inhibant l'activité des neurones à MCH 101

1.1. Introduction 101

1.2. Matériels et Méthodes 101

1.3. Résultats 102

1.4. Conclusion et Discussion 104

1.5. Article « CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity » 108

2. Implication de la chimiokine CCL5 dans la prise de poids par action sur les neurones à MCH : un rôle dans la pathogenèse de l'obésité ? 136

2.1. Introduction 136

2.2. Matériels et Méthodes 138

2.2.1. Animaux et régimes 138

2.2.2. Injections 139

2.2.3. Quantification de l'expression génique et/ou protéique de médiateurs inflammatoires et de la leptine en périphérie et/ou dans l'hypothalamus. 139

2.2.4. Etudes électrophysiologiques de l'effet de CCL5 sur l'activité des neurones à MCH. 140

2.2.5. Expériences de superfusion : libération de glutamate. 140

2.3. Résultats 142

2.3.1. Développement d'un modèle murin d'obésité nutritionnelle 142

2.3.2. La consommation du régime HFD Soja/Maïs modifie l'expression de neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire 145

2.3.3. Lien entre la chimiokine CCL5, le comportement alimentaire et le poids corporel 149

2.3.4. L'injection de la chimiokine CCL5 induit une prise de poids chez la souris 150

2.3.5. L'injection de la chimiokine CCL5 induit l'augmentation de l'expression des peptides orexigènes du LHA : MCH et OX 152

2.3.6. La chimiokine CCL5 a un effet excitateur sur les neurones à MCH du LHA 152

2.4. Conclusion et Discussion 156

3. La nature des lipides influence-t-elle le développement de l'obésité ? 158

3.1. Introduction 158

3.2. Matériels et Méthodes 161

3.2.1. Animaux et régimes 161

3.2.2. Quantification de l'expression génique et/ou protéique de médiateurs inflammatoires et de la leptine en périphérie et/ou dans l'hypothalamus. 162

3.2.3. Analyses statistiques 162

3.3. Résultats 163

3.3.1. Effet de la nature des lipides sur la prise de poids des souris C57Bl6/J 163

3.3.2. Effet de la nature des lipides sur la leptinémie 164

3.3.3. Effet de la nature des lipides sur l'inflammation 165

3.3.4. Effet de la nature des lipides sur la production des peptides de l'ARC et du LHA impliqués dans la régulation de la prise alimentaire 167

3.4. Conclusion et Discussion 169

4. Quelle est la réponse précoce à la consommation d'un régime hyperlipidique dans l'hypothalamus ? 171

4.1. Introduction 171

4.2. Matériels et Méthodes 173

4.2.1. Animaux et régimes 173

4.2.2. Quantification de l'expression génique dans l'hypothalamus 173

4.2.3. Etude de la plasticité astrocytaire et microgliale par immunohistochimie 173

4.2.4. Analyses statistiques 174

4.3. Résultats 174

4.3.1. Réponse inflammatoire précoce dans l'hypothalamus induite par un régime hyperlipidique 174

4.4. Conclusion et Discussion 181

CONCLUSION GÉNÉRALE 183

PERSPECTIVES 191

ANNEXES 197

1. Publications dans revues à comité de lecture 199

1.1. Articles collaboratifs 199

1.1.1. « Effects of sleeve gastrectomy in high-fat diet-induced obese mice: respective role of reduced caloric intake, white adipose tissue inflammation and changes in adipose tissue and ectopic fat depots » (Schneck et al., 2014) 199

1.1.2. « ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death » (Lebeaupin et al., 2015) 213

1.2. Revue 227

1.2.1. « The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects » (Le Thuc et al., 2015) 227

2. Autres publications 243

2.1. Résumé de congrès 243

BIBLIOGRAPHIE 247

Abréviations

3V troisième ventricule

α-MSH « α-melanocyte-stimulating hormone »

aa acide aminé

AA « arachidonic acid » ; acide arachidonique

AG acide(s) gras

AGI AG insaturé(s)

AGL AG libre(s)

AGMI AG mono-insaturé

AGPI AG poly-insaturé

AgRP « agouti-related peptide »

AGS AG saturé(s)

ALA « alpha-linoleic acid » ; acide alpha-linoléique

AMPK « AMP (adenosine monophosphate)-activated protein kinase »

AP area postrema

ARC « arcuate nucleus » ; noyau arqué

ATP adénosine triphosphate

ATV aire tegmentale ventrale

AVC accident vasculaire cérébral

AVP « arginine vasopressin » ; vasopressine

BDNF « brain-derived neurotrophic factor »

BHE barrière hémato-encéphalique

CA comportement alimentaire

CART « cocaine- and amphetamine-regulated transcript »

CCK cholécystokinine

CCL2 CC-chemokine ligand 2 ; MCP1 (« monocyte-chemoattractant protein 1 »)

CCL5 CC-chemokine ligand 5 ; RANTES, « regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted »

CCR1 CC-chemokine receptor 1

CCR2 CC-chemokine receptor 2

CCR3 CC-chemokine receptor 3

CCR5 CC-chemokine receptor 5

CD « cluster of differentiation »

CDV complexe dorso-vagal

CPA cellule(s) présentatrice(s) d'antigène

CRH « corticotropin-releasing hormone » ; cortico-libérine

CXCL12 CXC-chemokine ligand 12

CXCR4 CXC-chemokne receptor 4

DARC « duffy antigen receptor for chemokines »

DHA « docosahexaneoic acid » ; acide docosahexaénoïque

DMN « dorsomedial nucleus » ; noyau dorso-médian

DMV noyau moteur dorsal du nerf vague

DT2 diabète de type 2

DTR « diphteria toxin receptor »

EIA « enzyme immunoassay »

ELISA « enzyme-linked immunosorbent assay »

EM éminence médiane

EPA « eicosapentaneoic acid » ; acide eicosapentaénoïque

ERK « extracellular signal-regulated protein kinase »

FOXO1 « Forkhead box protein O1 »

GABA « γ-aminobutyric acid » ; acide γ-aminobutyrique

GAG glycosaminoglycane(s)

GAPDH Glycéraldehyde 3-phosphate déshydrogénase

GFAP « glial fibrillary acidic protein »

GHSR-1a « growth hormone secretagogue receptor 1 a »

GI gastro-intestinal

GL gastrectomie longitudinale

GLP-1 « glucagon-like peptide-1 »

GLUT-4 « glucose transporter type 4 »

GOAT « ghrelin O-acyltransferase »

HFD « high-fat diet » ; régime hyperlipidique

Iba1 « ionized calcium-binding adapter molecule 1 »

ICV intracérébroventriculaire

IKK « inhibitor of κ kinase »

IL interleukine

IL-1β interleukine-1β

IL-1R1 « interleukin 1 receptor, type I »

IL-1RAcP « interleukin 1 receptor accessory protein »

IL-6 interleukine-6

IL-6R « IL-6 receptor »

IMC indice de masse corporelle

IP intrapéritonéale

IR « insulin receptor» ; récepteur de l'insuline

IRS « insulin receptor substrate »

JAK « janus kinase »

JNK « c-jun N-terminal kinase »

LepR « leptin receptor »

LepRb « leptin receptor isoform B »

LHA « lateral hypothalamic area » ; hypothalamus latéral

LPS lipopolysaccahride

MAPK « mitogen-activated protein kinase »

MBH « medio-basal hypothalamus » ; hypothalamus médio-basal

MC3R « melanocortin 3 receptor »

MC4R « melanocortin 4 receptor »

MCH « melanin-concentrating hormone

MCHR1 « MCH receptor 1 »

MCHR2 « MCH receptor 2 »

MCP « monocyte-chemoattractant protein »

MCP1 « monocyte-chemoattractant protein 1 » ; CCL2, « CC-chemokine ligand 2 »

mTOR « mammalian target of rapamycin »

NAc noyau accumbens

NF-κB « nuclear factor-κB »

NK « natural killer »

NK3 « tachykinin receptor 3 »

NLRP3 « NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 »

NPY neuropeptide Y

NTS noyau du tractus solitaire

OCV organe(s) circumventriculaire(s)

OMS Organisation Mondiale de la Santé

OX orexine(s)

OX1R « OX receptor 1 »

OX2R « OX receptor 2 »

NPY neuropeptide Y

PGE2 prostanglandine(s) de la série E2

PKCθ « protein kinase C θ »

PKR « protein kinase R »

PLC phospholipase C

POMC pro-opiomélanocortine

PPAR « peroxisome proliferator-activated receptor »

PTEN « Phosphatase and tensin homolog »

PTP1B « protein-tyrosine phosphatase 1B »

PVN « paraventricular nucleus » ; noyau para-ventriculaire

PYY peptide tyrosine tyrosine

qPCR « quantitative polymerase chain reaction »

RANTES RANTES (« regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted ») ; CCL5, « CC-chemokine ligand 5 »

RCPG récepteur(s) couplé(s) aux protéines G

REM (sommeil) « rapid-eye movement » ; sommeil paradoxal

ROS « reactive oxygen species » ; espèces réactives de l'oxygène

RT-PCR « reverse transcription polymerase chain reaction »

S6K « S6 kinase »

SF1 « steroidogenic factor 1 »

SNC système nerveux central

SOCS « suppressor(s) of cytokine signaling »

STAT « Signal Transducers and Activators of Transcription »

TA tissu adipeux

TCA troubles du comportement alimentaire

TG triglycérides

TH tyrosine hydroxylase

TLR « toll-like receptor »

TNFR1 « TNF receptor 1 »

TNFR2 « TNF receptor 2 »

TRH « thyrotropin-releasing hormone » ; hormone thyréotrope

TRKB « Tropomyosin receptor kinase B »

TTX tétrodotoxine

VIH virus de l'immunodéficience humaine

VMN « ventromedial nucleus » ; noyau ventro-médian

TNF-α tumor necrosis factor-α

Liste des figures

Figure 1. Intégration de signaux périphériques et régulation de l'homéostasie énergétique par le système nerveux central (d'après Morton et al., 2014) 30

Figure 2. Modèle d'intégration des signaux liés à la récompense - Circuit cérébral de la récompense (d'après Morton et al., 2006)..... 30

Figure 3. Zones, régions et aires hypothalamiques. 34

Figure 4. Régulation homéostatique du comportement alimentaire : schéma simplifié résumant les réseaux neuropeptidergiques hypothalamiques impliqués 36

Figure 5. Structure et distribution cérébrale de la MCH chez le rat. 41

Figure 6. Structure et distribution cérébrale du MCHR1 chez le rat..... 42

Figure 7. Distribution cérébrale des neurones OX et des récepteurs OX1R et OX2R chez la souris (adapté de Flores et al., 2013)..... 45

Figure 8. Régulation homéostatique de la prise alimentaire: modèle d'intégration des signaux de satiété (court-terme) et d'adiposité (long-terme) (d'après Morton et al., 2006) 50

Figure 9. Le réseau des cytokines (d'après SABiosciences) 60

Figure 10. Signalisation de l'IL-1β (d'après QIAGEN) 62

Figure 11. Signalisation de l'IL-6 (d'après SABiosciences) 63

Figure 12. Signalisation du TNF-α (d'après SABiosciences) 64

Figure 13. Récepteurs des chimiokines et leurs ligands (adapté de White et al., 2013). 66

Figure 14. Signalisation des chimiokines (d'après SABiosciences). 68

Figure 15. Les chimiokines participent à la communication entre les différentes cellules du cerveau 69

Figure 16. Effets des chimiokines dans le SNC en conditions physiologiques. 70

Figure 17. L'indice de masse corporelle (IMC) 82

Figure 18. Comorbidités de l'obésité..... 83

Figure 19. Croissance pondérale des souris sous régime HFD Soja/Maïs..... 143

Figure 20. Concentration sérique en leptine des animaux. 144

Figure 21. Expression génique dans l'hypothalamus et concentration sérique de cytokines pro-inflammatoires..... 146

Figure 22. Expression génique dans l'hypothalamus et concentration sérique de chimiokines. 147

Figure 23. Expression génique des peptides de l'ARC : POMC, CART, NPY et AgRP..... 148

Figure 24. Expression génique des peptides du LHA : MCH et OX. 149

Figure 25. Evolution de la concentration sérique de CCL5 chez des sujets humains obèses avant et après chirurgie bariatrique (d'après Dalmas et al., 2011) 150

Figure 26. Gain de poids des souris après injection IP de CCL5 151

Figure 27. Gain de poids des souris après injection ICV de CCL5..... 151

Figure 28. Variation de l'expression génique et protéique des peptides du LHA (MCH et OX) après injection IP de CCL5. 153

Figure 29. Variation de l'expression génique et protéique des peptides du LHA (MCH et OX) après injection ICV de CCL5..... 154

Figure 30. Effet de l'application de CCL5 (1nM) sur l'activité électrique des neurones à MCH du LHA des souris KI MCH-CFP. 155

Figure 31. Les effets de CCL5 sur les neurones à MCH sont médiés par la libération présynaptique de glutamate 155

Figure 32. Effet de CCL5 sur la libération de glutamate par les cellules gliales et les neurones purifiés d'hypothalamus 156

Figure 33. Synthèse des acides gras insaturés oméga-3 et-6. 161

Figure 34. Croissance pondérale des souris au cours du temps en fonction des régimes .. 164

Figure 35. Concentration sérique en leptine des animaux 165

Figure 36. Expression génique dans l'hypothalamus et concentration sérique de cytokines pro-inflammatoires..... 166

Figure 37. Expression génique dans l'hypothalamus et concentration sérique de chimiokines. 167

Figure 38. Expression génique des peptides de l'ARC : POMC, CART, NPY et AgRP..... 168

Figure 39. Expression génique des peptides du LHA : MCH et OX. 169

Figure 40. Expression génique dans l'hypothalamus des marqueurs astrocytaire (GFAP) et microglial (Iba1) après consommation du HFD Soja/Maïs. 175

Figure 41. Photos représentatives des marquages GFAP et Iba1 dans le MBH après consommation du HFD Soja/Maïs pendant 1h (A-B) ou 3h (C-D). 176

Figure 42. Analyse des marquages GFAP et Iba1 dans l'ARC après consommation du HFD Soja/Maïs pendant 1h..... 177

Figure 43. Analyse des marquages GFAP et Iba1 dans l'ARC après consommation du HFD Soja/Maïs pendant 3h..... 178

Figure 44. Analyse des marquages GFAP et Iba1 dans l'EM après consommation du HFD Soja/Maïs pendant 1h..... 179

Figure 45. Analyse des marquages GFAP et Iba1 dans l'EM après consommation du HFD Soja/Maïs pendant 3h..... 180

Figure 46. Etude de la morphologie des prolongements astrocytaires après 3h de consommation du HFD Soja/Maïs. 181

Figure 47. Stratégie de traitement d'image pour déterminer la forme d'une cellule microgliale (d'après Kozlowski et al., 2012)..... 182

Figure 48. Mode d'action putatif de la voie de signalisation CCL2/CCR2 sur les neurones à MCH dans un modèle de perte de poids induite par une injection centrale de LPS 185

Figure 49. Mode d'action putatif de la chimiokine CCL5 dans la prise de poids par action sur les neurones à MCH. 186

Figure 50. Schéma récapitulatif : Liens entre inflammation hypothalamique, nutriments et dérégulations de poids. 188

Liste des tableaux

Tableau 1. Comparaison des caractéristiques de l'inflammation métabolique et de l'inflammation associée à la cachexie (d'après Cai et Liu, 2011). 96

Tableau 2. Détails de la composition des régimes utilisés : régime standard et HFD Soja/Maïs 138

Tableau 3. Détail de la composition des régimes utilisés : régimes standard, HFD Soja/Maïs, HFD Colza et HFD Tournesol 162

Avant-propos

La recherche d'aliments et la consommation de nourriture sont des fonctions physiologiques essentielles au maintien de l'intégrité d'un organisme, à la reproduction et donc à la survie d'une espèce, si elles sont réalisées dans des proportions adaptées. En effet, il est important d'assurer un équilibre entre apports et dépenses énergétiques en fonction des besoins. On parle ainsi de balance énergétique. Le maintien de celle-ci garantit aussi, normalement, un poids corporel adéquat.

La régulation du comportement alimentaire (CA) et du poids corporel est majoritairement réalisée au niveau central. Chez les Mammifères, la régulation du CA et du poids corporel est un processus complexe, contrôlé par un grand nombre de systèmes neuraux, répartis dans le système nerveux central (SNC), et redondants, dans le but d'être infaillibles.

Malgré ces « précautions », les temps modernes surtout, ont vu naître et se répandre de nombreuses conditions pathologiques, problèmes de santé publique majeurs pour la plupart, où la régulation du CA est fortement altérée comme l'obésité, l'anorexie-cachexie, les troubles du CA (TCA ; par ex. anorexie mentale, boulimie)… Les origines de ces conditions sont diverses : conséquences d'une pathologie primaire, génétique ou non (ex. trouble hormonal, cancer), causes psychologiques, traitements médicamenteux…

Cependant, il est intéressant de noter qu'il est possible de faire le lien entre certaines de ces conditions où la dérégulation du CA devient pathologique. En effet, l'obésité et l'anorexie-cachexie ont été associées toutes deux à un état inflammatoire, en périphérie notamment. Or, les mécanismes neuro-immunitaires impliqués dans ces dérégulations du CA sont à l'heure actuelle encore méconnus.

Mes travaux de thèse ont eu pour but général d'étudier le rôle de l'inflammation au niveau central particulièrement, dans le développement et/ou le maintien de pathologies du CA, aux manifestations majoritairement périphériques (perte ou gain de poids trop important(e)).

Ainsi, au cours de ma thèse :

- nous aurons pu identifier la chimiokine CCL2 (« CC-chemokine ligand 2 ») comme intermédiaire crucial dans la perte de poids associée à une inflammation de forte intensité. Ces travaux font l'objet d'un article en cours de soumission ;
- nous avons étudié l'implication de la chimiokine CCL5 (« CC-chemokine ligand 5 ») dans le développement de l'obésité, dans un modèle d'obésité nutritionnelle induite par la consommation d'un régime hyperlipidique, par action sur des réseaux neuronaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire ;

- nous avons étudié si la nature des lipides constituant un régime hyperlipidique peut modifier le développement de l'obésité ;
- enfin, nous avons étudié l'effet de la consommation, pendant des intervalles de temps très brefs (quelques heures), d'un régime hyperlipidique (qui à long-terme mène au développement d'une obésité) sur la réponse inflammatoire dans des aires cérébrales clés de la régulation du CA.

INTRODUCTION

CC BY NC

1. Régulation centrale du comportement alimentaire et du poids corporel

La régulation du CA et du poids corporel est assurée par des systèmes neuraux distribués dans tout le SNC. La redondance de ces systèmes et la complexité de ce processus – conservé et amélioré durant l'évolution – illustrent l'importance biologique de garantir des niveaux d'adiposité appropriés.

Pour réaliser une régulation fine de la balance énergétique, les différents systèmes impliqués intègrent un grand nombre d'indices cognitifs, hédoniques, émotionnels et homéostatiques : la disponibilité en nourriture, la nature « palatable » de la nourriture, l'odeur et le goût des aliments, les sensations de faim/satiété à court-terme, des signaux liés directement aux nutriments (glucose,…) et les signaux d'adiposité (pour une régulation à long-terme) par exemple (figure 1).

L'intégration de ces signaux entraîne des « évènements » comportementaux, autonomiques et endocrines qui adaptent le comportement alimentaire à l'état métabolique de l'individu, à court- et long-terme. Cependant, d'autres facteurs, de nature différente, sont capables d'influencer ces systèmes, qu'ils soient environnementaux, génétiques, épigénétiques…

Selon la nature des informations (métaboliques, cognitives…) reçues au niveau central et l'aspect « temporel » de la régulation du comportement alimentaire envisagé (à court- ou long-terme), les aires cérébrales impliquées sont différentes. L'aspect homéostatique/métabolique de la régulation du CA fait appel majoritairement à l'hypothalamus et au tronc cérébral alors que les aspects cognitifs, hédoniques, émotionnels, impliquent surtout les circuits cortico- et méso-limbiques de récompense.

1.1. Régulation hédonique du comportement alimentaire par le système limbique

L'approvisionnement et l'ingestion de nourriture sont essentiels pour la survie et la procréation dans toutes les espèces. De ce point de vue, il est donc intéressant que la recherche et la consommation de nourriture soient des comportements motivés, dirigés vers un but. La consommation de nourriture et la nourriture elle-même sont de puissants stimuli naturels de récompense. C'est pour cela que les signaux environnementaux associés à la nourriture acquièrent, à travers l'apprentissage et la mémoire (« learning » Berridge and Robinson, 2003; Berridge et al., 2009), des propriétés incitatrices et/ou de récompense.

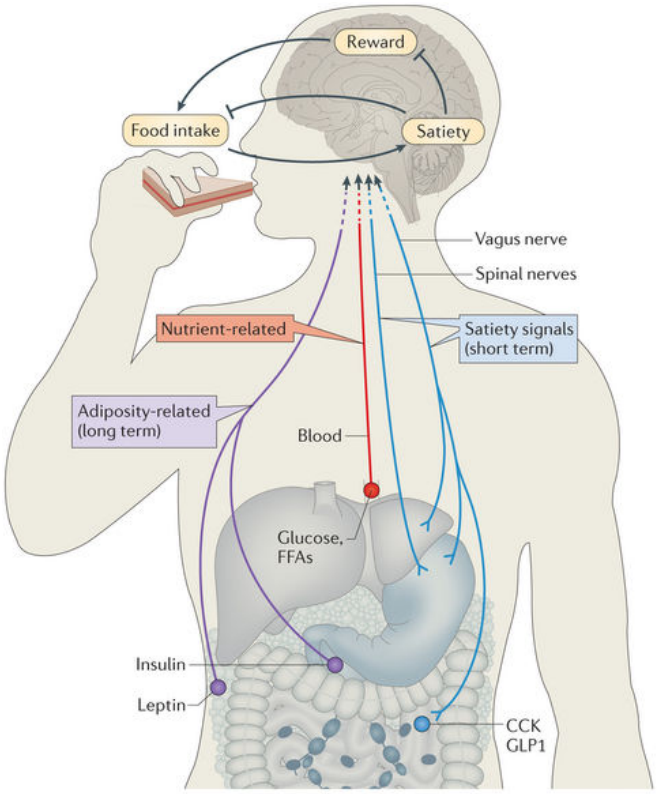


Figure 1. Intégration de signaux périphériques et régulation de l'homéostasie énergétique par le système nerveux central (d'après Morton et al., 2014). Le système nerveux central (SNC) intègre des signaux depuis les tissus stockant l'énergie à long-terme (en violet ; ex. : la leptine depuis le tissu adipeux (TA)) ainsi que des signaux à court-terme liés au repas (nutriments (en rouge) et signaux de satiété viscéraux (en bleu)) afin de réguler la prise alimentaire et la dépense énergétique de manière à maintenir des stocks de masse grasse corporelle stables et adaptés au cours du temps. Une balance énergétique positive induite par une surconsommation de nourriture inhibe les propriétés de récompense attachées à la nourriture et favorise au contraire la satiété induite par le repas, réduisant ainsi la prise alimentaire. En réponse à une déprivation énergétique, les réponses adaptatives du SNC sont engagées pour augmenter les propriétés de récompense de la nourriture et réduire la réponse aux signaux de satiété, résultant collectivement à une augmentation de la prise alimentaire jusqu'à ce que les stocks de masse grasse soient revenus à un niveau adéquat. *CCK,* cholécystokinine ; *FFAs,* acides gras libres (« free fatty acids ») ; *GLP1,* glucagon-like peptide 1.

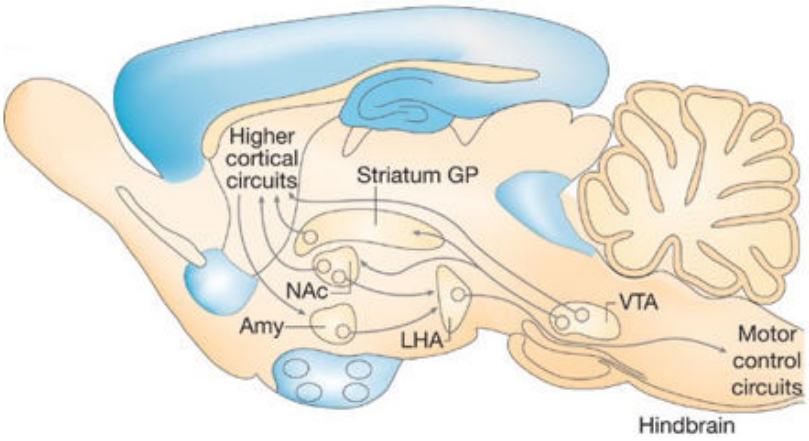


Figure 2. Modèle d'intégration des signaux liés à la récompense - Circuit cérébral de la récompense (d'après Morton et al., 2006). La composante hédonique de la régulation de la prise alimentaire est modulée par des paramètres extérieurs non schématisés ici (odorat, vue, goût, stress…). Les neurones de l'aire tegmentale ventrale (VTA) projettent vers des aires du prosencéphale comme le noyau accumbens (NAc) ou le striatum où ils libèrent de la dopamine. Les neurones de la VTA et du striatum peuvent aussi projeter vers des aires corticales supérieures. Des signaux descendants sont alors émis par le cortex vers des structures comme l'amygdale (Amy). De cette manière, une valeur de récompense peut être associée à une nourriture palatable et les neurones de l'Amy et du NAc projettent alors vers l'hypothalamus latéral (LHA) pour influencer la prise alimentaire. *Amy,* amygdale ; *GP,* globus pallidus ; *NAc,* noyau accumbens ; *VTA,* aire tegmentale ventrale (« ventral tegmental area »).

L'information à propos des propriétés physiques de la nourriture (ex. odeur, couleur, goût, texture et température) et les contextes sociaux associés à l'action de manger est transmise *via* des voies sensorielles polymodales, à plusieurs structures du cerveau.

La perception de la récompense liée à la nourriture commence avec la génération d'une information par des cellules orales réceptrices du goût, qui est ensuite transmise au noyau du tractus solitaire (NTS) par des fibres sensorielles afférentes. Depuis le NTS, l'information relative au goût est transportée à divers sites dans le rhombencéphale (par ex. le noyau parabrachial), le mésencéphale (aire tegmentale ventrale (ATV)) et le prosencéphale (ex. noyau accumbens (NAc), striatum, thalamus, cortex,…) (Kelley et al., 2005), qui sentent et discernent collectivement les goûts et les textures, leur assignant une valeur de récompense (figure 2). Le traitement supérieur des informations de goût chez les Primates implique les neurones primaires du goût dans le cortex insulaire qui reçoivent leurs informations depuis les neurones du NTS, *via* le thalamus. Les neurones primaires projettent vers des neurones secondaires du goût dans le cortex orbitofrontal qui intègrent l'information du goût avec des entrées olfactives, visuelles et cognitives pertinentes (Rolls, 2005). La réponse de ces dernières cellules aux stimuli gustatifs est décrite comme dépendant de l'état de faim, dans le sens où elle diminue la prise alimentaire quand l'individu a mangé, suggérant que ces neurones ont une capacité à intégrer l'information gustative avec des entrées liées à la satiété (voire à l'adiposité) (Rolls, 2005). Ainsi, une diminution de la décharge de ces neurones secondaires diminue la valeur de récompense des aliments, et contribue ainsi à l'arrêt d'un repas *via* des projections vers le striatum et l'amygdale, des aires cérébrales liant la valeur émotionnelle nécessaire à l'engagement moteur dans ce comportement (Kringelbach et al., 2003) car en effet, le cortex orbitofrontal et insulaire sont des structures neurales clés contrôlant les expériences psychologiques et émotionnelles sur le plaisir procuré par des nourritures palatables (aimer, « liking »), alors que les structures limbiques sous-corticales (ex. amygdale, ATV, NAc) traitent la valence incitatrice d'aliments et des indices liés aux aliments, et contrôlent les aspects motivationnels pour la nourriture (vouloir, « wanting ») (Berridge and Kringelbach, 2015; Berridge and Robinson, 2003; Berridge et al., 2009; Berthoud, 2012).

Il serait intéressant de déterminer si l'activité des neurones secondaires dans le cortex orbitofrontal est sensible à la satiété et à l'adiposité ou encore si cela est suffisant pour expliquer la stimulation hédonique du comportement alimentaire.

Les signaux alimentaires et les indices liés à la nourriture sont détectés par de multiples circuits sensoriels et transmis au système de récompense cortico-limbique. Ce système intègre l'information à la fois sur le caractère palatable des aliments et sur l'environnement

social lié aux aliments pour générer une perception du goût des aliments et l'appréciation psychologique des aliments palatables (Berthoud, 2011, 2012).
Le système de récompense mésolimbique dopaminergique, qui a été largement décrit dans l'addiction aux drogues, joue un rôle-clé dans la transformation d'un penchant subjectif au désir pour un aliment palatable (Berthoud, 2011, 2012).
Les propriétés hédoniques et incitatives de la nourriture et des indices liés à la nourriture entraînent des activités anticipatoires et l'initiation de la prise alimentaire (Rui, 2013).
Dans la période d'ingestion, l'odeur, le goût et les signaux de texture sont transmis au cerveau cognitif et émotionnel et maintiennent le comportement alimentaire (Rui, 2013).

1.2. Régulation homéostatique du comportement alimentaire

La régulation homéostatique du CA implique majoritairement, au niveau central, des circuits neuraux de l'hypothalamus et du tronc cérébral et se fait à deux échelles de temps différentes : à court- (repas par repas) et à long-terme (en fonction des stocks corporels d'énergie).
L'hypothalamus est à la fois impliqué dans la régulation homéostatique à court- et long-terme, alors que le tronc cérébral est, lui, majoritairement impliqué dans celle à court-terme.

1.2.1. Le tronc cérébral

Les neurones du tronc cérébral contribuent de manière importante au contrôle de la balance énergétique en intégrant des informations à propos du statut énergétique à quatre niveaux différents : i) en détectant des métabolites circulants et d'hormones libérées par des organes périphériques ; ii) en recevant des entrées vagales depuis le tractus gastro-intestinal (GI) ; iii) en recevant des projections neuronales depuis des noyaux du mésencéphale et du prosencéphale qui détectent et intègrent eux-mêmes des signaux relatifs au statut énergétique et iv) en projetant vers des circuits locaux du tronc cérébral et d'autres régions cérébrales qui intègreront les informations pour participer au contrôle de la balance énergétique (Schneeberger et al., 2014).
Au sein du tronc cérébral, le complexe dorso-vagal (CDV) est un module clé dans l'intégration des indices liés au statut énergétique en relayant des signaux périphériques via des afférences vagales et en projetant dans l'hypothalamus et d'autres aires importantes dans la régulation de la balance énergétique. Le CDV comprend le noyau moteur dorsal du nerf vague (DMV), le NTS et l'area postrema (AP), qui sont accessibles aux signaux périphériques, puisque la barrière hémato-encéphalique (BHE) y est « incomplète » (Schneeberger et al., 2014).

Le tronc cérébral est constitué de populations neuronales hétérogènes, aux propriétés biophysiques et neurochimiques distinctes, qui expriment des modulateurs d'appétit tels que la TH (tyrosine hydroxylase), le pro-glucagon, le neurotransmetteur GABA (acide γ-aminobutyrique, « γ-aminobutyric acid »), le facteur neurotrophique BDNF (« brain-derived neurotrophic factor ») et les peptides CART (« cocaine- and amphetamine-regulated transcript »), NPY (neuropeptide Y) et α-MSH (« α-melanocyte stimulating hormone », issue du clivage de la POMC (pro-opiomélanocortine)), entre autres. Il est intéressant de noter l'existence de circuits locaux contribuant à la régulation des comportements ingestifs : en effet, les neurones du tronc cérébral expriment aussi des récepteurs de certains modulateurs d'appétit qu'ils produisent. De plus, les neurones du tronc cérébral et les afférences vagales projetant vers le tronc cérébral ont aussi été montrés comme exprimant des récepteurs de certaines hormones et peptides circulants comme la leptine, la ghréline, le GLP-1 (« glucagon-like peptide-1 »), la CCK (cholécystokinine)…

La signalisation vagale depuis le tractus GI représente une afférence importante vers le NTS et transporte des informations à propos de la distension luminale, du contenu nutritionnel et des peptides produits localement, par transmission glutamatergique (Travagli et al., 2006).

Les informations vagales sensorielles et hormonales sont assimilées par d'autres neurones du NTS projetant vers l'hypothalamus et d'autres aires du prosencéphale pour élaborer des sorties précises et appropriées. La stimulation chronique ou aiguë du nerf vague chez le rat induit une perte de poids et de la prise alimentaire, indiquant que les afférences directes du nerf vague influencent le CA (Gil et al., 2011; Krolczyk et al., 2001). Il apparaît aussi que la signalisation vagale joue un rôle important dans la régulation de la taille et de la durée des repas (Schwartz et al., 1999).

De plus, le NTS reçoit aussi des entrées depuis des projections descendantes de l'hypothalamus qui participent aussi à la régulation de la taille et de la durée des repas en fonction des signaux d'adiposité notamment.

1.2.2. L'hypothalamus

L'hypothalamus est une structure cérébrale anatomiquement complexe. En effet, il comprend plusieurs populations neuronales distinctes, condensées en noyaux. Or, des études « lésionnelles » menées dans les années 1940-1950 ont démontré le rôle majeur global de l'hypothalamus dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique, mais aussi, de manière plus précise, de ses différents noyaux, qui peuvent avoir parfois des rôles opposés.

L'hypothalamus peut-être anatomiquement divisé en aires, en régions et en noyaux pairs (figures 3 et 4).

Durant ma thèse, je me suis principalement intéressée aux circuits neuropeptidergiques du noyau arqué (ARC, « arcuate nucleus ») et de l'hypothalamus latéral (LHA ; « lateral hypothalamic area ») (figure 4). La limite médiane du LHA est le tractus mammillo-thalamique et la colonne antérieure du fornix, et sa limite latérale est la caspule interne et la région subthalamique. Le LHA contient entre autres le noyau tubéromammillaire et le noyau latéral tubéral.

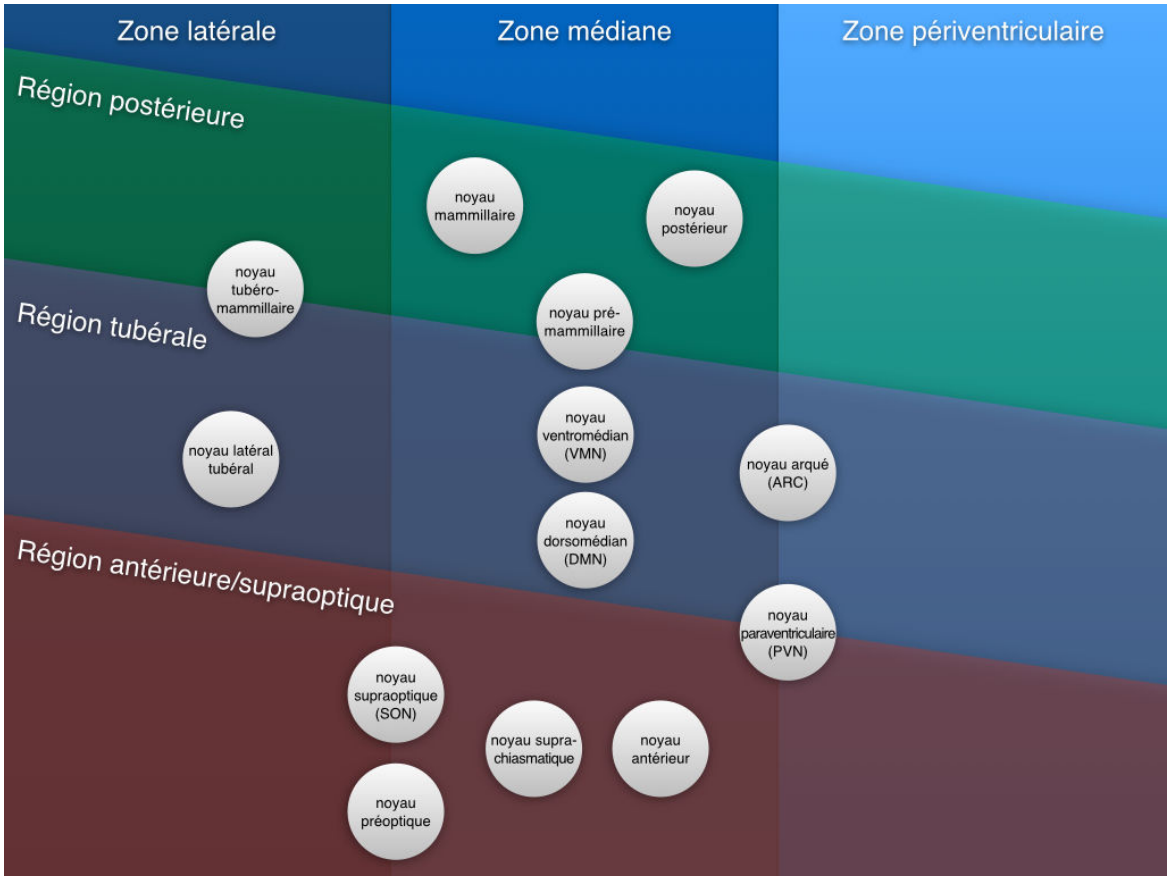


Figure 3. Zones, régions et aires hypothalamiques. L'hypothalamus peut être subdivisé en 3 zones, périventriculaire (proche du troisième ventricule), médiane et latérale et en 3 régions, de manière rostro-caudale, antérieure, tubérale et postérieure. L'hypothalamus contient plusieurs noyaux (pairs) répartis dans les différentes zones et régions. Certains noyaux se trouvent à cheval sur plusieurs zones et/ou aires. *ARC,* noyau arqué ; *DMN,* noyau dorso-médian ; *PVN,* noyau paraventriculaire

- ***Le noyau arqué***

L'ARC est un noyau très important du SNC impliqué dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Il est localisé en-dessous du noyau ventro-médian (VMN, « ventromedial nucleus »), de part et d'autre du troisième ventricule (3V), et en contact immédiat avec l'éminence médiane (EM). On a longtemps considéré que ce noyau est doté d'une BHE semi-perméable (Broadwell and Brightman, 1976), et est ainsi positionné de manière

stratégique pour percevoir les fluctuations hormonales et en termes de nutriments dans la circulation sanguine. Depuis, il a été démontré que la perméabilité dont peut faire preuve la BHE, notamment dans cette zone particulière, est un phénomène dynamique, régulé par des signaux intra-et inter-cellulaires. Par exemple, Langlet et ses collaborateurs ont montré qu'une baisse de la glycémie entraînait une réorganisation de la barrière sang-hypothalamus pour la rendre plus perméable et faciliter ainsi l'accès des substrats métaboliques au niveau de l'ARC (Langlet et al., 2013). Dans l'ARC, il y a au moins deux populations majeures de neurones contrôlant l'appétit et les dépenses énergétiques, que l'on qualifie de « premier ordre », car ce sont les premiers neurones à intégrer toutes sortes de signaux périphériques donnant des informations sur l'état métabolique d'un individu : un sous-ensemble de neurones co-exprimant les peptides orexigènes NPY et AgRP (« agouti-related peptide »), que l'on appellera les neurones à NPY/AgRP et un sous-ensemble de neurones co-exprimant les peptides anorexigènes α-MSH et CART, que l'on appellera les neurones à POMC/CART.

Ces deux populations de neurones, en association avec des neurones cibles en aval exprimant les récepteurs aux mélanocortines MC3R (« melanocortin 3 receptor ») et MC4R (« melanocortin 4 receptor »), constituent le système mélanocortine central. Celui-ci est crucial pour la détection et l'intégration d'un certain nombre de signaux émanant de la périphérie, permettant un contrôle précis de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques.

Le NPY est largement exprimé à travers le SNC, mais c'est dans l'ARC qu'il est le plus densément exprimé (Gehlert et al., 1987). L'expression et la libération du NPY depuis l'ARC répond à des modifications du statut énergétique : elles sont réduites en conditions de prise alimentaire alors qu'elles augmentent lors d'un jeûne (Beck et al., 1990; Kalra et al., 1991). Une augmentation pharmacologique du tonus NPY résulte en une hyperphagie et une thermogénèse réduite du tissu adipeux brun, le tout associé à une diminution de l'activité de l'axe thyroïdien (Clark et al., 1984; Egawa et al., 1991; Stanley et al., 1986). Bien que le NPY puisse agir *via* 5 récepteurs différents (Y1, Y2, Y4, Y5 et Y6), des études génétiques et pharmacologiques suggèrent que les récepteurs Y1 et Y5 post-synaptiques soient responsables des effets de NPY vers une balance énergétique positive (Nguyen et al., 2012; Sohn et al., 2013).

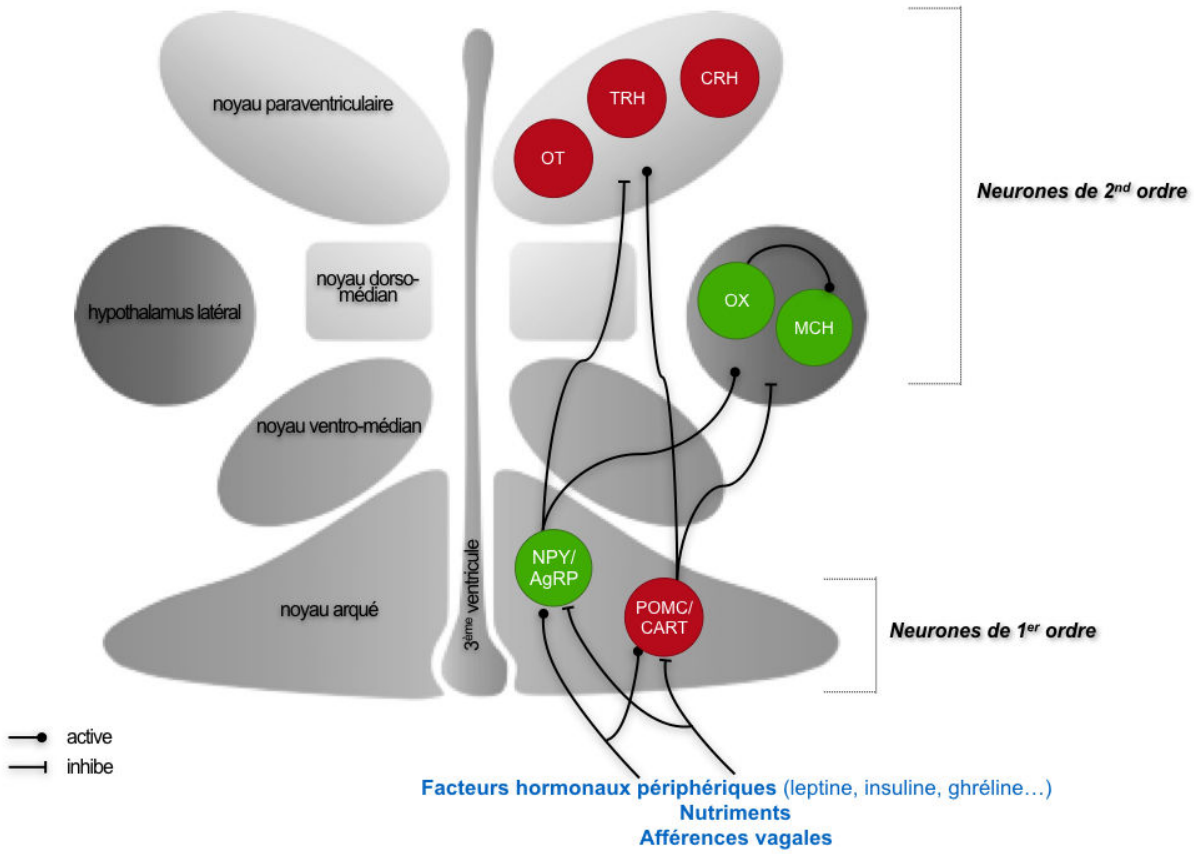


Figure 4. Régulation homéostatique du comportement alimentaire : schéma simplifié résumant les réseaux neuropeptidergiques hypothalamiques impliqués. Des signaux donnant des indications sur le statut énergétique d'un organisme sont émis depuis la périphérie et sont intégrés dans un premier temps par des neurones de premier ordre situés dans le noyau arqué, produisant soit des neuropeptides orexigènes (NPY et AgRP), soit des peptides anorexigènes (POMC et CART). Ces neurones projettent vers des neurones de second ordre dans le noyau paraventriculaire (produisant les facteurs anorexigènes oxytocine (OT), (TRH) et (CRH)) et dans l'hypothalamus latéral (produisant les peptides orexigènes orexine (OX) et melanin-concentrating hormone (MCH)). L'intégration des signaux périphériques par ces systèmes neuropeptidergiques participent à la régulation homéostatique du CA et au maintien d'un poids adapté.

L'AgRP est aussi un neuropeptide orexigène qui est lui exclusivement exprimé dans l'ARC, où il co-localise avec NPY, comme mentionné précédemment, ainsi qu'avec le neurotransmetteur GABA (Broberger et al., 1998; Cowley et al., 2001). L'administration centrale de l'AgRP ou sa surexpression génétique stimulent la prise alimentaire, réduisent les dépenses énergétiques et entraînent une obésité (Graham et al., 1997; Ollmann et al., 1997; Small et al., 2003). De manière intéressante, il semble que l'administration de l'AgRP ait des effets soutenus dans le temps (plusieurs jours ; (Hagan et al., 2000)).

Les neurones NPY/AgRP expriment des récepteurs permettant d'intégrer les signaux transmis par les hormones périphériques, telles que l'insuline (Marks et al., 1990), la leptine (Elmquist et al., 1998) ou la ghréline (Willesen et al., 1999). Dans l'hypothalamus, ces neurones projettent majoritairement vers le PVN (noyau paraventriculaire ; « paraventricular nucleus »), le DMN (noyau dorso-médian, « dorsomedial nucleus ») et le LHA (figure 4). Les neurones NPY/AgRP de l'ARC projettent aussi vers des aires extra-hypothalamiques telles que le noyau parabrachial, l'ATV ou le noyau du lit de la strie terminale (Palmiter, 2012; Sternson and Atasoy, 2014). Malgré les effets, bien documentés, exercés par NPY et AgRP

en tant que modulateurs positifs de la balance énergétique, des études génétiques ont abouti à des résultats parfois contradictoires. Par exemple, aucune altération du poids ou du comportement alimentaire n'a été observée chez les souris déficientes pour *Agrp* ou *Npy* (Corander et al., 2011; Palmiter et al., 1998; Qian et al., 2002). Cependant, l'ablation des neurones à AgRP chez les adultes induit une anorexie incontrôlée mais est tolérée chez les nouveau-nés, indiquant l'existence de compensations développementales (Bewick et al., 2005; Gropp et al., 2005; Luquet et al., 2005). De façon surprenante, il a été montré que l'ablation spécifique des neurones à NPY/AgRP chez la souris affecte l'équilibre du métabolisme des lipides et des glucides, induisant le développement d'une obésité associée à une hyperinsulinémie sous régime normal, mais au contraire un poids corporel réduit et une amélioration de la tolérance au glucose sous HFD (high-fat diet ; HFD). Ces résultats suggèrent un rôle des neurones à NPY/AgRP dans la coordination de l'activité des organes efférents et dans la répartition des nutriments (Joly-Amado et al., 2012). Par ailleurs, une étude récente a démontré l'importance des neurones à NPY/AgRP dans l'induction de la prise alimentaire en présence de nourriture standard, mais que la consommation d'une nourriture palatable (régime hyperlipidique et hyperglucidique) ne nécessite pas leur action. Chez les souris, interférer avec l'activité de ces neurones induit une surconsommation de nourriture palatable et une hypersensibilité à l'anorexie induite par le stress. Cela sous-entend que les neurones à NPY/AgRP permettent d'assurer une prise alimentaire « homéostatique » et à surpasser la composante de récompense et émotionnelle (Denis et al., 2015).

Le CART est largement exprimé dans le cerveau, mais l'est plus particulièrement dans l'hypothalamus. Dans l'ARC, le CART colocalise avec la POMC (Elias et al., 1998). Son expression est augmentée en conditions de prise alimentaire et réduite en conditions de jeûne (Kristensen et al., 1998). Des études ont montré que l'infusion intracérébroventriculaire (ICV) de CART inhibe la prise alimentaire, alors que des anticorps anti-CART produisent l'effet inverse (Kristensen et al., 1998). De plus, le CART stimulerait aussi la thermogenèse du tissu adipeux brun (Wang et al., 2000). Cependant, des souris déficientes pour *Cartpt* ne montrent pas d'altérations au niveau de la prise alimentaire ou du poids lorsqu'elles sont nourries avec un régime standard, mais développent une obésité sous régime hyperlipidique (Asnicar et al., 2001). De façon intéressante, et au contraire des a priori considérant le CART comme anorexigène, d'autres études ont montré qu'en se plaçant dans certaines conditions expérimentales, le CART pourrait au contraire stimuler la prise alimentaire (Abbott et al., 2003; Kong et al., 2003). De manière générale, les résultats concernant les effets du CART sur le comportement alimentaire sont non-concluants et

semblent souligner des rôles différents, pour ce neuropeptide, en fonction de la localisation anatomique des neurones exprimant celui-ci (par exemple, les neurones co-exprimant la « melanin-concentrating hormone » (MCH) et le CART dans le LHA).

La POMC est une prohormone soumise à un clivage en plusieurs peptides bioactifs dans l'hypothalamus, dont l'α-MSH, qui exerce des effets anorexigènes puissants par liaison aux MC3R et MC4R (Mercer et al., 2013). Les niveaux de transcrits de la POMC et de l'α-MSH augmentent en conditions de prise alimentaire et diminuent en conditions de jeûne (Schwartz et al., 1997). L'administration d'α-MSH dans le ventricule, ou directement dans le PVN, supprime la prise alimentaire et diminue le poids (Poggioli et al., 1986; Wirth et al., 2001). Par ailleurs, la surexpression génétique du gène *Pomc* entraîne la surexpression de l'α-MSH, ce qui induit des effets anti-obésité chez des modèles d'obésité génétiques ou induits par l'alimentation (Lee et al., 2007; Mizuno et al., 2003; Savontaus et al., 2004). Un rôle-clé de la POMC dans l'homéostasie énergétique est évident. En effet, les souris dépourvues du gène *Pomc*, ou n'exprimant pas les peptides mélanocortines, ou encore auxquelles il manque les neurones à POMC, développent toutes une obésité (Gropp et al., 2005; Smart et al., 2006; Xu et al., 2005a; Yaswen et al., 1999). De plus, des mutations génétiques de *Pomc* ont été associées à des cas d'obésité morbide chez l'Homme (Krude et al., 1998; Lee et al., 2006). On sait qu'il existe des sous-populations de neurones à POMC, GABAergiques et glutamatergiques, mais leurs rôles fonctionnels n'ont pas encore été éclaircis (Mercer et al., 2013). Les neurones à POMC projettent notamment vers le PVN, le DMN, le LHA mais aussi le CDV.

- ***Le noyau paraventriculaire***

Le noyau paraventriculaire (PVN) est localisé dans l'hypothalamus antérieur, directement au-dessus du 3V, et exprime des niveaux élevés de MC3R et MC4R, récepteurs de l'α-MSH. Ce noyau reçoit des projections depuis les neurones NPY/AgRP et POMC/CART de l'ARC, mais aussi depuis des régions extrahypothalamiques, telles que le NTS. Le PVN est un site important d'intégration impliqué dans l'homéostasie énergétique du corps, comme illustré par les entrées afférentes diverses qu'il reçoit et sa haute sensibilité à l'administration de neuropeptides impliqués dans la prise alimentaire comme le NPY, l'AgRP et l'α-MSH, entre autres (Kim et al., 2000; Stanley et al., 1986). Une partie de ces effets fait appel à un sous-ensemble de neurones exprimant l'hormone thyréotrope (« thyrotropin-releasing hormone », TRH), qui sont activés par l'α-MSH et inhibés par l'AgRP (Fekete et al., 2000; Fekete et al., 2004). Un autre sous-ensemble de neurones intéressant dans ce contexte est celui exprimant la corticolibérine (« corticotrophin-releasing

hormone », CRH), qui est impliqué dans le contrôle de la balance énergétique soit directement par l'innervation AgRP, soit indirectement *via* la régulation des glucocorticoïdes surrénaux qui contrôlent l'expression de POMC (Richard and Baraboi, 2004).

- ***L'hypothalamus latéral***

Le LHA joue un rôle critique dans la médiation des réponses orexigènes, une fonction qui peut être largement attribuée aux neurones dits de « second ordre » produisant les orexines (OX) et la MCH. Les neurones à orexine produisent l'OX-A et l'OX-B issues de la prepro-orexine, dont l'expression augmente en conditions de jeûne (Sakurai et al., 1998). L'administration centrale d'OX non seulement stimule la prise alimentaire (Dube et al., 1999; Sakurai et al., 1998), mais favorise aussi des réponses comportementales associées à la récompense liée à la nourriture (Cason et al., 2010). Les neurones OX projettent non seulement dans le LHA, ARC, PVN, et NTS, mais aussi dans d'autres régions impliquées dans d'autres fonctions physiologiques comme, entre autres, le contrôle de la température corporelle et de l'éveil (Peyron et al., 1998). De manière similaire, le jeûne favorise l'expression des ARNm de MCH et l'administration ICV ou la surexpression génique de MCH peut générer une réponse orexigène (Della-Zuana et al., 2002; Ludwig et al., 2001; Presse et al., 1996; Qu et al., 1996). Au contraire, les souris avec un tonus MCH réduit ou dépourvues du récepteur MCHR1 de la MCH, sont minces (Marsh et al., 2002). Si OX et MCH n'ont pas toujours les mêmes effets sur les différents comportements qu'elles affectent, elles ont la capacité toutes deux de stimuler la prise alimentaire, autrement dit, elles sont orexigènes.

Par ailleurs, les neurones du LHA ne sont pas « limités » à la production de MCH ou d'OX. Il a été montré que certains neurones ont des caractéristiques neurochimiques spécifiques et participent eux aussi à la régulation du métabolisme. Il a été notamment rapporté l'existence d'un sous-ensemble de neurones exprimant la forme longue du récepteur de la leptine (hormone de satiété jouant un rôle majeur dans la régulation centrale de la prise alimentaire), le LepRb (« leptin receptor isoform B »), le MC4R et la neurotensine (neuropeptide impliqué aussi dans la régulation du comportement alimentaire et le système de récompense) (Cui et al., 2012; Leinninger et al., 2011). Ces neurones, GABAergiques, seraient distincts des neurones à MCH et à OX (Leinninger et al., 2009). La leptine a été montrée comme hyperpolarisant les neurones LepRb/MC4R GABAergiques qui ont été rapportés comme pouvant projeter sur les neurones à OX. Ainsi, la leptine pourrait désinhiber les neurones à OX, ce qui serait cohérent avec l'activation de cFos induite par la leptine observée dans les neurones à OX (Cui et al., 2012; Leinninger et al., 2011). Bien que

la neurotensine soit exprimée dans de nombreuses régions cérébrales, c'est seulement dans le LHA qu'elle colocaliserait avec le récepteur à la leptine. La délétion du LepRb spécifiquement dans les neurones à neurotensine a entraîné une activation durable de cFos dans les neurones à OX, accompagnée d'une augmentation du poids et de l'adiposité chez les souris déficientes pour le LepRb dans les neurones à neurotensine, suggérant que l'activation par la leptine de ces derniers est nécessaire au maintien du poids (Leinninger et al., 2009). S'il a été suggéré que la neurotensine activerait les neurones à OX plutôt que de les inhiber (Tsujino et al., 2005), laissant supposer que l'action inhibitrice du GABA en question exercerait un effet dominant sur les neurones à OX, il a été aussi montré par ailleurs que la leptine inhibe les neurones à OX par plusieurs mécanismes indépendants de l'action du GABA (inhibition de la neurotransmission excitatrice présynaptique et l'ouverture des canaux K_{ATP}) (Goforth et al., 2014) et que la leptine inhiberait l'action des OX dans un contexte d'activation des réponses de stress (Bonnavion et al., 2015). Ceci suggèrerait une action dominante de la leptine face à la neurotensine, ou que la leptine inhibe la libération de la neurotensine par les neurones co-exprimant le LepRb et la neurotensine. On notera par ailleurs que la caractérisation des neurones à neurotensine et de leurs actions est compliquée par le fait que la plupart des neurones exprimant la neurotensine sont des neurones à OX.

Cependant, au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée aux neurones à MCH et à OX.

◊ ***La Melanin-concentrating hormone (MCH)***

La MCH est un peptide cyclique hautement conservé chez les Vertébrés. Originellement caractérisée comme un facteur de palissement de la peau chez les téléostéens, chez les poissons, la MCH participe aussi à la régulation de la réponse au stress et au comportement alimentaire et chez les Mammifères, c'est un neuropeptide hypothalamique aux fonctions diverses : principalement le contrôle du comportement alimentaire et de l'homéostasie énergétique, mais aussi la régulation du sommeil, de l'axe du stress, l'émotion et les processus de récompense (Macneil, 2013; Nahon, 2006).

Le précurseur de la MCH peut potentiellement générer des peptides additionnels dans le cerveau et en périphérie mais leurs rôles restent méconnus. Chez les Mammifères, l'épissage alternatif et une transcription anti-sens au locus du gène *Mch* mènent à la production de nouvelles protéines(Adamantidis and de Lecea, 2009; Allaeys et al., 2004). Par ailleurs, il existe des variants du gène *Mch* spécifiques des Primates (Courseaux and Nahon, 2001).

Il existe deux récepteurs de la MCH, MCHR1 et MCHR2 (« MCH receptor 1 » et « MCH receptor 2 », respectivement), tous deux des récepteurs couplés à une protéine G (RCPG). Il est intéressant de noter que si le MCHR1 est exprimé chez tous les Mammifères, le MCHR2 est absent chez les Rongeurs et espèces associées (Macneil, 2013).

Des études ont démontré l'importance de la signalisation de la MCH comme cible thérapeutique potentielle pour le traitement des troubles de l'appétit, l'obésité mais aussi des troubles anxieux et psychiatriques.

La cartographie des neurones immuno-réactifs pour la MCH chez le rat a révélé deux caractéristiques largement conservées chez les Mammifères : i) un regroupement quasi absolu des soma des neurones à MCH dans la subzona incerta, dans le LHA et dans l'aire hypothalamique postérieure ; ii) une distribution étendue des projections des neurones MCH à travers le cerveau, à l'exception notable du cervelet, de la zone externe de l'éminence médiane et de l'hypophyse (figure 5) (Bittencourt, 2011). Il existe des sous-types de neurones à MCH, ceux exprimant seulement la MCH, et ceux co-exprimant avec la MCH par exemple le CART, le récepteur 3 de la neurokinine (NK3 ; « neurokinin receptor 3 ») (Risold et al., 2009). Selon leur type, ils ont des motifs de projection très différents les uns des autres : les neurones exprimant seulement la MCH n'ont presque que des projections descendantes vers la moelle épinière alors que les autres neurones à MCH projettent massivement vers des aires du télencéphale qui reçoivent des entrées MCH ascendantes (Risold et al., 2009).

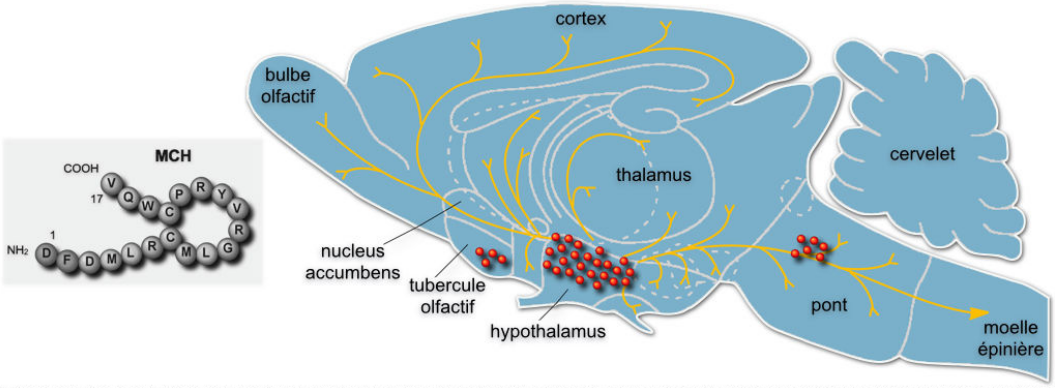


Figure 5. Structure et distribution cérébrale de la MCH chez le rat. A gauche : Structure de la MCH. La MCH est un peptide cyclique. A droite: Coupe sagittale de cerveau de rat. Les points rouges symbolisent les somas des neurones exprimant la MCH et les lignes jaunes symbolisent leurs projections.

Le récepteur MCHR1 est largement et fortement exprimé dans le cerveau de rat, de souris et des Primates, avec une distribution correspondant avec les champs de projection MCH (figure 6). MCHR1 a été montré comme pouvant se coupler à une variété de protéines G (Gαi, Gαo, Gαq), résultant en l'activation putative de plusieurs voies de signalisation (Hawes et al., 2000; Pissios et al., 2003). Il est intéressant de noter que les deux voies de

signalisation de p53 et des MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») contribuent à assurer l'effet de la MCH *via* le MCHR1 sur la croissance des neurites dans les cellules de neuroblastome humain, suggérant que la MCH pourrait jouer un rôle dans la différenciation cellulaire neuronal et dans la plasticité (Cotta-Grand et al., 2009).

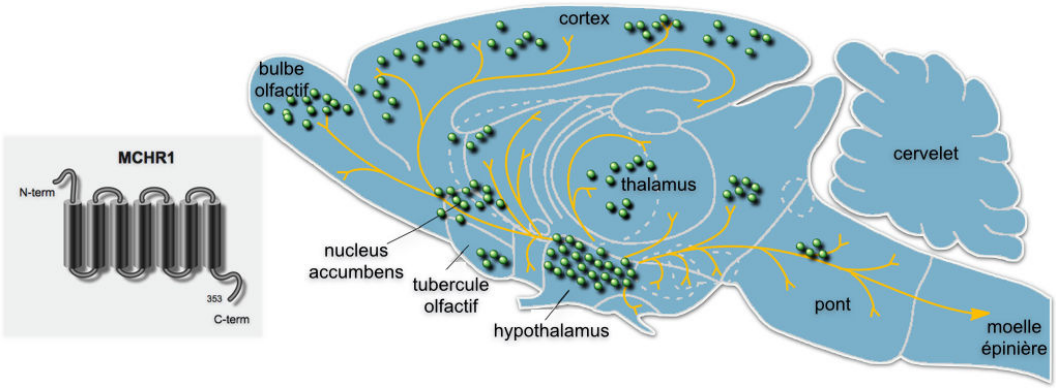


Figure 6. Structure et distribution cérébrale du MCHR1 chez le rat. A gauche : Structure du MCHR1. Le MCHR1 est un récepteur couplé aux protéines G (RCPG), à sept domaines transmembranaires. A droite : Coupe sagittale de cerveau de rat. Les points verts indiquent les aires cérébrales exprimant le MCHR1. Les lignes jaunes symbolisent les projections des neurones exprimant le ligand du MCHR1, la MCH.

Le second récepteur de la MCH, MCHR2, a été identifié chez l'Homme. Le gène *Mchr2*, au contraire du gène *Mchr1* pourrait produire des variants du récepteur par épissage alternatif, qui pourraient mener à des versions tronquées du MCHR2. Il est intéressant de noter que les MCHR1 et MCHR2 humains n'ont qu'une faible identité de séquence (36% seulement), ce qui est assez inhabituel pour des RCPG (récepteurs couplés aux protéines G) liant le même ligand. Ainsi, le gène *Mchr2* est trouvé chez les téléostéens, le chien, le furet et les Primates (y compris chez l'Homme), mais a été perdu sélectivement chez les rongeurs et les lagomorphes (Macneil, 2013; Tan et al., 2002). Compte-tenu des modèles animaux disponibles, cette absence a pu être « utile » pour l'étude MCHR1 mais a empêché la détermination du rôle fonctionnel du MCHR2. Chez les Mammifères, l'expression cérébrale globale du MCHR2 est relativement similaire à celle du MCHR1 (Sailer et al., 2001), mais est davantage restreinte à des régions limbiques, comme l'amygdale médiale et centrale, les cortex enthorinal et temporal, le CA1 de l'hippocampe, et dans une moindre mesure dans l'hypothalamus ventral et le claustrum (An et al., 2001; Tan et al., 2002). Chez les singes, MCHR2 est fortement exprimé dans les noyaux hypothalamiques arqué et ventro-médian (Sailer et al., 2001). Ces différences dans la distribution des deux récepteurs, en particulier chez l'homme, suggèrent qu'ils aient des rôles biologiques distincts, pour assurer le large éventail des effets biologiques de la MCH. On notera que le MCHR2 est aussi exprimé en périphérie dans les adipocytes, le pancréas, l'intestin et la prostate (An et al., 2001). Les voies de signalisation mises en jeu par MCHR2 n'ont été étudiées jusqu'ici que dans des

cellules d'origine mammalienne transfectées et semblent plus restreintes que celles associées à MCHR1 : MCHR2 semble être couplé majoritairement à Gαq.

La MCH, dans le cerveau, a été montrée comme ayant des rôles dans le comportement alimentaire et l'énergie homéostatique, dans la réponse au stress et l'anxiété, dans le système de récompense et mésolimbique par exemple.

Concernant le comportement alimentaire et l'homéostasie énergétique, l'expression cérébrale de la MCH étant dominante, chez les Mammifères du moins, dans le LHA, il a rapidement été suggéré que ce peptide pourrait réguler l'appétit et/ou l'homéostasie énergétique. Et le rôle de la MCH et du MCHR1 a été, depuis, clairement impliqué dans le comportement alimentaire et la balance énergétique (Chung et al., 2011; Forray, 2003; Luthin, 2007; Nahon, 2006; Peyron et al., 2009; Pissios, 2009; Pissios et al., 2006; Qu et al., 1996). Il a été notamment montré que des injections intracérébroventriculaires (ICV) aiguës de MCH stimulent, de manière transitoire, la prise alimentaire chez le rat, un effet orexigène apparemment non associé au NPY ou aux OX, mais qui pourrait être bloqué par l'α-MSH (Della-Zuana et al., 2002; Qu et al., 1996; Shearman et al., 2003). Des injections intrahypothalamiques, mais aussi des études électrophysiologiques, ont identifiés le PVN, le VMH et l'ARC comme cibles principales de la MCH (Abbott et al., 2003). De manière intéressante, la MCH stimule aussi la consommation hydrique, indépendamment de ses actions sur la prise alimentaire et sur l'osmolalité de l'eau (Clegg et al., 2003). Par ailleurs, l'infusion chronique de MCH chez le rat ou la souris induit une hyperphagie et un gain de poids, particulièrement avec un régime modérément enrichi en lipides (Gomori et al., 2003). De plus, des injections chroniques, chez les rongeurs, d'agonistes du MCHR1, induisent les mêmes effets sur la prise alimentaire et/ou mènent de la même façon à un phénotype obèse que les injections de MCH (Macneil, 2013). L'administration centrale d'antagonistes de MCHR1 mène à une réduction durable de l'appétit, du poids et du stockage de graisses, sans altération de la masse maigre (Macneil, 2013). Les études de modèles murins génétiquement modifiés ont aussi montré un rôle important des gènes *Mch* et *Mchr1* dans l'appétit, et surtout dans le métabolisme énergétique. En effet, la surexpression du gène *Mch* entraîne chez la souris une hyperphagie, une obésité modérée et une résistance à l'insuline sous régime standard ou hyperlipidique (Ludwig et al., 2001). A l'inverse, la déficience en MCH induit un phénotype mince associé à une hypophagie et à une augmentation de l'oxygène consommé, des effets largement dépendants du fond génétique et du régime alimentaire (Alon and Friedman, 2006; Kokkotou et al., 2005; Segal-Lieberman et al., 2003; Shimada et al., 1998; Zhou et al., 2005). La réduction de la masse grasse obtenue chez des souris déficientes à la fois pour la MCH et la leptine (croisement de souris

déficientes pour la MCH et de souris *ob*/*ob*) n'est pas induite par des changements du comportement alimentaire (l'hyperphagie persiste) mais des améliorations dans la régulation de la dépense énergétique (augmentation de l'activité locomotrice et du taux métabolique de base) (Alon and Friedman, 2006). Les souris déficientes en MCHR1 sous régime contrôle présentent un phénotype mince associé à la fois à une hyperphagie et à un métabolisme énergétique augmenté. De plus, en accord avec leur hyperactivité, les souris déficientes pour le MCHR1 résistent à l'obésité induite par un régime hyperlipidique (Chen et al., 2002; Marsh et al., 2002; Zhou et al., 2005).

De manière générale, des études pharmacologiques et les modèles animaux ont montré que la MCH et son récepteur MCHR1 jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'homéostasie énergétique en augmentant la prise alimentaire et régulant particulièrement la dépense énergétique et la thermogenèse chez les Mammifères.

On ajoutera par ailleurs que l'augmentation du niveau circulant de glucose, qui aurait lieu après un repas, augmente l'activité des neurones à MCH (Burdakov et al., 2005; Kong et al., 2010), ce qui pourrait contribuer à faire perdurer la consommation d'une nourriture actuellement consommée.

On notera par ailleurs que parmi les rôles de la MCH, il y a aussi la régulation du sommeil. La MCH a été liée avec le sommeil paradoxal. Les neurones à MCH déchargent principalement durant le sommeil paradoxal ou REM (« rapid-eye movement ») et occasionnellement durant le sommeil à ondes lentes (Hassani et al., 2009). De plus, l'injection de la MCH dans les ventricules latéraux augmente la quantité de sommeil REM et à ondes lentes (Verret et al., 2003), alors que les souris déficientes pour la MCH ou pour le MCHR1 montrent un niveau accru d'éveil (Ahnaou et al., 2011; Willie et al., 2008).

◊ ***Les orexines (OX)***

Les OX A et B, ou hypocrétines 1 et 2 respectivement, sont issues du clivage d'un précurseur de 130 acides aminés, la pré-pro-orexine qui a été isolée par deux groupes de recherche en 1998 (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Les neurones contenant les ARNm d'OX sont seulement trouvés dans l'hypothalamus, depuis le DMN, à travers l'aire périfornicale et dans le LHA (de Lecea et al., 1998; Sakurai et al., 1998). Ce peptide a immédiatement été reconnu comme ayant la capacité à stimuler la consommation de nourriture, d'où son nom, tiré du mot grec pour « appétit », *orexis* mais son rôle principal est lié à la régulation du cycle veille/sommeil.

Les récepteurs des OX sont eux-aussi des RCPG. Il en existe deux, l'OX1R et l'OX2R (« OX receptor 1 » et « OX receptor 2 », respectivement). L'OX1R a une affinité pour l'OX-A 2 à 3

fois supérieure à celle pour l'OX-B alors que le récepteur OX2R lie les deux formes avec la même affinité. La liaison à ces récepteurs induit une excitation neuronale, avec augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+}, avec l'OX1R activant la sous-unité Gq et l'OX2R activant les sous-unités Gq et Gi/o.

Les soma OX ont été montrés comme largement restreints à l'hypothalamus (Nambu et al., 1999) (figure 7). Les neurones OX projettent dans de nombreuses aires cérébrales où projettent aussi les neurones MCH, expliquant sûrement, du moins en partie, pourquoi ils affectent les mêmes comportements. Parmi les aires cérébrales où projettent les neurones OX, on trouve le locus cœruleus, l'hippocampe, le thalamus, le NAc, l'ATV, l'amygdale, le cortex et des noyaux hypothalamiques (Bittencourt et al., 1992; Peyron et al., 1998). Il est intéressant de noter que les récepteurs de l'OX et de la MCH sont aussi exprimés dans les mêmes aires cérébrales (Marcus et al., 2001; Saito et al., 2001) (Figure 6). De manière intéressante, si les récepteurs des OX sont souvent trouvés dans les mêmes aires, au sein d'une même aire, chacun prédomine dans une zone donnée : par exemple, l'OX1R est très exprimé dans l'hypothalamus antérieur ; de manière éparse dans le LHA, et absent de l'ARC et du PVN alors que l'OX2R est éparse dans l'hypothalamus antérieur et dense dans le LHA, l'ARC et le PVN (Marcus et al., 2001).

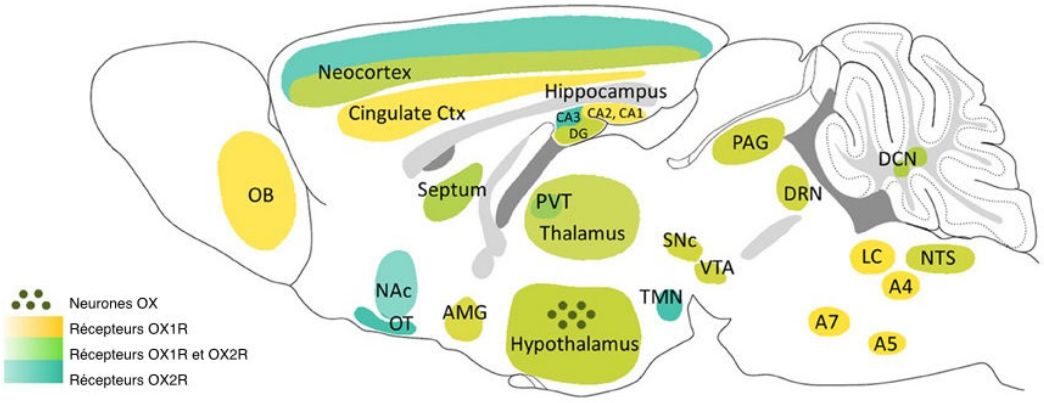


Figure 7. Distribution cérébrale des neurones OX et des récepteurs OX1R et OX2R chez la souris (adapté de Flores et al., 2013). Coupe sagittale de cerveau de souris. *A4, A5, A7,* groupes de cellules du pont ; *AMG,* amygdale ; *CPu,* caudate putamen ; *Ctx,* cortex ; *DCN,* noyaux cérébelleux profonds (« deep cerebellar nuclei ») ; *DRN,* noyau dorsal du raphé (« dorsal raphe nucleus ») ; *GP,* globus pallidus ; *LC,* locus coeruleus ; *NAc,* nucleus accumbens ; *NTS,* noyau du tractus solitaire ; *OB,* bulbe olfactif (« olfactory bulb ») ; *OT,* tubercule olfactif (« olfactory tubercle ») ; *PAG,* substance grise périaqueductale (« periaqueductal gray ») ; *PVT,* noyau paraventriculaire du thalamus (« paraventricular nucleus of thalamus ») ; *SNc,* substantia nigra pars compacta ; *SNr,* substantia nigra pars reticulata; *TMN,* noyau tubéromamillaire (« tuberomammillary nucleus ») ; *VTA,* aire tegmentale ventrale (« ventral tegmental area »).

La décharge des neurones OX est associée à l'éveil dans le cycle veille-sommeil. En effet, au contraire des neurones à MCH, ces neurones déchargent durant l'éveil, ont une activité réduite, voire nulle, durant les divers phases de sommeil, et recommencent à décharger lors de la transition sommeil à éveil (Lee et al., 2005; Takahashi et al., 2008). Ils peuvent décharger durant le sommeil si un stimulus favorisant l'éveil est présenté (Mileykovskiy et

al., 2005; Takahashi et al., 2008). De plus, l'injection d'OX dans les ventricules latéraux augmente l'éveil et diminue le sommeil à ondes lentes et le sommeil REM (Espana et al., 2001).

Concernant la régulation de la balance énergétique, l'injection ICV d'OX augmente la consommation d'oxygène et la surexpression de la pré-pro-orexine chez la souris permet de résister au développement d'une obésité nutritionnelle, par augmentation de la dépense énergétique et diminution de la consommation de graisses (Funato et al., 2009). Il semble par ailleurs que cette promotion de la dépense énergétique par les OX dépende de l'OX2R seulement (Funato et al., 2009).

L'activité des neurones OX est régulée par le statut énergétique, notamment par les niveaux de glucose : une augmentation physiologique des niveaux de glucose, comme après un repas, inhibe l'excitabilité électrique des neurones OX dans le LHA (Burdakov et al., 2005; Burdakov et al., 2006; Guyon et al., 2009).

Comme mentionné précédemment, les OX sont connues pour être impliquées dans la régulation de la prise alimentaire. En effet, comme la MCH, ces peptides sont orexigènes. Les OX favoriseraient la prise alimentaire en augmentant la recherche et la motivation à rechercher de la nourriture palatable. L'injection centrale d'OX-A dans les ventricules latéraux, le PVN, le LHA, l'aire périfornicale ou la coquille du NAc peut induire la consommation de nourriture de laboratoire standard (Dube et al., 1999; Edwards et al., 1999; Schneider et al., 2007; Sweet et al., 1999; Thorpe and Kotz, 2005; Zhu et al., 2002). Les effets des OX sur la prise alimentaire semblent dépendre majoritairement de l'OX-A et de l'OX1R. Il est intéressant de noter que les effets orexigènes des OX sont bien plus forts et robustes avec de la nourriture palatable. Par ailleurs, l'injection d'OX-A dans le 3V promeut davantage la consommation d'un HFD que d'un régime enrichi en glucides. Encore une fois, comme avec la nourriture standard, ces effets semblent être OX-A-dépendants. La capacité des OX à augmenter la prise alimentaire pourrait être, du moins partiellement, due à son rôle de stimulation de l'éveil, en plus d'augmenter la motivation à manger. Enfin, plusieurs études suggèrent que les OX, agissant sur le OX1R, promeuvent la prise alimentaire en augmentant la motivation pour la récompense liée à la nourriture.

Les neurones OX sont activés par anticipation du repas, mais aussi après la consommation de nourriture, s'il s'agit de nourriture palatable. Une privation de nourriture régule à la hausse l'expression génique et protéique des deux OX et de leurs deux récepteurs dès 24h (Karteris et al., 2005). Compte-tenu de la relation entre les OX et les niveaux de glucose, ces changements pourraient être induits par la diminution des niveaux de glucose, cependant, cela pourrait aussi être expliqué par le fait qu'un jeûne de 24h suffit à augmenter l'activité

des rongeurs sur la roue et à diminuer le nombre d'épisodes de sommeil, et donc l'augmentation de l'expression des OX pourrait être liée à une augmentation de l'éveil (Borbely, 1977; Finger, 1965). La perspective de consommer une nourriture palatable augmente aussi l'activité neuronale OX et l'expression génique des OX. Après consommation de nourriture palatable, les niveaux d'OX sont aussi augmentés, et il a été montré que les HFD sont plus efficaces dans cet aspect, que les régimes riches en glucides mais pauvres en graisses (Gaysinskaya et al., 2007; Park et al., 2004; Wortley et al., 2003). Il a été suggéré que cette augmentation des OX serait davantage due aux graisses saturées qu'insaturées (Barson et al., 2012; Dziedzic et al., 2007). Cependant, l'expression des OX peut être aussi augmentée par la consommation d'un régime riche en glucides (Olszewski et al., 2009). De manière générale, il semble donc que les OX soient activés durant la recherche de nourriture mais aussi après la consommation de nourriture palatable, pouvant expliquer en partie pourquoi ces aliments sont consommés en excès.
Il est intéressant de noter que les neurones de premier ordre situés dans l'ARC, à savoir les neurones anorexigènes exprimant POMC et CART, ainsi que les neurones orexigènes exprimant NPY et AgRP, et les neurones orexigènes de second ordre du LHA exprimant les OX et la MCH, envoient des projections les uns sur les autres.

- ***Le noyau dorso-médian***

Le DMN est impliqué dans la régulation d'un certain nombre de processus physiologiques, dont l'appétit, la thermorégulation, le stress et les rythmes circadiens. Il reçoit des projections depuis la plupart des noyaux hypothalamiques, en particulier depuis l'ARC. Les neurones du DMN, eux, projettent vers le PVN et le LHA. Plusieurs neuropeptides (par exemple le NPY et la CRH) y sont exprimés, comme les récepteurs de plusieurs peptides impliqués dans la régulation de l'appétit et de la balance énergétique. L'expression de NPY dans le DMN a été montrée comme augmentée chez les rongeurs dans plusieurs modèles d'obésité (Bi et al., 2001; Guan et al., 1998). Ceci pourrait jouer un rôle dans la régulation de la thermogénèse et le développement d'une obésité nutritionnelle (Chao et al., 2011).

- ***Le noyau ventro-médian***

Les neurones NPY/AgRP et POMC/CART de l'ARC projettent dans le VMN. A leur tour, les neurones du VMN projettent dans des aires hypothalamiques et extra-hypothalamiques comme le tronc cérébral (Cheung et al., 2013). Un rôle spécial pour SF1 (« steroidogenic factor 1 ») a été identifié dans le VMN : d'une part, il participe au développement du VMN (Davis et al., 2004; Parker et al., 2002) et d'autre part, il joue un rôle significatif dans le contrôle de la balance énergétique, comme illustré par des études menées chez des souris

modèles de déficience conditionnelle (Bingham et al., 2008; Kim et al., 2011; Zhang et al., 2008a). Une autre protéine importante dans le VMN est le BDNF, fortement exprimé dans ce noyau. La déficience en BDNF ou en son récepteur TRKB (« Tropomyosin receptor kinase B ») induit une hyperphagie et l'obésité chez l'homme et la souris (Lyons et al., 1999; Yeo et al., 2004). Au contraire, l'administration centrale ou périphérique de BDNF résulte en une perte de poids et en une réduction de prise alimentaire via la signalisation du MC4R (Xu et al., 2003a). Le VMN a aussi été montré comme ayant un rôle-clé dans la régulation de la thermogenèse (Kim et al., 2011; Lopez et al., 2010; Martinez de Morentin et al., 2012; Whittle et al., 2012).

1.2.3. Régulation homéostatique du comportement alimentaire à court-terme

A court-terme, ce sont globalement les sensations de faim et de satiété qui régissent le comportement alimentaire.

Dans un premier temps, lors de la phase céphalique du contrôle de l'appétit, les aliments et les indices liés à la nourriture stimulent une activité « anticipatoire » du repas et induisent l'initiation du repas : l'information concernant la disponibilité et la palatabilité de la nourriture (signaux visuels, olfactifs et acoustiques) est transmise au cerveau *via* des voies sensorielles polymodales, augmentant la sensation de faim (Rui, 2013). Cette dernière induit l'initiation de la prise alimentaire. Durant la consommation de nourriture, les signaux gustatifs et olfactifs maintiennent la prise alimentaire. Après entrée de la nourriture dans l'estomac et le tractus GI, la distension gastrique et les composants alimentaires stimulent la sécrétion d'une vingtaine d'hormones polypeptidiques différentes depuis les cellules endocriniennes gastro-intestinales (Sam et al., 2012) dont la CCK, le peptide tyrosine tyrosine (PYY) et le GLP-1. Ces hormones déclenchent la satiété à court-terme, *via* une boucle de rétroaction négative (figure 8). De plus, le foie et le pancréas, en réponse à la prise alimentaire, génèrent eux-aussi des signaux de satiété et, en phase post-absorptive, les substrats énergétiques métaboliques circulants, issus de la nourriture ingérée, dont le glucose, les acides gras (AG) et certains acides aminés (aa), continuent de favoriser la satiété à la fois directement, *via* des systèmes cérébraux senseurs de nutriments, et indirectement, par promotion de la sécrétion de signaux d'adiposité (long-terme) depuis le tissu adipeux (TA) (ex. leptine) et le pancréas (ex. insuline) (Rui, 2013).

D'un point de vue anatomique et en termes de circuits neuraux, la régulation homéostatique du CA à court-terme engage majoritairement le tronc cérébral. Comme mentionné précédemment, dans le tronc cérébral, le CDV, qui englobe le NTS, l'AP et le DMV, est le module-clé de la régulation homéostatique du CA à court-terme (figure 8). En effet, le NTS

caudal intègre les signaux viscérosensoriels afin de procéder à une régulation homéostatique des états de faim et de satiété. Les signaux de satiété à court-terme sont majoritairement transportés au NTS *via* des fibres vagales afférentes excitatrices glutamatergiques issues pour la majorité dans les ganglions inférieurs du nerf vague (Travagli et al., 2006) (figure 8). Ces nerfs vagaux afférents sont stimulés à la fois par distension gastrique (activation de mécanorécepteurs gastriques) et par des hormones de satiété à court-terme (ex. CCK, PYY, GLP-1) dont les récepteurs sont exprimés dans les nerfs vagaux (Hisadome et al., 2010; Moran et al., 1997; Moran et al., 1998; Suzuki et al., 2012). En plus de ces fibres vagales, certaines hormones régulent aussi directement l'activité d'un sous-ensemble de neurones du NTS et de l'AP qui sont directement exposés au glucose, aux lipides, aux hormones de satiété et aux cytokines circulant(e)s puisque la BHE y est perméable (Lutz, 2012). Or, les neurones de l'AP innervent directement les neurones du NTS et peuvent donc lui transmettre directement l'information de satiété (Lutz, 2012). De plus, le NTS reçoit de nombreuses projections descendantes depuis le prosencéphale, notamment depuis l'hypothalamus et certaines structures du système limbique (Geerling et al., 2010; Zheng et al., 2005). Ainsi, le NTS est une interface-clé entre prosencéphale et rhombencéphale. Il permet la régulation des états de faim et de satiété en intégrant à la fois des signaux ascendants de satiété depuis le tractus GI, des signaux provenant de circuits locaux (ex. avec des neurones de l'AP) et les signaux descendants modérateurs provenant de régions cérébrales de plus haut niveau.

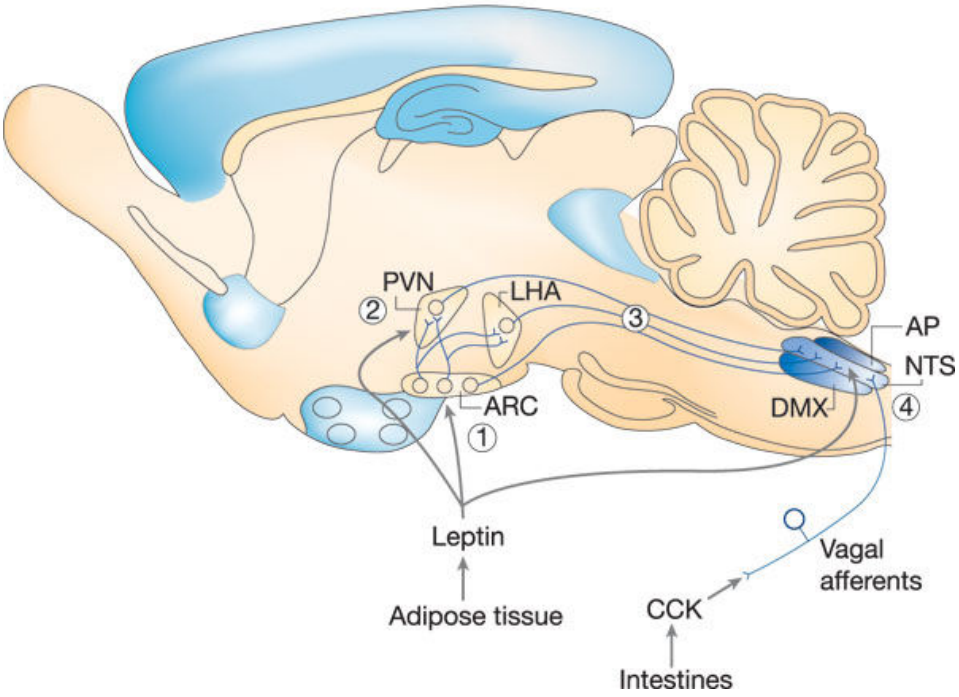


Figure 8. Régulation homéostatique de la prise alimentaire: modèle d'intégration des signaux de satiété (court-terme) et d'adiposité (long-terme) (d'après Morton et al., 2006). Il a été proposé que la régulation homéostatique de la prise alimentaire, dont le but est de maintenir un niveau correct d'adiposité corporelle, est ajustée d'un repas à un autre en fonction des changements de la masse grasse. Par leurs actions dans le prosenchéphale et dans le rhombencéphale, les signaux d'adiposité (ex. leptine) influencent de manière négative la prise alimentaire en augmentant la réponse aux signaux de satiété viscéraux comme la CCK qui sont libérés lors de l'ingestion de nourriture et qui mènent à l'arrêt du repas. Alors que l'hypothalamus est une cible-clé de la leptine, l'effet de satiété induit par la CCK implique l'activation de fibres afférentes vagales qui atteignent le NTS. De manière générale, l'intégration de ces divers signaux peut commencer avec l'action de la leptine majoritairement sur les neurones de l'ARC (1) (mais aussi vers d'autres aires hypothalamiques (2)). Les neurones de l'ARC projettent vers d'autres neurones dans des noyaux hypothalamiques adjacents comme ceux du LHA ou du PVN, qui projettent à leur tour vers le NTS qui traite les signaux de satiété et influencent ainsi la réponse à la CCK par exemple (4). Les signaux de satiété activent des afférences vagales pour favoriser l'arrêt du repas. La réponse de satiété du NTS est amplifiée par des entrées directes de la leptine dans le NTS, en plus de l'action de la leptine sur l'hypothalamus. De cette façon, une diminution de l'action de la leptine (comme après une perte de poids) peut au contraire augmenter la taille des repas en diminuant la réponse du rhombencéphale aux signaux de satiété. *AP,* area postrema ; *DMX,* noyau moteur dorsal du nerf vague ; *LHA,* hypothalamus latéral ; *NTS,* noyau du tractus solitaire ; *PVN,* noyau paraventriculaire.

En plus des hormones produites par le tractus GI, une autre hormone, sécrétée majoritairement par l'estomac, a une action à court-terme et est très importante dans l'initiation de la prise alimentaire puisqu'elle est la seule hormone orexigénique identifiée jusqu'à aujourd'hui : la ghréline.

- ***La ghréline***

La ghréline est un peptide synthétisé sous forme de pré-prohormone. Le clivage de la préproghréline produit deux formes matures de ghréline : une forme de 28 aa et une forme de 27 aa (Hosoda et al., 2003). La ghréline est hautement conservée entre les espèces et est exprimée dans de nombreux tissus, soulignant son importance physiologique (Smith et al., 1999; van der Lely et al., 2004). On notera que la ghréline est identique chez le rat et la souris et que celle-ci ne diffère de la ghréline humaine que par deux résidus.

Par un processus post-traductionnel supplémentaire, la ghréline est acylée sur son troisième résidu (une sérine) par l'enzyme GOAT (« ghrelin O-acyltransferase »). On considère que la ghréline est bioactive sous sa forme acylée, d'après sa capacité à se lier et à activer le seul récepteur connu de la ghréline, le GHSR-1a (« growth hormone secretagogue receptor 1a »). La ghréline fonctionne et est régulée de manière opposée aux hormones de satiété (Cummings et al., 2005). La ghréline, par liaison au GHSR-1a, est un puissant activateur de la prise alimentaire dans diverses espèces (Tschop et al., 2000), y compris chez l'homme. La ghréline a un rôle dans la régulation du CA à court-terme : elle est impliquée dans la sensation de faim au moment des repas et dans l'initiation des repas, ce qui s'illustre notamment par l'augmentation de ses niveaux circulants peu avant les repas (Cummings et al., 2002). Comme mentionné plus haut, la ghréline favorise la prise alimentaire, et cette promotion de la prise alimentaire est assurée notamment en augmentant le nombre de repas, sans en affecter la taille. Au contraire des hormones de satiété, la ghréline augmente de la motilité gastro-intestinale et diminue la sécrétion d'insuline. La sécrétion préprandiale de ghréline semble faire partie de la réponse céphalique, et est possiblement stimulée par le système nerveux sympathique (Mundinger et al., 2006). Les montées subites préprandiales de ghréline peuvent être entraînées par une programmation régulière des repas et pourraient participer à des processus anticipatoires (Drazen et al., 2006). L'ingestion de nutriments entraîne la diminution des niveaux circulants de ghréline précédemment augmentés. Ce processus ne requiert pas l'entrée des nutriments dans la lumière stomacale ou duodénale (où 80 à 90% de la ghréline est produite) mais résulterait davantage de la transmission neurale (pas de nature vagale) de signaux intestinaux, favorisée par l'insuline (Cummings et al., 2005).

1.2.4. Régulation homéostatique du comportement alimentaire à long-terme

A long-terme, la régulation homéostatique de la prise alimentaire se fait principalement selon les signaux d'adiposité envoyés depuis la périphérie, à savoir la leptine et l'insuline.

- ***La leptine***

La recherche sur la régulation centrale de la balance énergétique a été bouleversée par la découverte de la leptine, produit du gène *Ob*, en 1994 par le groupe de Jeffrey Friedmann (Zhang et al., 1994). La leptine est une hormone anorexigénique issue du tissu adipeux. Par ailleurs, la concentration de la leptine circulante est proportionnelle à la masse grasse (Considine et al., 1996).

La leptine atteint le SNC via un système de transport saturable et permet de transmettre des informations à propos du statut énergétique de l'individu. Il existe plusieurs isoformes de récepteur de la leptine (LepR), parmi lesquelles c'est LepRb qui est essentielle aux effets de la leptine. Une déficience en leptine ou en LepRb, chez les modèles rongeurs ou chez l'homme, est associée à un phénotype caractérisé par l'hyperphagie, une diminution de la dépense énergétique et une obésité sévère (Chen et al., 1996; Clement et al., 1998; Halaas et al., 1995; Montague et al., 1997). D'ailleurs, on notera que la plupart des individus obèses sont résistants à la leptine : les niveaux très augmentés de la leptine circulante ne sont plus capables d'induire les effets centraux anorexigènes normaux, empêchant l'utilisation de la leptine comme approche thérapeutique.

Le récepteur LepRb est fortement exprimé dans divers noyaux hypothalamiques et dans d'autres régions cérébrales impliquées dans le contrôle de la balance énergétique (Elmquist et al., 1998). Dans l'ARC, les neurones POMC/CART et NPY/AgRP sont des cibles directes de la leptine (Cheung et al., 1997; Cowley et al., 2001; Elias et al., 1999) (figure 8) et l'ablation du LepRb dans une de ces populations, voire les deux, induit une prise de poids. Cependant, l'absence totale du gène *Lepr* entraîne un phénotype plus drastique, suggérant que d'autres populations neuronales sont impliqués dans la signalisation de la leptine et pour la réalisation de ses effets sur le poids et la prise alimentaire.

La liaison de la leptine au LepRb active la voie des JAK/STAT (JAK2 et STAT3 ; JAK pour « janus kinase » et STAT pour « Signal Transducers and Activators of Transcription »). La translocation au noyau de STAT3 dimérisé (Robertson et al., 2008) promeut l'expression du gène *Pomc* et inhibe celle du gène *Agrp* (Kitamura et al., 2006; Munzberg et al., 2003). Cette signalisation est régulée négativement par SOCS3 (« suppressor of cytokine signaling 3 ») (Robertson et al., 2008). Par ailleurs, la leptine active aussi la voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) induisant à terme la sortie du noyau du facteur de transcription FOXO1 (« forkhead box protein O1 ») phosphorylé, permettant à STAT3 de se lier aux promoteurs de *Pomc* et *Agrp*, stimulant et inhibant alors, respectivement, l'expression de ces neuropeptides (Kitamura et al., 2006). La signalisation PI3K est régulée négativement par PTEN (« phosphatase and tensin homolog »).

De manière générale, la leptine semble stimuler la transcription de Pomc, de dépolariser les neurones POMC/CART et de favoriser le clivage de la POMC en α-MSH et la sécrétion de cette dernière (Cowley et al., 2001; Guo et al., 2004; Munzberg et al., 2003), et au contraire, elle atténuerait l'expression et la sécrétion des neuropeptides orexigènes NPY et AgRP (Mizuno and Mobbs, 1999; Stephens et al., 1995).

- ***L'insuline***

L'insuline est produite par les cellules β-pancréatiques. Elle est historiquement associée au métabolisme glucidique, mais il semble que celle-ci agirait aussi en tant que signal anorexigène dans le SNC. La sécrétion d'insuline dans la circulation induite par le glucose est proportionnelle à la masse grasse (Bagdade et al., 1967) et entre dans le SNC via un mécanisme de transport saturable (Baura et al., 1993).

L'administration centrale (ICV ou directement dans l'hypothalamus) d'insuline, chez les Primates comme chez les rongeurs, induit une réduction de la prise alimentaire (Air et al., 2002; McGowan et al., 1993; Woods et al., 1979).

Le récepteur de l'insuline (IR), et sa machinerie de signalisation sont exprimés dans les aires hypothalamiques impliquées dans le contrôle de l'appétit (Corp et al., 1986; Havrankova et al., 1978), notamment par les neurones POMC/CART et NPY/AgRP de l'ARC (Benoit et al., 2002). De manière surprenante, la déficience en IR dans l'une des ces deux populations neuronales ne semble pas perturber la balance énergétique, bien que certains aient rapporté des défauts de la production hépatique de glucose chez les souris où l'IR a été spécifiquement soustrait des neurones AgRP (Konner et al., 2007). Il semble que la signalisation de l'insuline dans les neurones NPY/AgRP et POMC/CART contrôle le métabolisme du glucose et la dépense énergétique, respectivement.

La liaison de l'insuline à l'IR induit l'autophosphorylation du récepteur et donc le recrutement des protéines IRS (« insulin receptor substrate »), qui convergent avec la voie de signalisation de la leptine, au niveau de la PI3K (Xu et al., 2005b). Les régulateurs négatifs du LepR, tels que SOCS3 ou PTP1B (« protein-tyrosine phosphatase 1B »), peuvent aussi inhiber directement l'IR et sa signalisation en agissant sur IRS1. L'activation de la signalisation de l'IR induit une diminution de l'expression de NPY et à l'augmentation des niveaux de POMC dans l'ARC, stimulant de la sorte un effet anorexigène (Benoit et al., 2002; Schwartz et al., 1992; Sipols et al., 1995).

On notera que la leptine et l'insuline régulent aussi toutes deux l'activité de la kinase AMPK (« AMP (adenosine monophosphate)-activated protein kinase »), un senseur d'énergie conservé au cours de l'évolution, qui joue un rôle primordial dans la régulation hypothalamique de la balance énergétique (Claret et al., 2007; Minokoshi et al., 2004). Leptine et insuline inhibent en effet la signalisation de l'AMPK et de ses cibles dans l'hypothalamus (Minokoshi et al., 2004).

Ainsi, ces deux hormones périphériques dont la production est proportionnelle à la masse grasse, et donc traduit, du moins en partie, l'état énergétique d'un individu, ont un rôle

capital dans la régulation centrale de la balance énergétique en ciblant particulièrement les neurones de premier ordre localisés dans l'ARC.

Rapidement, nous soulignerons que si la ghréline est majoritairement impliquée dans la régulation du CA à court-terme, et qu'elle n'est pas considérée comme un signal d'adiposité, certaines études suggèrent qu'elle remplisse les critères des hormones contribuant à la régulation à long-terme du CA et du poids corporel (Cummings et al., 2005). D'une part, les niveaux circulants de ghréline répondent de manière compensatoire à des changements du poids corporel. D'autre part, la ghréline agit dans plusieurs aires cérébrales régulant l'homéostasie énergétique à long-terme, dont l'hypothalamus (particulièrement les neurones NPY/AgRP de l'ARC), le tronc cérébral caudal et les centres de récompense mésolimbiques. De plus, l'administration chronique de ghréline augmente le poids corporel à travers de nombreux effets anaboliques sur la prise alimentaire, la dépense énergétique et l'utilisation énergétique. Enfin, chez les souris adultes déficientes pour la ghréline ont une prise alimentaire et un poids corporel diminués et les souris déficientes pour le récepteur de la ghréline résistent au développement d'une obésité nutritionnelle (Wortley et al., 2005; Zigman et al., 2005).

Comme mentionné précédemment, nous nous sommes intéressés au rôle de l'inflammation, notamment centrale, dans la dérégulation du comportement alimentaire. Nous présenterons donc ensuite quelques notions générales sur l'inflammation et illustrer le lien inflammation et dérégulation du CA.

2. L'inflammation

L'inflammation est un mécanisme inné de défense d'un organisme contre tout stimulus nocif, qu'il soit septique (ex. une infection bactérienne, une invasion virale) ou aseptique (ex. réponse inflammatoire générée suite à un dommage tissulaire mécanique). Tout challenge immunitaire déclenche immédiatement une réponse immunitaire innée, non-spécifique, suite à la reconnaissance de motifs pathogéniques ou à la perception de signaux de danger par des cellules immunitaires résidentes des tissus (mastocytes, macrophages, cellules dendritiques…) ou « patrouillant » dans l'organisme depuis la circulation sanguine (neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes, cellules NK (« natural killers ») lymphocytes). Puis, il y a la « phase vasculaire », avec recrutement de cellules immunitaires innées sur le site de l'inflammation notamment par l'expression de molécules d'adhésion cellulaire exprimées par les cellules endothéliales et la forte concentration de cytokines et chimiokines abondamment produites près du site de lésion. Localement, l'activation et la différenciation de cellules immunitaires induit la production d'un éventail supplémentaire de médiateurs inflammatoires (ex. cytokines pro-inflammatoires, oxyde nitrique, prostaglandines), ce qui renforce l'activation et le recrutement de cellules. Ensuite, il y a la « phase effectrice » caractérisée par la phagocytose et, si nécessaire, l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Le but de cette réponse inflammatoire est la réparation du tissu lésé avec résolution de l'inflammation. En lien avec le déroulement de la réponse inflammatoire, les signes cardinaux de l'inflammation sont la chaleur, la rougeur, le gonflement, la douleur et la perte de fonction. La réponse immunitaire innée requiert l'intervention de cellules immunitaires et de médiateurs inflammatoires.

Le SNC a longtemps été considéré comme doté d'un privilège immun, c'est-à-dire comme tolérant l'introduction d'antigènes sans déclarer de réponse inflammatoire. Or, depuis, il a été montré par de nombreuses études qu'il peut y avoir inflammation dans le SNC, on la qualifie alors de « neuroinflammation ». La cause de la neuroinflammation peut être soit directement centrale, soit périphérique. En effet, il existe une communication bidirectionnelle entre le système immunitaire et le SNC assurée par une voie neurale et par une voie humorale. Dans la voie neurale, les cytokines produites localement activent des nerfs afférents, par exemple les nerfs vagaux durant des infections abdominales ou viscérales (Bluthe et al., 1994; Watkins et al., 1994) ou les nerfs trigéminaux durant des infections oro-linguales (Romeo et al., 2001). Dans la voie humorale, d'une part, les TLR (« toll-like receptors ») exprimés par des cellules de type macrophages résidents des organes circumventriculaires (OCV) et du plexus choroïde répondent aux pathogènes circulants en produisant des cytokines pro-inflammatoires (Quan et al., 1998) et, comme les

OCV bordent l'extérieur de la BHE, ces cytokines peuvent entrer dans le cerveau par diffusion volumique (Vitkovic et al., 2000) et d'autre part, les cytokines pro-inflammatoires surexprimées dans la circulation systémique peuvent accéder au cerveau par des systèmes de transport saturables au niveau de la BHE (Banks, 2006) Enfin, l'activation de récepteurs aux cytokines, notamment de l'IL-1 (interleukine 1), localisés sur les macrophages périvasculaires et les cellules endothéliales des veinules cérébrales (Konsman et al., 2004; Schiltz and Sawchenko, 2002) par des cytokines circulantes induit la production de prostaglandines de la série E2 (PGE2). L'engagement de ces voies de communication entre cerveau et système immunitaire mène finalement à la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules microgliales, qui sont considérées comme les macrophages résidents du cerveau.

La neuroinflammation implique en effet majoritairement la microglie, mais aussi les astrocytes, qui peuvent interagir avec les cellules immunitaires issues de la périphérie. Il est intéressant de noter que l'inflammation périphérique et la neuroinflammation impliquent la production et le libération de médiateurs pro-inflammatoires similaires : des cytokines (telles que interleukine-1β (IL-1β), interleukine-6 (IL-6) ou Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α) par exemple), des chimiokines, l'oxyde nitrique, etc…

2.1. Les cellules participant à la réponse immunitaire

Globalement, les cellules de l'inflammation en périphérie comprennent les lymphocytes, les phagocytes (polynucléaires (surtout neutrophiles) et monocytes/macrophages), les mastocytes et les basophiles et enfin les fibroblastes.

Comme mentionné précédemment, le cerveau a longtemps été considéré ayant un privilège immun, cependant, on sait maintenant que lors d'une inflammation, la perméabilité de la BHE peut-être altérée, permettant notamment le passage de cellules immunitaires pouvant s'infiltrer dans le tissu cérébral (lymphocytes, macrophages), et surtout, le cerveau est lui-même doté d'acteurs de l'immunité innée : les cellules gliales, en particulier la microglie et les astrocytes. Ces cellules gliales sont capables de détecter les lésions du tissu cérébral etc, de s'activer et sécréter toutes sortes de médiateurs inflammatoires (c'est surtout le cas de la microglie) et, en réponse (signaux de la microglie activée ou des neurones lésés), de lutter contre les lésions par la sécrétion de facteurs de croissance et de changements morphologiques permettant la formation d'une cicatrice gliale par les astrocytes.

2.1.1. Les lymphocytes

Les lymphocytes, sont des cellules immunitaires dont l'action peut être de type humoral ou cellulaire. Il existe trois types de lymphocytes :

- de type B, exprimant le marqueur CD19 (CD pour « cluster of differentiation »), qui sont la mémoire de l'immunité acquise et qui servent à son expression. Les lymphocytes B, à l'étape finale de leur maturation (plasmocytes), sécrètent les anticorps et médient de cette façon l'immunité humorale adaptative.
- de type T, exprimant le marqueur CD3, et dont il existe plusieurs sous-populations :
    - auxiliaires (ou « helper ») et régulateurs, exprimant le marqueur CD4 et qui contrôlent une immunité adaptative
    - cytotoxiques, exprimant le marqueur CD8, permettant l'élimination de cellules infectées ou cancéreuses
- de type NK (« natural killer »), exprimant CD335 (souris) ou CD56 (homme), médiant une immunité cytotoxique innée.

2.1.2. Les mastocytes et polynucléaires basophiles et éosinophiles

Les mastocytes et les polynucléaires basophiles et éosinophiles contiennent des granules au sein desquelles on trouve des médiateurs chimiques de l'inflammation, en particulier l'histamine (voir plus loin) et l'héparine qui vont favoriser la réaction inflammatoire.

2.1.3. Les phagocytes

Les phagocytes représentent une part essentielle de l'immunité innée : ils protègent l'organisme en ingérant des particules nocives telles que des particules d'origine étrangère, des bactéries, des cellules mortes ou en train de mourir. Ils comprennent les neutrophiles et les cellules du système monocytes-macrophages-cellules dendritiques (incluant les histiocytes/macrophages résidents). On notera que la cellule microgliale est considérée comme le macrophage du cerveau.

- **Neutrophiles :** trouvés dans la circulation sanguine, les neutrophiles sont les premières cellules à migrer vers le site d'inflammation, quelques minutes suivant la lésion, le trauma. Ils sont donc un marqueur d'inflammation aiguë. La phagocytose entraîne la mort du neutrophile, car elle épuise toutes ses réserves en glucose.

- **Monocytes, macrophages et cellules dendritiques :** les monocytes sont des cellules immatures de la famille des leucocytes et provenant de la moelle osseuse. Ils se

différencient en macrophages résidents ou en cellules dendritiques. Le macrophage est le phagocyte « prototypique » dont le rôle est le « nettoyage » de l'organisme de corps apoptotiques et nécrotiques, de pathogènes… Ils sont ubiquitaires et les macrophages résidents ont une appellation différente selon le tissu considéré (cellules de Küpffer dans le foie, les macrophages alvéolaires dans les poumons, etc). Il est intéressant de noter que les macrophages peuvent être « pro-inflammatoires » (on les qualifie de « M1 ») ou « anti-inflammatoires » (ou « M2 ») selon les médiateurs qu'ils produisent. Les cellules dendritiques immatures sont capables de phagocyter les pathogènes et d'en présenter des fragments à leur surface, une fois matures. En effet leur rôle premier est la présentation d'antigènes permettant l'activation des lymphocytes T et B notamment.

2.1.4. Les cellules « immunitaires » du système nerveux central

Dans le SNC, les deux types de cellules gliales qui ont été décrites comme participant à l'inflammation sont la microglie et les astrocytes. Lors d'une neuroinflammation, il y a notamment une activation et une prolifération de ces cellules, à laquelle on fait référence sous l'appellation globale de gliose. On peut distinguer cependant la microgliose et l'astrogliose.

• **La microglie :** la microglie représente les sentinelles patrouillant de l'immunité innée dans le cerveau et agit de manière similaire à des macrophages résidents des tissus périphériques. En effet, les cellules microgliales sont capables de phagocyter les bactéries, les débris, les cellules endommagées. Elles aident aussi à monter des réponses de défense contre les agents infectieux et les dommages physiques (Ransohoff and Brown, 2012), en sécrétant des médiateurs inflammatoires, notamment des cytokines. Cependant, la microglie n'a pas la même origine que les macrophages. Elles dérivent du sac vitellin et « envahissent » le cerveau de manière précoce durant l'embryogenèse. En dehors du contexte de l'inflammation, la microglie joue aussi un rôle critique dans le maintien de l'homéostasie fonctionnelle et architecturale du cerveau et des réseaux neuronaux (Gemma and Bachstetter, 2013; Paolicelli et al., 2011; Schafer et al., 2012; Wake et al., 2013). La microglie est activée durant différentes maladies neurodégénératives notamment, mais il reste encore à déterminer si le seul rôle de la microglie dans ce contexte est de restaurer l'homéostasie et un fonctionnement normal, ou si l'activation microgliale peut être délétère et précipiter la progression de la maladie, ou si, à l'image des macrophages elle exerce des effets à la fois bénéfiques ou délétères (phénotypes M1 versus M2) en fonction du contexte (Sierra et al., 2013).

• **Les astrocytes :** si les astrocytes ont de nombreuses fonctions associés au maintien de l'activité cérébrale (apport de nutriments aux neurones, régulation du flux sanguin, maintien de la BHE, participation à la neurotransmission), l'astrogliose a été rapportée dans de nombreuses conditions neurodégénératives et les astrocytes permettent la cicatrisation après une mort neuronale par prolifération. Par ailleurs, les astrocytes peuvent sécréter des cytokines pro-inflammatoires et leur implication dans le maintien de de la BHE peut être un paramètre important en conditions inflammatoire où la BHE a été rapportée comme étant plus perméable (Carson et al., 2006; Wispelwey et al., 1988).

2.2. Les acteurs moléculaires de l'inflammation

La réponse inflammatoire ne dépend pas seulement de cellules, mais aussi de facteurs synthétisés localement ou qui se présentent normalement comme précurseur inactif dans la circulation. Les médiateurs circulants comprennent le système des kinines (puissants vasodilalatateurs), le système coagulation/fibrinolyse et le système du complément (ensemble de protéines sériques, les facteurs du complément pouvant induire la dégranulation, la lyse et la phagocytose des bactéries, etc).
Concernant les médiateurs synthétisés localement, on compte les amines vasoactives (histamine, sérotonine ; elles induisent une vasodilatation et augmentent la perméabilité vasculaire, ce qui se manifeste par une congestion active et œdème inflammatoire), les prostaglandines et les leucotriènes (induisent des effets locaux divers et marqués : vasodilatation, douleur, attraction des polynucléaires mais aussi des effets "généraux", comme la fièvre), les molécules d'adhérence, permettant la concentration de cellules immunitaires au niveau du foyer de l'inflammation et les cytokines.

2.2.1. Les cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines, qui, à la différence des hormones, ne sont pas stockées dans des glandes en tant que molécules préformées, mais qui sont rapidement synthétisées et sécrétées par différents types cellulaires après stimulation. Les effets biologiques des cytokines sont nombreux et variés : elles jouent des rôles importants dans la réponse immunitaire, mais aussi dans l'hématopoïèse, la neurogenèse, l'embryogenèse et l'oncogenèse. Les cytokines affectent souvent l'action d'autres cytokines, de manière additive, synergique ou antagoniste.
Il en existe une centaine et ont été classées selon l'homologie de structure. Parmi les cytokines, on distingue le TNF-α, les interleukines, les chimiokines et les interférons. Par ailleurs, elles peuvent aussi être classées en fonction de leurs effets sur les cellules

immunitaires et selon leurs effets pro- ou anti-inflammatoires : certaines cytokines sont pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF-α) alors que d'autres, au contraire, sont anti-inflammatoires (IL-4, IL-10, et IL-13).

Différents types de cellules peuvent synthétiser les cytokines (par exemple les lymphocytes (surtout les T) ou les monocytes/macrophages), et on leur attribue de nombreuses cibles cellulaires possibles sur lesquelles elles ont des actions variées. Les cytokines ont différents modes d'action : autocrine, juxtacrine, paracrine et endocrine (figure 9).

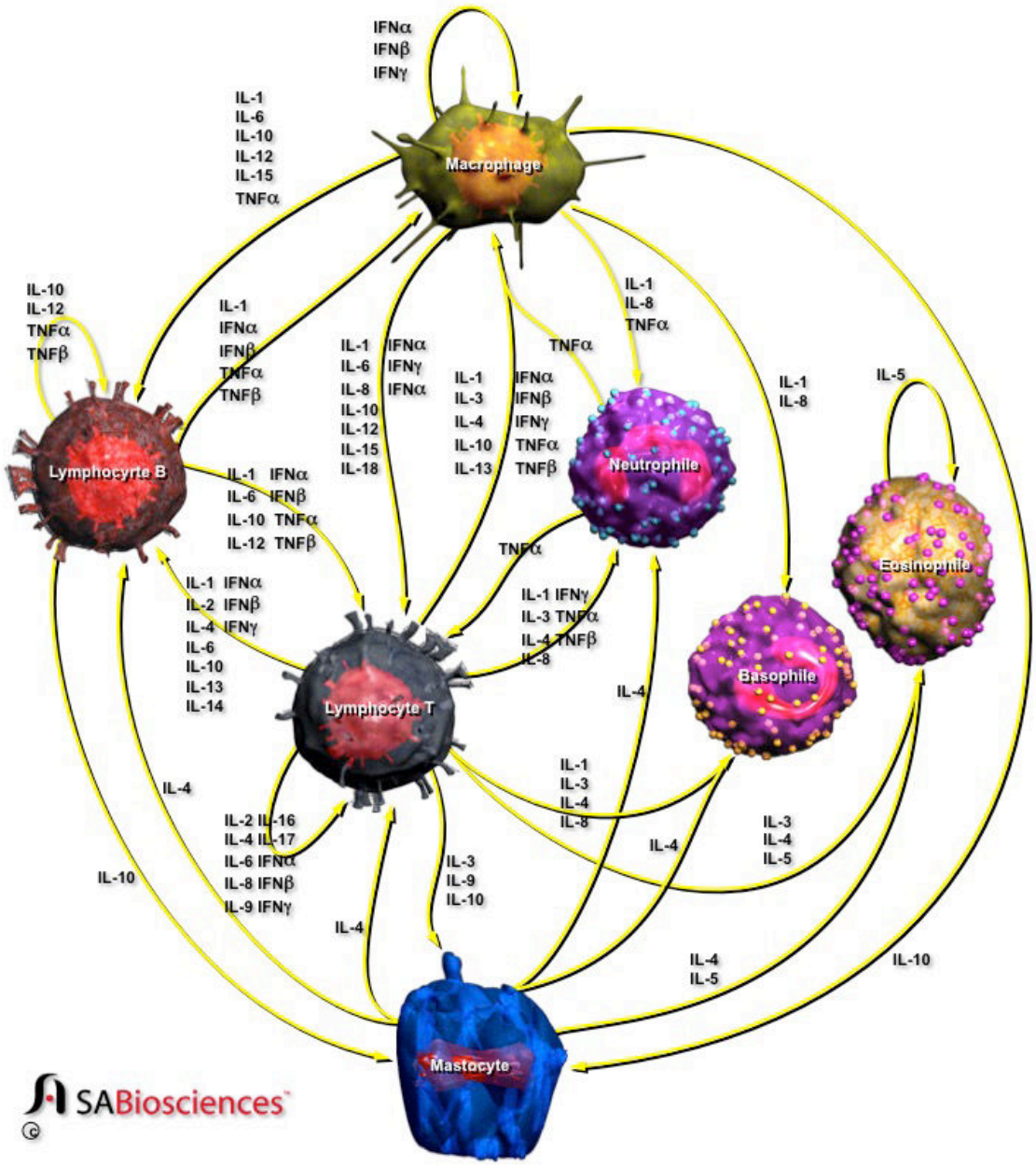


Figure 9. Le réseau des cytokines (d'après SABiosciences). Les cytokines jouent un rôle important dans la communication entre les cellules. En tant que médiateurs intercellulaires, les cytokines régulent la survie, la croissance, la différenciation et les fonctions effectrices des cellules. A part leurs effets pléiotropiques, les actions des cytokines sont souvent redondantes, qu'elles soient auto-, para- ou endocrines. Les cytokines exercent leurs effets *via* des récepteurs localisés sur la surface de leurs cibles cellulaires.

Les cytokines agissent via des récepteurs membranaires (récepteurs des hématopoïétines, des TNF, des interférons, de la superfamille des immunoglobulines et des chimiokines…), dont certains se clivent après liaison de leur ligand, inhibant ainsi leur action, et en augmentant leur temps de demi-vie. Il est intéressant de noter que certains récepteurs de cytokines (récepteurs des hématopoïétines en particulier) sont dépourvus d'activité propre et sont associés à d'autres protéines cellulaires impliquées dans leur signalisation.
Parmi les effets connus des cytokines, nous pouvons mentionner: médiation de l'immunité innée (c'est-à-dire non-spécifique), régulation de l'activation, de la croissance et de la différentiation des lymphocytes et stimulation de l'hématopoièse.
Les cytokines canoniques pro-inflammatoires auxquelles nous nous intéresserons particulièrement pour nos travaux sont IL-1β, IL-6 et TNF-α, nous donnerons donc quelques détails à leur sujet :

- ***L'interleukine IL-1β***

L'IL-1β est issue d'une grande protéine précurseur produite par de nombreux types cellulaires périphériques et centraux, comme les monocytes et les macrophages résidents (Denes et al., 2012; Schumann et al., 1998).
Elle a des effets locaux et systémiques, comme le TNF-α. De la même manière que le TNF-α, l'IL-1 stimule l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales pour favoriser la migration des leucocytes circulants vers le site enflammé. Par ailleurs, l'IL-1 joue un rôle important dans l'induction de la fièvre. L'IL-1β soluble induit une réponse cellulaire en se liant à son récepteur transmembranaire IL-1R1 (« IL-1 receptor 1 »). Quand il y a liaison de l'IL-1β à son récepteur, alors une protéine accessoire particulière est recrutée, IL-1RAcP (« IL-1 receptor 1 accessory protein»), considérée comme co-récepteur. Ce trimère initie la signalisation (figure 10).

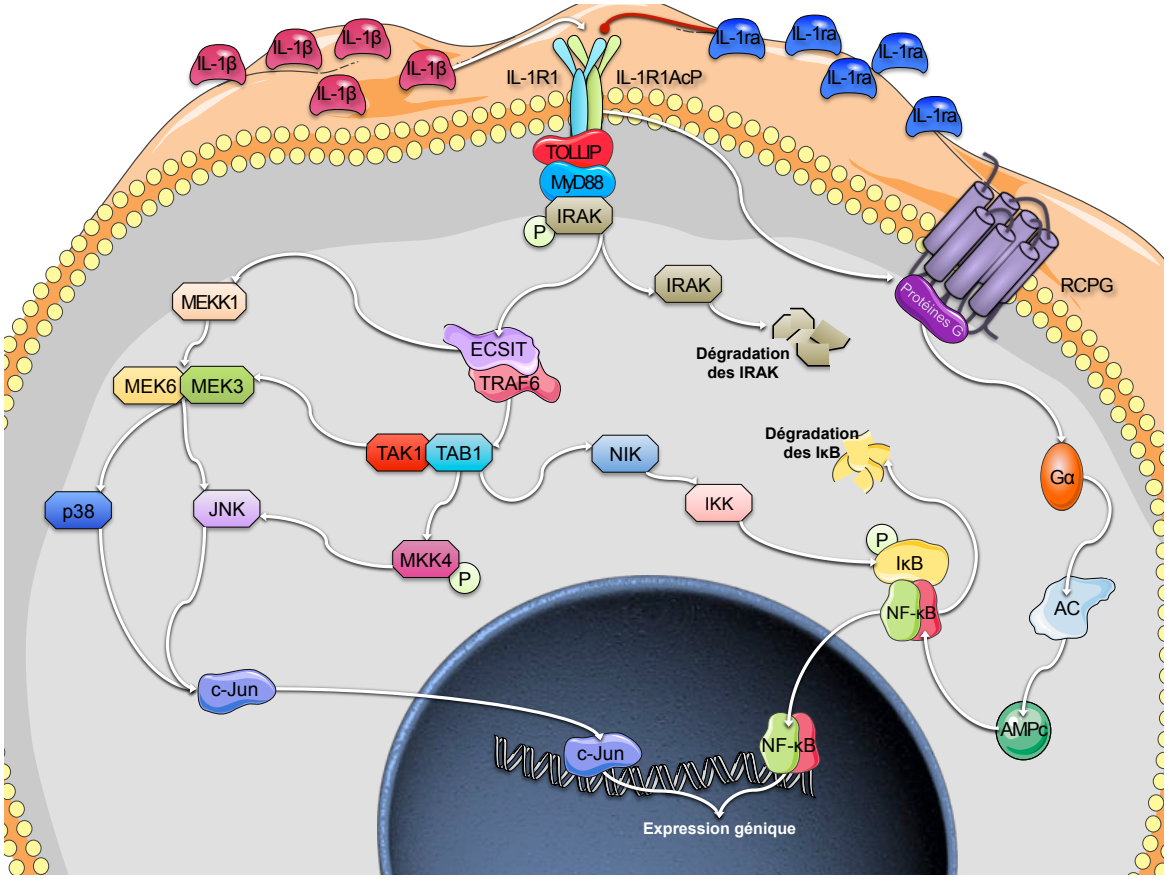


Figure 10. Signalisation de l'IL-1β (d'après QIAGEN). La liaison de l'IL-1β au IL-1R1 induit le recrutement du co-récepteur IL-1RAcP. Les protéines cytosoliques MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene-88) et TollIP (Toll-Interacting Protein) sont recrutées au complexe formé par l'IL-1β, l'IL-1R1 et l'IL-1R1AcP, où elles fonctionnent comme des adaptateurs, recrutant IRAK (IL-1 Receptor-Associated Kinase). IRAK1, une kinase sérine-thréonine, active et recrute TRAF6 (TNF Receptor-Associated Factors-6). Puis l'IRAK est ubiquitinylée et dégradée. TRAF6 active 2 voies, une induisant l'activation de 2 facteurs de transcription qui contrôlent l'expression d'un certain nombre de gènes inflammatoires et cataboliques, NF-κB, *via* les kinases TAB1 (TAK1 Binding Protein-1)/TAK1 (TGF-Beta-Activating Kinase-1), et c-Jun par la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)/JNK (Jun N-terminal Kinases). L'IL-1β, par liaison à son récepteur, peut aussi activer une protéine G sensible à la toxine pertussique, qui stimule à son tour l'activité de l'AC (adénylate cyclase) et donc augmente les niveaux intracellulaires d'AMPc. L'AMPc active des protéines kinases dépendantes de l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique) pour induire aussi l'activation du NF-κB. L'IL-1ra (« IL-1 receptor antogonist) inhibe cette signalisation. *ECSIT, Evolutionarily Conserved Signaling Intermediate In Toll Pathway, Mitochondrial ; IκB, inhibitor of nuclear factor κB; IKK, IκB kinase ; MEK, mitogen-activated protein kinase kinase ; MEKK, mitogen-activated protein kinase kinase kinase ; NIK, NF-κB inducing kinase.*

- ***L'interleukine IL-6***

L'IL-6 est produite par de nombreux types cellulaires, dont les monocytes, les cellules T, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les neurones, les astrocytes et la microglie. Elle induit l'activation locale des phagocytes et la modification de l'endothélium. Elle favorise le recrutement de monocytes sanguins vers les tissus et la synthèse hépatique de protéines de la phase aiguë. L'IL-6 se lie à un récepteur spécifique, l'IL-6R (« IL-6 receptor »), une protéine transmembranaire de type I de 80 kDa (Yamasaki et al., 1988). L'IL-6 liée à l'IL-6R s'associe à une deuxième protéine transmembranaire, gp130, qui sert de transducteur de signal pour l'IL-6 (Taga et al., 1989). De manière intéressante, gp130 est la sous-unité commune à tous les récepteurs de ligands de la famille des cytokines de type IL-6

(Kishimoto, 2010). La dimérisation de gp130 permet ensuite l'initiation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires (figure 11).

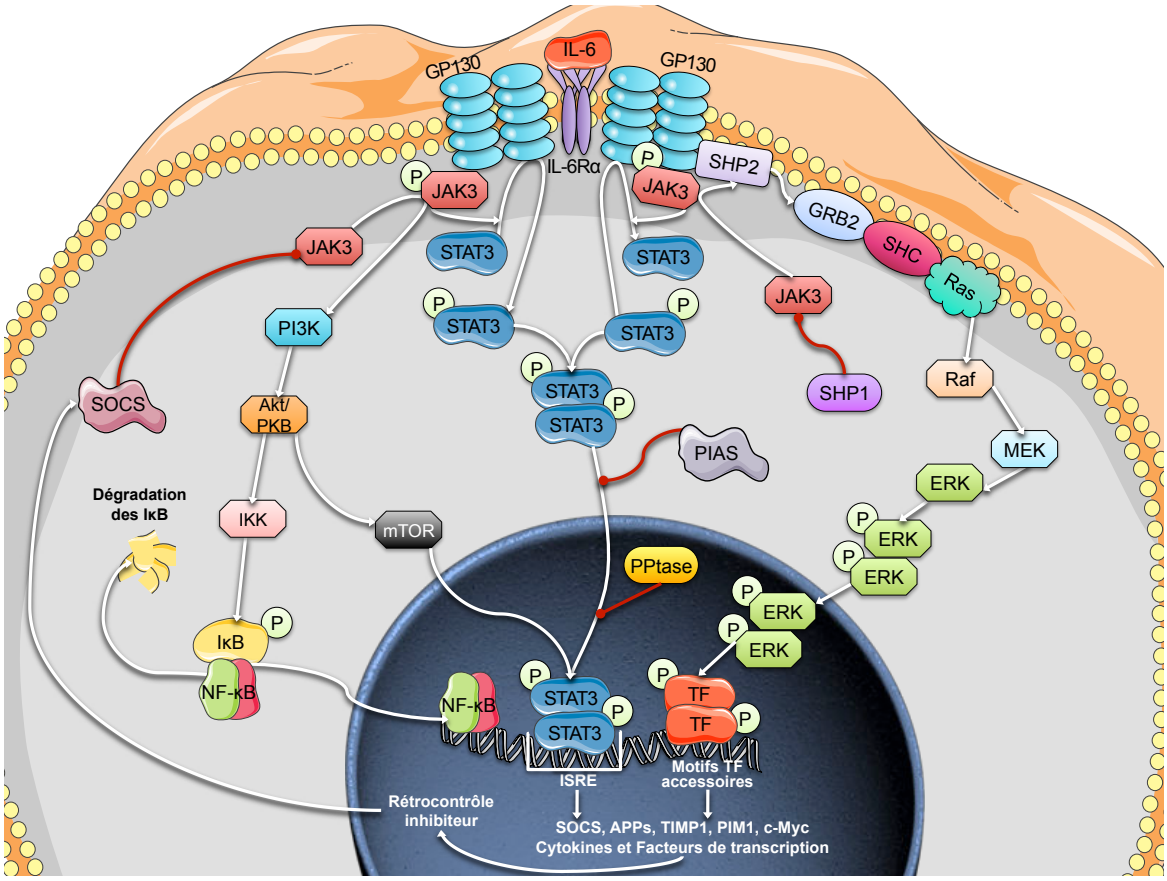


Figure 11. Signalisation de l'IL-6 (d'après SABiosciences). La liaison de l'IL-6 à son récepteur initie l'activation de JAK (« Janus Kinase ») et l'activation de la signalisation médiée par Ras. Les JAK activées phosphorylent et activent la transcription des STAT (« Signal Transducers and Activators of Transcription »), en particulier STAT3 et de SHP2 (« SH2 (Src Homology-2) Domain-containing Tyrosine Phosphatase »). STAT3 phosphorylé se dimérise et est transloqué dans le noyau pour activer la transcription de gènes contenant des éléments de réponse à STAT3. STAT3 est essentiel pour la survie cellulaire médiée par gp130 et pour les signaux de transition de la phase G1 à S du cycle cellulaire. SHP2 lie le récepteur de cytokine à la voie Ras/MAPK et est essentielle pour l'activité mitogène. La voie Ras, agissant *via* SHC, GRB2 (« Growth Factor Receptor Bound protein-2 ») et SOS1 (« Son of Sevenless-1 ») et activant les MAPK, active des facteurs de transcription comme Elk1 et NF-IL6 (C/EBP-Beta). Ces facteurs et d'autres comme AP-1 et SRF (« Serum Response Factor ») qui répondent à de nombreuses différentes voies de signalisation régulent ensemble une variété de promoteurs et « enhancers » répondant à l'IL-6 et d'autres facteurs. En plus des voies JAK/STAT et Ras/MAPK, l'IL-6 active aussi la PI3K (« Phosphoinositide-3 Kinase »). La cascade PI3K/Akt/NF-κB activée par l'IL-6 médie l'effet anti-apoptotique maximal de l'IL-6 par phosphorylation de BAD (« BCL2 Associated Death Promoter ») par Akt. La signalisation de l'IL-6 s'achève par l'action de tyrosine phosphatases, du protéasome, des SOCS, des PIAS (« Protein Inhibitors of Activated STATs ») et par l'internalisation de récepteurs de cytokine par gp130. Une des actions majeures de l'IL-6 est l'activation transcriptionnelle des gènes codant les protéines plasmatiques de la phase aiguë par le foie.

- ***Le tumor necrosis factor- α (TNF-α)***

Le TNF est une cytokine pro-inflammatoire multifonctionnelle, ayant des effets sur le métabolisme lipidique, la coagulation, la résistance à l'insuline et la fonction endothéliale. Le TNF-α est majoritairement produit par les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes, mais aussi par les lymphocytes, les fibroblastes et les kératinocytes, en réponse à l'inflammation, une infection ou un autre stress environnemental. Le TNF-α joue des rôles importants dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques, y

compris la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la modulation de réponses immunes et l'induction de l'inflammation : il stimule l'expression de molécules d'adhésion et la production de chimiokines par les cellules endothéliales notamment, pour permettre le recrutement des leucocytes (neutrophiles, monocytes, lymphocytes NK,…) vers le foyer de l'inflammation. De plus, le TNF-α active les phagocytes et induit la prolifération des lymphocytes T et B lorsque la réponse innée n'est pas suffisante pour la résolution de l'inflammation. Enfin, le TNF-α est aussi capable d'induire la synthèse de facteurs de croissance nécessaires à la réparation cellulaire.

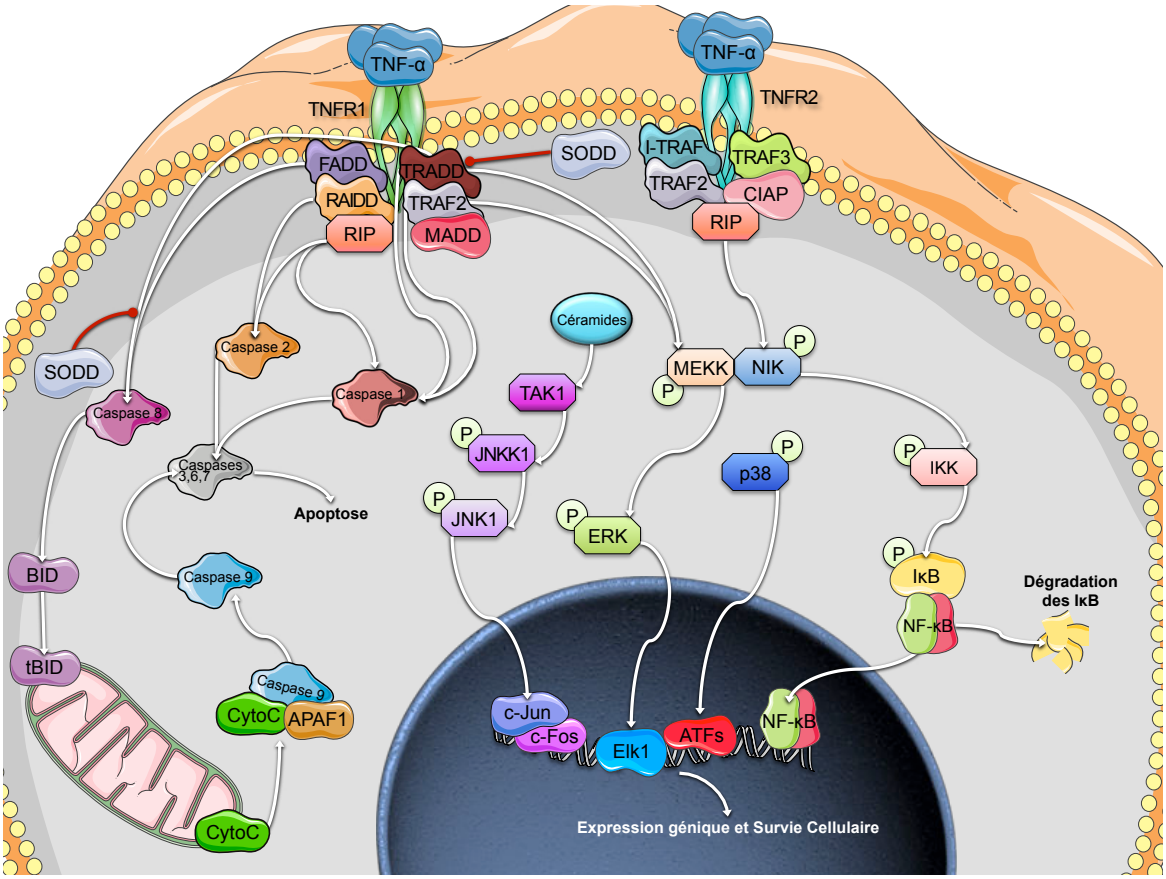


Figure 12. Signalisation du TNF-α (d'après SABiosciences). Le TNF-α induit des effets biologiques variés selon le type cellulaire. Le TNF-α agit en se liant au TNFR1 et au TNFR2 sur la surface cellulaire. TNFR1 serait le médiateur majoritaire de la cytotoxicité du TNF-α. La liaison du TNF-α à ses 2 récepteurs induit le recrutement de transducteurs de signal qui active au moins 3 effecteurs différents. A travers de complexes cascades et réseaux de signalisation, ces effecteurs mène à l'activation de caspases et de 2 facteurs de transcription AP-1 (« activation protein-1 ») et NF-κB. Quand le TNF-α se lie au TNFR1, la protéine TRADD (TNFR-Associated Death Domain) se lie au TNFR1. Alors, TRADD recrute FADD (« Fas-Associated Death Domain »), RAIDD (« RIP-Associated ICH-1/CED-3-homologous protein with a Death Domain »), MADD (« MAPK Activating Death Domain ») et RIP (« Receptor-Interacting Protein »). La liaison de TRADD et FADD au TNFR1 induit le recrutement, l'oligomérisation et l'activation de la caspase 8. L'activation de la caspase 8 initie alors une cascade protéolytique incluant d'autres caspases (caspases 3, 6, 7) et induit enfin l'apoptose. La caspase 8 clive aussi BID (« BH3 Interacting Death Domain »). tBID (« Truncated BID ») détériore la membrane mitochondriale externe cause la libération des facteurs pro-apoptotiques CytoC (Cytochrome-C). Le CytoC se lie au APAF1 (« Apoptotic Protease Activating Factor-1 »), qui recrute la caspase 9 et peut à son tour activer la caspase 3. TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor-2) a été impliquée dans l'activation de 2 différentes voies menant à l'activation de AP-1 via JNK (« Jun NH2-terminal Kinase »), MEKK (« MEK Kinase »), p38 et, avec RIP, l'activation du NF-κB, *via* la NIK (« NF-κB -Inducing Kinase »). Le TNF-α active les MAPKs (« Mitogen Activated Protein Kinases »): ERK1 et ERK2 (« Extracellular signal-Regulated Kinases » 1 et 2). La surexpression de SODD (« Silencer Of Death Domains »), supprime la mort cellulaire induite par le TNF-α et l'activation de NF-κB. La liaison au TNFR2 peut induire la cytotoxicité vis-à-vis de tumeurs ou autres types cellulaires, mais aussi induire l'expression de molécules du MHC (« major histocompatibility complex ») et d'adhésion.

On notera que le TNF- α existe sous forme membranaire et soluble (après clivage depuis la membrane) qui peuvent toutes deux se lier à deux récepteurs membranaires, TNFR1 et TNFR2 (« TNF receptor 1 » et « TNF receptor 2 »). Le TNFR1, exprimé par la plupart des tissus, est le récepteur de signalisation majeur pour le TNF-α et le TNFR2, qui lie TNF-α et TNF-β, est exprimé majoritairement exprimé par les cellules immunitaires et participe seulement à des réponses biologiques limitées. Les voies de signalisation que TNFR1 et TNFR2 engagent sont détaillées dans la figure 12.

Au cours de mes travaux de thèse, je me suis particulièrement intéressée à un sous-groupe de cytokines, les chimiokines.

2.2.2. Les chimiokines

Les chimiokines (pour « chemotactic chemokines ») sont de petites protéines (8-14 kDa) se liant à l'héparine. Ces protéines sont majoritairement connues pour leur capacité à diriger le mouvement des leucocytes circulants vers les sites d'inflammation ou de lésion. En effet, les chimiokines et leurs récepteurs ont été originellement étudiés pour leurs rôles dans l'inflammation, elles sont connues pour jouer un rôle dans le mouvement des mononucléaires dans tout le corps, permettant la réponse immunitaire adaptative et contribuant à la pathogenèse d'un certain nombre de maladies (Charo and Ransohoff, 2006).

En réalité, les chimiokines sont capables de chimio-attraction de cellules immunitaires, mais aussi non-immunitaires, à la fois *in vitro* et *in vivo.* Notamment, il a été montré que les actions des chimiokines et que leurs interactions avec des récepteurs spécifiques vont au-delà de leur rôle originellement attribué, le recrutement des leucocytes vers les tissus enflammés.

En effet, l'expression de récepteurs de chimiokines dans des éléments périphériques ainsi que dans des cellules résidentes du SNC suggère un système de communication intéressant dans des conditions neuroinflammatoires.

De plus, depuis quelques années, des études suggèrent l'implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans des processus physiologiques, tant au niveau périphérique qu'au niveau central. La présence et les fonctions du système chimiokinergique (les chimiokines et leurs récepteurs) au niveau central en conditions physiologiques, discutés plus loin, suggère qu'en cas d'inflammation, celui-ci participe aux dérégulations observées.

- ***Les chimiokines et leurs récepteurs : structure et nomenclature***

Jusqu'à aujourd'hui, plus de 50 chimiokines ont été découvertes (figure 13) et classées de manière systématique en 4 familles, d'après leur structure (c'est-à-dire le nombre et l'espacement des résidus cystéine trouvés à leur extrémité N-terminale). Ces familles sont nommées CXC (ou α), CC (ou β), CX3C (ou δ) et C (ou γ). Les chimiokines, à l'exception de la famille C, comportent quatre résidus cystéine en région N-terminale, qui forment des ponts disulfures qui déterminent leur structure tridimensionnelle. En principe, toutes les chimiokines ont la même structure monomérique : une région N-terminale flexible précède le premier résidu cystéine, et est impliquée dans l'activation du récepteur. Après la région N-terminale, on trouve une boucle N-terminale de 10 à 20 résidus, généralement impliquée dans la spécificité au récepteur, puis une courte hélice 3_{10}, un feuillet β de trois brins antiparallèles β, et une hélice α C-terminale accolée au feuillet β. Cependant, la structure quaternaire des chimiokines est vraisemblablement spécifique de chaque famille de chimiokines (Lolis and Murphy, 2007).

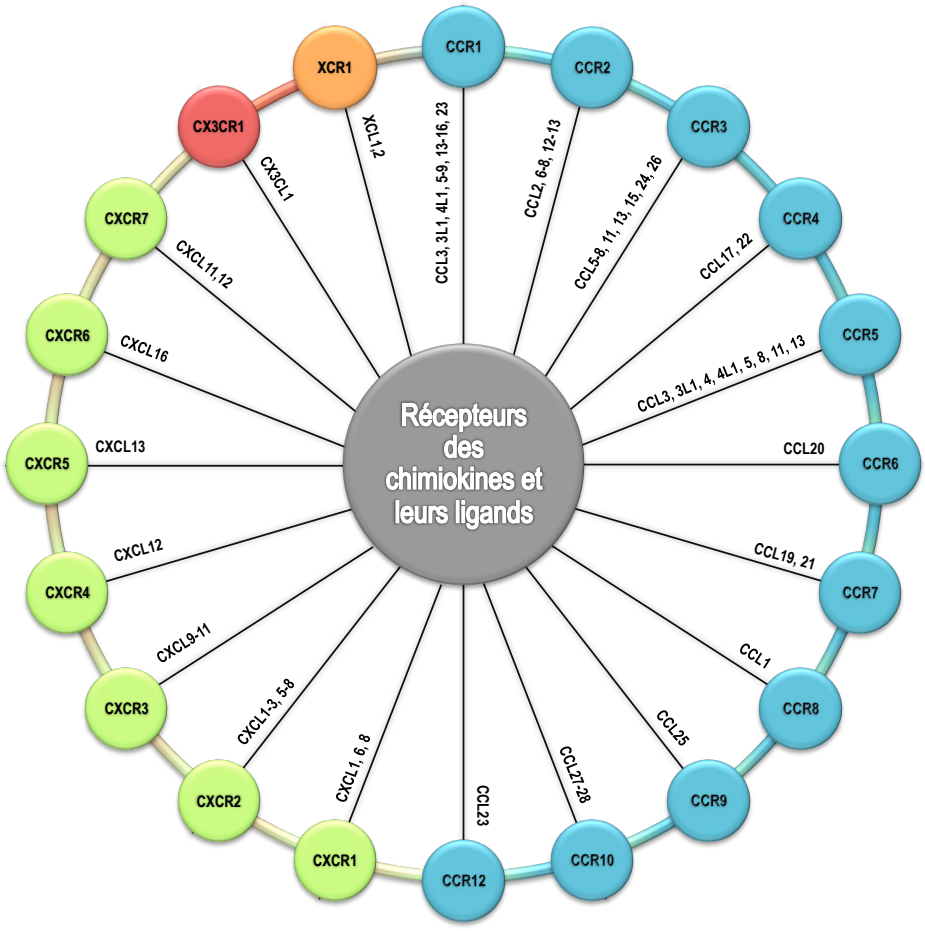


Figure 13. Récepteurs des chimiokines et leurs ligands adapté de (White et al., 2013). Les récepteurs des chimiokines peuvent avoir un ou plusieurs ligands et les chimiokines peuvent exercer leurs actions en se liant à un ou plusieurs récepteurs. Par exemple, CCL2 ne se lie qu'au CCR2, mais le CCR2 a plusieurs autres ligands et CCL5 peut se lier à trois récepteurs, CCR1, CCR3 et CCR5 qui ont eux aussi plusieurs ligands possibles.

Les chimiokines exercent leurs effets biologiques *via* des récepteurs de surface appartenant à la superfamille des récepteurs à sept hélices transmembranaires et couplés aux protéines G (*ie.* des RCPG). La taille des récepteurs de chimiokines est approximativement de 40 kDa. La plupart des chimiokines se lient à plusieurs récepteurs différents et la plupart des récepteurs de chimiokines lient plusieurs chimiokines différentes (figure 13).

La liaison d'une chimiokine à son récepteur induit des voies de signalisation distinctes et spécifiques de chaque paire chimiokine/récepteur. Néanmoins, la plupart des effets induits par le chimiokines sont inhibés par la toxine pertussique, il semble donc que la plupart des récepteurs des chimiokines soient couplés à une protéine de la famille Gi. De manière dépendante ou non à la libération de la sous-unité de protéine G αi, les chimiokines ont été montrés comme activant les voies de la phospholipase C (PLC), de PI3-K/Akt ou encore des MAPK (Bajetto et al., 2002; Cartier et al., 2005).Par ailleurs, l'activation de la voie des chimiokines dans les neurones a été montrée comme activant, en plus des cascades de signalisation mentionnées précédemment, la voie ERK (« extracellular signal-regulated kinase ») ou encore la c-jun N-terminal kinase (JNK) (Gosselin et al., 2005) (figure 14).

Il est intéressant de noter que des récepteurs atypiques de chimiokines existent aussi : ils ne transduisent pas tous les signaux des récepteurs « classiques » induisant la chimiotaxie ou d'autres réponses cellulaires, mais peuvent influencer la disponibilité et la fonction des chimiokines.

Les chimiokines et leurs récepteurs sont désignés par le nom de leur famille, suivi par « L » ou « R », symbolisant un ligand ou un récepteur respectivement, et finalement par un nombre, spécifique de la molécule en question (ex. CX3CL1 et CX3CR1, CCL2 et CCR2, CCL5 et CCR1, CCR2 et CCR3).

On notera qu'en plus de cette classification structurale, d'autres classifications existent, sur la base des rôles fonctionnels des chimiokines : pro- et anti-inflammatoires, ou encore, en trois groupes distinguant chimiokines inflammatoires, homéostatiques et double-fonction. Les chimiokines inflammatoires sont essentiellement régulées à la hausse durant l'inflammation et sont principalement impliquées dans le recrutement des leucocytes vers les tissus enflammés. Les chimiokines homéostatiques sont exprimées de manière constitutive dans les divers organes dont les organes lymphoïdes, et sont impliquées la migration et le guidage normaux de cellules diverses, dont les leucocytes. Enfin, les chimiokines double-fonction ne peuvent pas être assignée à aucune des deux catégories précédentes sans ambiguïté.

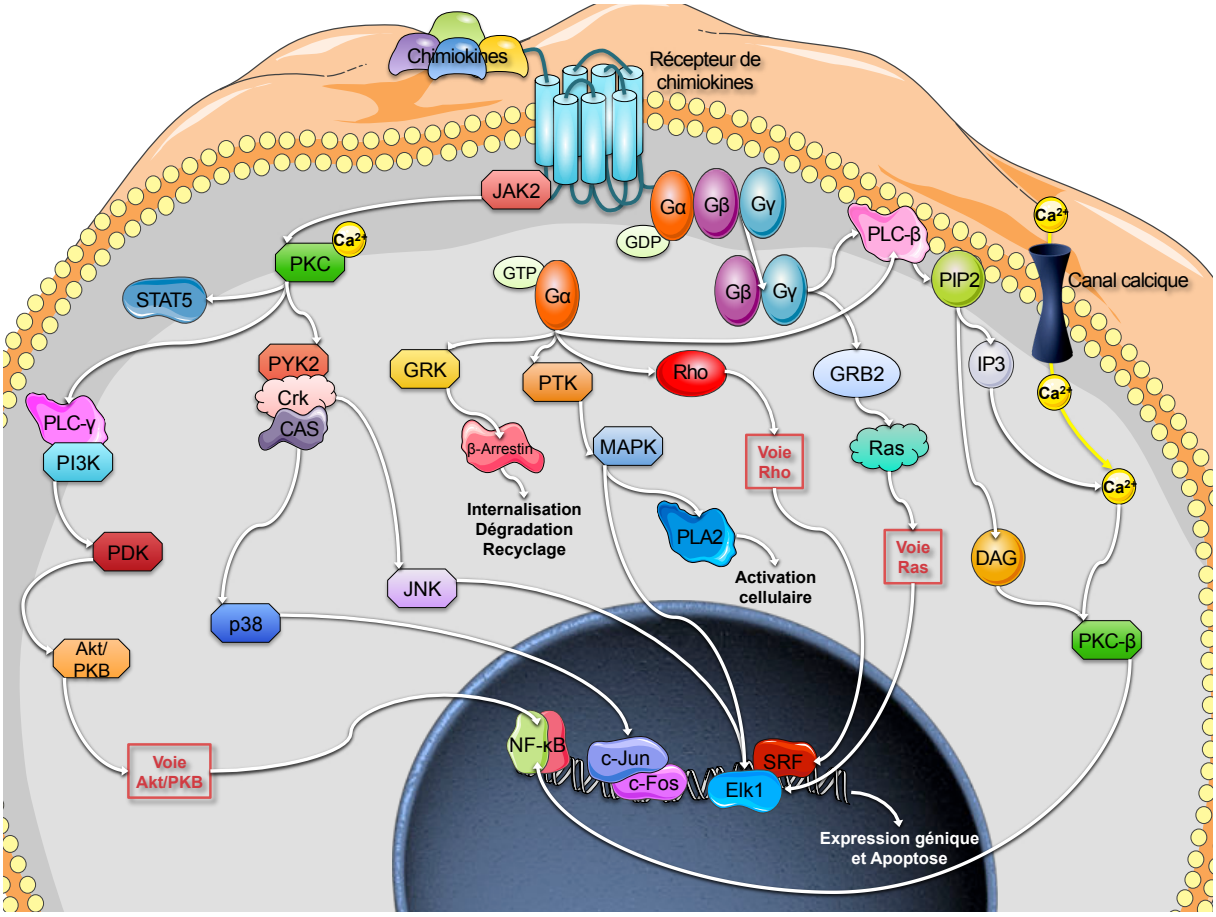


Figure 14. Signalisation des chimiokines (d'après SABiosciences). Les chimiokines médient leurs effets par liaison à leurs récepteurs, des RCPG. Lors de la liaison du ligand, les récepteurs des chimiokines s'associent à des protéines G, facilitant l'échange du GDP (guanosine diphosphate) en GTP (guanosine triphosphate), c'est-à-dire l'activation des protéines G. Dans l'état actif les protéines G se dissocient, qui activent différentes voies de signalisation, induisant divers phénomènes, allant de changements du cytosquelette, à la croissance cellulaire, ou à l'apoptose par exemple. Les sous-unités Gβ et Gγ activées induisent l'hydrolyse du PIP2 (phosphatidylinositol-4-5-biphosphate) générant de l'IP3 (1,4,5-inositol triphosphate). Et du DAG (1,2-diacylglycérol)., dont une conséquence immédiate est la libération de calcium depuis les stocks intracellulaires). On notera que l'induction de la mobilisation des stocks de calcium est une activité souvent utilisée pour déterminer l'activité des chimiokines. Par ailleurs, la sous-unité Gα peut activer différents effecteurs intracellulaires tels que Ras, Rho, la PLA2 (phospholipase A2), la PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase), les MAPK (mitogen-activated protein kinase). Ce faisant, les chimiokines peuvent participer à divers processus physiologiques et physiopathologiques. *CAS, Crk-associated substrate ; JAK2, Jnk activated kinase 2 ; GRB2, Growth factor receptor-bound protein 2 ; GRK, G-protein coupled receptor kinase ; PKC, protein kinase C ; PDK, phosphoinositide dependent protein kinase; PTK, protein tyrosine kinase; PYK2, protein tyrosine kinase 2 ; SRF, serum response factor; STAT5, Signal Transducer and Activator of Transcription 5.*

- ***Les chimiokines dans le système nerveux central***

Comme mentionné précédemment, des cellules du SNC expriment constitutivement à la fois les chimiokines et leurs récepteurs : dans le cerveau, c'est le cas des cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes et microglie), des cellules endothéliales et des neurones. En conséquence, en plus de leur rôle bien documenté dans le système immunitaire, le système chimiokinergique pourrait participer dans des processus physiologiques et physiopathologiques importants dans le SNC, à travers une activité para- ou autocrine (Cardona et al., 2008a) (figure 15).

Cette hypothèse est appuyée par sa distribution spécifique dans le cerveau et son interaction avec divers systèmes de neurotransmetteurs ou neuropeptidergiques (Adler and Rogers, 2005; Rostene et al., 2011).

Les rôles physiologiques des chimiokines impliquent majoritairement (1) la chimiotaxie, impliquée dans le développement du SNC et dans la migration, le guidage et le renouvellement de diverses cellules, dont les précurseurs neuraux dans le cerveau adulte, et (2) la neuromodulation (modulation de la libération de neurotransmetteurs et de neuropeptides avec induction présynaptique de glutamate, de GABA, et/ou augmentation postsynaptique des niveaux de Ca^{2+} intracellulaires), comme illustré par l'effet de CXCL12 sur la décharge des neurones à vasopressine (AVP) et sur la libération d'AVP (Callewaere et al., 2006; Rostene et al., 2007) ou encore sur l'activité des neurones à MCH ou sur des cultures primaires de neurones hypothalamiques (Guyon et al., 2005a; Guyon et al., 2005e).

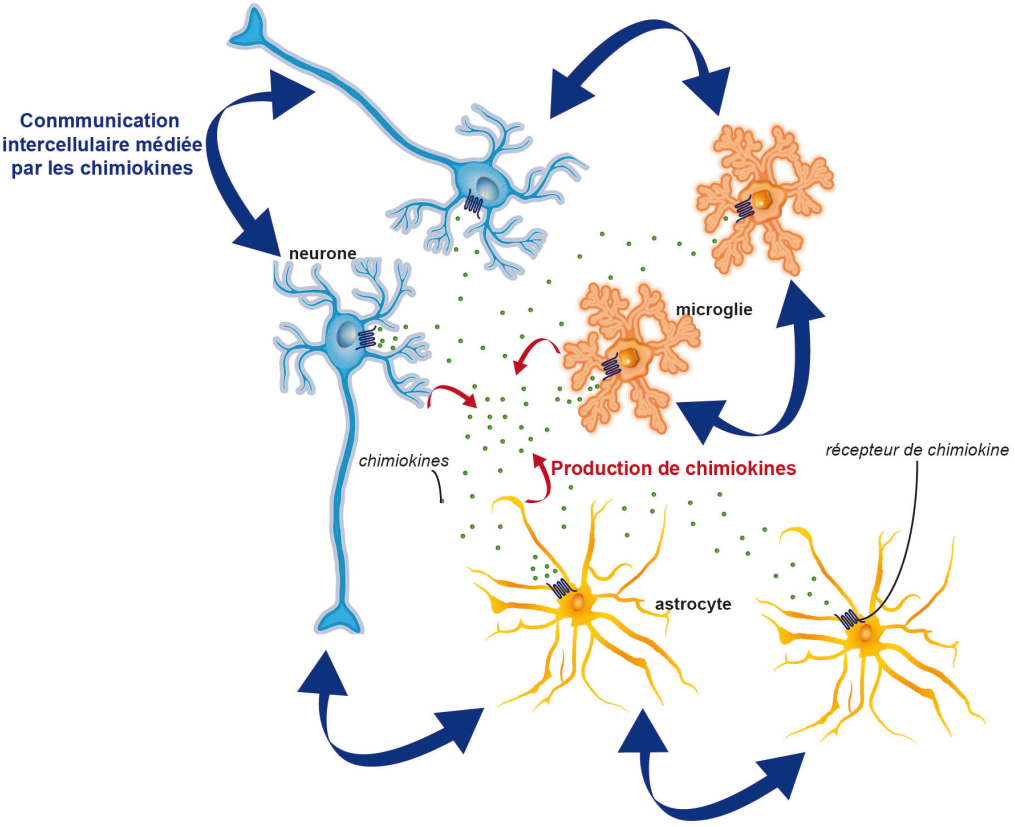


Figure 15. Les chimiokines participent à la communication entre les différentes cellules du cerveau. Dans le cerveau, divers types cellulaires, tels que les neurones, les astrocytes et la microglie, produisent des chimiokines et expriment des récepteurs des chimiokines à la fois en conditions physiologiques et pathologiques. De ce fait, les chimiokines peuvent médier la communication neurone-astrocyte, neurone-microglie, microglie-astrocyte, microglie-microglie, astrocyte-astrocyte et neurone-neurone. Ces interconnections impliquent les chimiokines dans des contextes physiologiques et physiopathologiques.

Donc, en plus de la médiation des réponses immunitaires, les chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués dans des processus physiologiques importants pour assurer un fonctionnement cérébral normal, en participant au dialogue entre neurones, cellules gliales et les cellules immunitaires périphériques.

Entre contextes inflammatoires physiologiques et physiopathologiques, le principal changement à propos des chimiokines concerne l'augmentation de leur expression, qui pourrait expliquer, au moins en partie, la différence des effets que peut entraîner une même paire chimiokine/récepteur. En effet, durant une inflammation, les chimiokines sont régulées positivement et leur caractéristique la plus décrite est la chimioattraction de cellules immunitaires depuis la périphérie vers le cerveau, qui à leur tour maintiennent l'inflammation *via*, parmi d'autres mécanismes, la sécrétion de chimiokines. Les chimiokines ont aussi été impliquées dans l'activation de la microglie résidente et des astrocytes (Ambrosini and Aloisi, 2004). Le recrutement et l'activation de ces types cellulaires induisent la libération de facteurs inflammatoires qui peuvent devenir délétères pour la survie et le fonctionnement neuronal (Ambrosini and Aloisi, 2004).

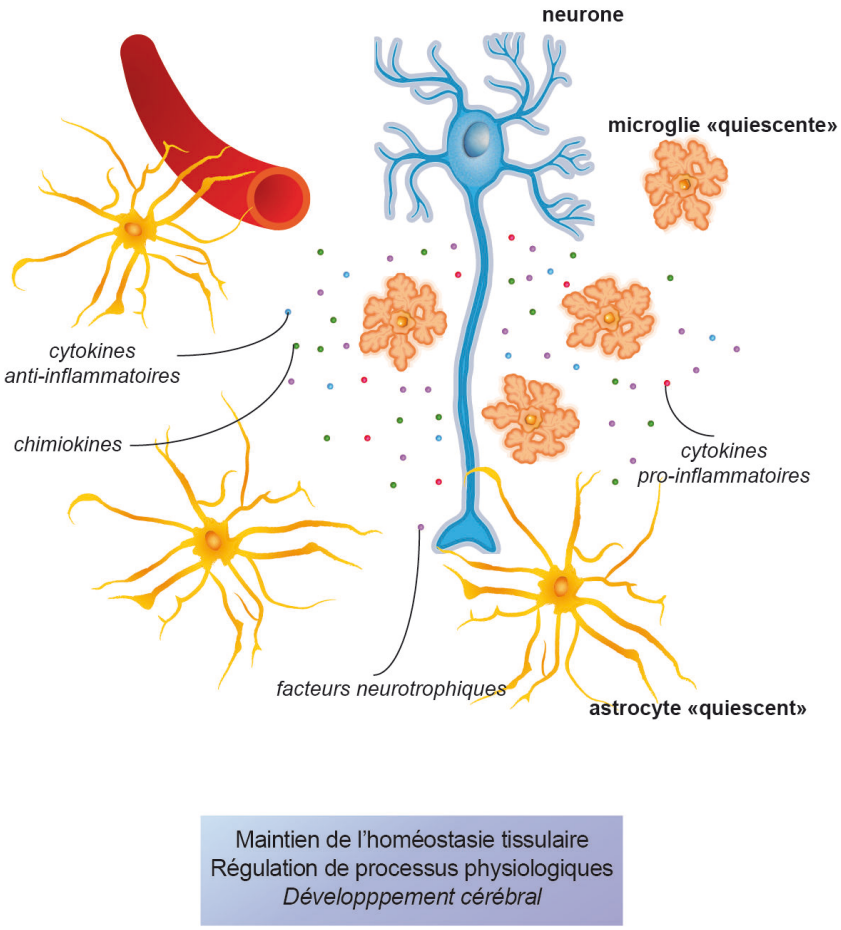


Figure 16. Effets des chimiokines dans le SNC en conditions physiologiques. Dans l'encadré: processus auxquels les chimiokines participent. En conditions physiologiques, les neurones, les astrocytes et la microglie sont en contact direct. Quand ils ne sont pas activés, ou « quiescents », les astrocytes et la microglie participent au maintien de l'homéostasie tissulaire et à la régulation de fonctions cérébrales (remodelage de synapses, surveillance du parenchyme cérébral pour détecter des pathogènes ou des lésions,…) qui nécessitent la production et la libération de facteurs neurotrophiques et de cytokines et chimiokines pro- et anti-inflammatoires. En conditions physiologiques, les chimiokines participent donc au maintien de l'homéostasie tissulaire et à la régulation de processus physiologiques dans le SNC, ainsi qu'au développement cérébral.

Par ailleurs, notre hypothèse est que les chimiokines pourraient exercer des effets neuromodulateurs altérés en conditions inflammatoires. Les chimiokines et leurs récepteurs

sont suspectés d'être des médiateurs majeurs des effets de la neuroinflammation, depuis l'attraction des cellules immunitaires jusqu'aux changements comportementaux. En effet, d'une part, le système chimiokinergique participe à la réponse immunitaire et d'autre part, ce système est exprimé dans le cerveau constitutivement et de manière non-homogène, en termes de régions et de cellules les exprimant, comme c'est le cas de systèmes de neurotransmetteurs et neuropeptidergiques. De plus, le système chimiokinergique a été montré comme interagissant avec des systèmes de neurotransmetteurs et neuropeptidergiques spécifiques, et des études récentes suggèrent qu'il est capable de moduler l'activation de neurones de manière directe (Reaux-Le Goazigo et al., 2013). Ainsi, le système chimiokinergique pourrait être responsable de changements comportementaux associés à l'inflammation.

Nos études nous auront amenés à nous concentrer sur 2 chimiokines particulières, CCL2 et CCL5, et leurs récepteurs.

- ***CCL2 et son récepteur CCR2***

CCL2, ou MCP-1 (« monocyte chemoattractant protein-1 ») est un membre des protéines chimio-attractrices de monocyte (MCPs, « monocyte chemoattractant proteins »), un groupe de chimiokines de la famille CC connues pour le recrutement des monocytes vers les tissus lésés après trauma, infection, exposition à des toxines ou ischémie. A l'heure actuelle, cinq MCPs ont été identifiées et décrites : CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4), et CCL12 (MCP-5) (Bacon et al., 2002). Elles partagent une homologie de séquence et une similarité structurale de 60–70%. CCL2 a été la première découverte et est la mieux décrite. Chez l'Homme, CCL2 est composée de 76 acides aminés, et son poids moléculaire avoisine les 15 kDa (Van Coillie et al., 1999).

De nombreux types cellulaires, comme les cellules endothéliales, les cellules de muscle lisse, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les monocytes, les astrocytes, les cellules microgliales et les neurones, peuvent produire CCL2, que ce soit constitutif ou induit par certains agents ou conditions tels que le stress oxydatif, des cytokines ou des facteurs de croissance (Deshmane et al., 2009). Nous noterons tout de même que les monocytes/macrophages sont la source principale de CCL2.

Il a été démontré que chaque membre de la famille des MCPs attire un sous-ensemble spécifique de leucocytes après liaison à leurs différents récepteurs (Gouwy et al., 2004). Bien que le récepteur CCR2 (« CC-chemokine receptor 2 ») puisse lier à la fois CCL2, CCL7 et CCL8, il a été montré que CCL2 est son ligand le plus efficace pour l'activation des voies de transduction de signal induisant la transmigration des monocytes *via* le CCR2 (Sozzani et

al., 1994). Par ailleurs, CCL2 se lie très préférentiellement, voire uniquement, au CCR2 (figure 13) et son rôle le plus décrit est la régulation de la migration et de l'infiltration des monocytes, des lymphocytes T mémoire et des cellules NK.

A la différence de CCL2, l'expression de CCR2 est relativement restreinte. Il existe deux formes issues d'un épissage alternatif de CCR2, CCR2A et CCR2B, qui ne diffèrent l'un de l'autre que par leur extrémité C-terminale (Charo et al., 1994). CCR2A est l'isoforme majoritairement exprimée par les cellules mononucléaires ou les cellules du muscle lisse (Bartoli et al., 2001), alors que les monocytes et les cellules NK activées expriment surtout CCR2B. Il est possible que les deux isoformes activent des voies de signalisation différentes et induisent des effets différents. Par exemple, la chimiotaxie par CCL2 des cellules exprimant CCR2A est indépendante de la mobilisation de Ca^{2+}, alors qu'il y a influx calcique dans les cellules exprimant le CCR2B (Cho et al., 2007; Sanders et al., 2000). Il faut noter que CCR2 a des rôles à la fois pro- et anti-inflammatoires : le rôle pro-inflammatoire de CCR2 est dépendant des cellules présentatrices d'antigène (CPA) et des cellules T, alors que le rôle anti-inflammatoire de CCR2 dépend de l'expression de CCR2 sur les cellules T régulatrices.

Au-delà de sa liaison au CCR2, CCL2 peut se lier à des récepteurs atypiques (mentionnés précédemment). Il s'agirait de récepteurs « leurres » permettant notamment de réguler les niveaux de CCL2, important pour le maintien de l'homéostasie. Les récepteurs atypiques liant CCL2 les plus connus sont D6 et DARC (« duffy antigen receptor for chemokines »), qui ne lient pas spécifiquement CCL2 et lient plusieurs cytokines avec la même affinité, renforçant le concept de récepteurs « éboueurs».

CCL2 serait impliquée dans l'arthrite rhumatoïde (Hayashida et al., 2001), l'athérosclérose (Kusano et al., 2004) ou encore le diabète de type 2 (Sartipy and Loskutoff, 2003).

Au niveau central, CCL2 et CCR2 seraient tous deux exprimés dans l'hypothalamus, notamment dans l'ARC et le LHA (Kasukawa et al., 2011). Le rôle principal attribué à CCL2 dans le SNC a longtemps été que, sécrété par les astrocytes activés, elle attirerait la microglie aux sites d'infection ou de lésion neuronale où la microglie phagocyterait les microbes ou les débris cellulaires (Barna et al., 1994; Boddeke et al., 1999; Cross and Woodroofe, 1999; Glabinski et al., 1996; Gourmala et al., 1997; Hayashi et al., 1995; Hurwitz et al., 1995; Ransohoff et al., 1993). Cependant, comme mentionné auparavant, CCL2 peut aussi être produite par la microglie elle-même, les cellules endothéliales (Berman et al., 1996; Gourmala et al., 1997; Hausler et al., 2002; Thibeault et al., 2001) et les neurones (Banisadr et al., 2005a; Banisadr et al., 2005d; Meng et al., 1999) en conditions basales et neuroinflammatoires. Les monocytes périphériques peuvent aussi migrer dans le SNC en

réponse à la neuroinflammation (Gourmala et al., 1997; Rankine et al., 2006; Serbina and Pamer, 2006). Dans ce cas, non seulement les monocytes mais aussi les cellules endothéliales des microvaisseaux du cerveau exprimant le CCR2 peuvent répondre au CCL2, augmentant la perméabilité de la BHE (Dzenko et al., 2001; Dzenko et al., 2005; Song and Pachter, 2004; Stamatovic et al., 2006; Stamatovic et al., 2003). De manière intéressante, il semble que la voie de signalisation CCL2/CCR2 soit importante dans l'attraction des progéniteurs neuraux aux sites de dommage neuronal (Belmadani et al., 2006). On notera que l'expression de CCR2 a été rapportée dans les neurones (Banisadr et al., 2005d; Banisadr et al., 2002; Coughlan et al., 2000; van der Meer et al., 2000) et dans les astrocytes (Andjelkovic et al., 2002; Croitoru-Lamoury et al., 2003). L'activation du CCR2 astrocytaire favorise leur survie via les voies de signalisation NF-κB (« nuclear factor-κB ») et Akt signaling (Quinones et al., 2008) et favoriserait la production de facteurs neurotrophiques (Kalehua et al., 2004).

Des études ont montré que CCL2, joue d'importants rôles dans le SNC, dans des troubles neurodégénératifs notamment. L'implication de CCL2 dans l'accident vasculaire cérébral, dans la maladie d'Alzheimer ou encore dans la sclérose en plaques a été démontrée (Conductier et al., 2010; Dawson et al., 2003; Le Thuc et al., 2015; O'Connor et al., 2015). En ce qui concerne CCR2 dans le cerveau, il a été impliqué dans la sclérose en plaques, l'accident vasculaire cérébral et l'a maladie d'Alzheimer notamment (Chu et al., 2014; Le Thuc et al., 2015; O'Connor et al., 2015).

- ***CCL5 et ses récepteurs CCR1, CCR3 et CCR5***

Le gène *ccl5* a été découvert en 1988 (Schall et al., 1988) et la protéine a été isolée et caractérisée pour la première fois en 1990 (Schall et al., 1990). CCL5, ou RANTES (pour « regulated upon activation normal T cell expressed and secreted »), est une chimiokine de 68 aa.

CCL5 a été montrée comme induisant la migration et le recrutement, *in vitro*, des lymphocytes T, des cellules dendritiques, des éosinophiles, des cellules NK, des mastocytes et des basophiles. Bien qu'on l'ait considérée, à l'origine, comme une cytokine spécifique des lymphocytes T (d'où son nom RANTES) (Schall et al., 1988), CCL5 est en fait produite par une multitude de types cellulaires : plaquettes, macrophages, éosinophiles, fibroblastes, cellules endothéliales, épithéliales, endométriales, les neurones, les astrocytes et la microglie. La variété des cellules exprimant CCL5 et qui sont impliquées dans ses effets l'impliquent dans de multiples processus biologiques : du contrôle du pathogène au

renforcement de l'inflammation dans des troubles aseptiques tels que le cancer ou l'athérosclérose (Levy, 2009).

Les récepteurs connus de CCL5 sont CCR1, CCR3 et CCR5 (« CC-family receptor », 1, 3 et 5, respectivement) (Murphy, 2002). CCL5 se lie préférentiellement à CCR5 et à CCR1 (Blanpain et al., 2001).

Lors du processus de recrutement de cellules *in vivo*, les oligomères de CCL5 sont immobilisés sur des glycosaminoglycanes (GAG) endothéliaux et interagissent avec les récepteurs par les leucocytes arrivant dans la circulation sanguine. Il est intéressant de noter que l'oligomérisation n'est pas nécessaire à l'activité de CCL5 *in vitro*, mais qu'elle est cruciale *in vivo,* tout comme la liaison aux GAG (Proudfoot et al., 2003). Il peut y avoir hétérodimérisation de CCL5 avec CXCL4, ce qui renforce les fonctions biologiques de CCL5 (Nesmelova et al., 2008). Par exemple, CXCL4 pourrait amplifier l'arrêt des monocytes sur l'endothélium CCL5-dépendant (von Hundelshausen et al., 2005). En ce qui concerne les récepteurs, ils sont fonctionnels en tant que monomères, mais ils peuvent aussi former des homo- ou des hétéro-dimères, ce qui leur permet l'acquisition de nouvelles propriétés, comme la co-internalisation, la désensibilisation croisée et une signalisation différentielle (Thelen et al., 2010).

Les oligomères de CCL5 interagissent avec les récepteurs au niveau de leurs 3 boucles extracellulaires et la portion amino-terminale (Allen et al., 2007). La formation du complexe ligand-récepteur active les sous-unités Gαi et Gβγ des protéines G, menant à l'augmentation des niveaux d'AMP cyclique, d'inositol triphosphate et de Ca^{2+} intracellulaire (Murphy, 2002). Ces éléments de signalisation induisent la polarisation cellulaire et la translocation de NF-κB, qui résulte en l'augmentation des capacités phagocytiques, la survie cellulaire et la transcription de gènes pro-inflammatoires, dont beaucoup sont des chimiokines et des récepteurs de chimiokines (Allen et al., 2007; Thelen and Stein, 2008). Il apparaît que CCL5 peut aussi induire une signalisation indépendante des protéines G (Appay and Rowland-Jones, 2001).

Une fois que la signalisation des protéines G a eu lieu, le complexe CCL5-récepteur est internalisé *via* endocytose clathrine-dépendante. Alors, les organelles et vacuoles cytoplasmiques sont recrutées pour réaliser le recyclage des récepteurs et/ou dégrader les complexes actifs chimiokine/récepteur. Ces effets sont importants pour la régulation des niveaux de récepteurs à la membrane externe, permettant la régulation de l'activité cellulaire et la réduction des niveaux extracellulaires de CCL5 et d'autres chimiokines, ce qui est essentiel pour le maintien de l'homéostasie (Cardona et al., 2008b; Mantovani and Locati, 2008). Comme pour CCL2, d'autres récepteurs participent au « nettoyage » de CCL5 : les

récepteurs atypiques mentionnés précédemment ; concernant CCL5, les récepteurs « leurres » se liant à CCL5 les plus connus sont DARC et D6 (Jamieson et al., 2005; Mantovani et al., 2001).

Des niveaux élevés de CCL5 ont été associés à des troubles et pathologies inflammatoires variées, tels que le rejet de greffes allogéniques (ou allogreffes), l'athérosclérose, l'arthrite, la dermatite atopique, des troubles inflammatoires des voies respiratoires, l'hypersensibilité retardée, glomérulonéphrite, endométrite ou encore des troubles neurologiques comme la maladie d'Alzheimer et certains cancers (Marques et al., 2013). Dans ces pathologies, CCL5 agirait par la promotion de l'infiltration leucocytaire vers les sites d'inflammation. Il a aussi été montré que CCL5 joue un rôle important dans la réponse immunitaire à une infection virale. Notamment, CCL5 et surtout CCR5 ont été impliqués dans l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En effet, CCR5 est le co-récepteur majeur permettant l'entrée de la souche NSI-HIV-1 du VIH dans les cellules. Par contre, le rôle de CCL5 dans le VIH semble ambivalent dans le sens où selon le contexte, CCL5 pourrait inhiber ou favoriser la réplication virale (Marques et al., 2013).

Au niveau central, CCL5 et ses récepteurs sont exprimés et certains de leurs rôles ont été rapportés. CCL5 et ses récepteurs seraient notamment exprimés dans certaines parties de l'hypothalamus, y compris l'ARC et le LHA (Kasukawa et al., 2011). On notera d'ailleurs qu'ils semblent agir à la fois dans la physiologie et dans la pathophysiologie. En physiologie, CCL5 a été associée à la migration neuronale et au développement cérébral, par exemple, elle induirait la migration et la différenciation vers un phénotype nociceptif d'un sous-ensemble de neurones du ganglion de la racine dorsale chez la souris (Bolin et al., 1998). Toujours dans l'aspect physiologique de la contribution de CCL5 dans le SNC, il a été rapporté qu'elle induit la prolifération de progéniteurs d'astrocytes dérivés de SNC de fœtus humain âgé de 5 semaines, en favorisant leur expansion et en inhibant leur différenciation à ce stade précis. Après 10 semaines de gestation, après l'expansion de ces cellules, au contraire, CCL5 inhibe les réponses prolifératives et favorise la survie cellulaire pour faciliter leur différenciation (Bakhiet et al., 2001). Ces effets âge-dépendants de CCL5 sur les astrocytes embryonnaires humains suggèrent le rôle primordial de CCL5 dans le développement cérébral. Du point de vue de la pathologie, CCL5 et ses récepteurs ont pu être associés à la sclérose en plaques. En effet, CCL5 a été détectée (parmi d'autres chimiokines) dans les plaques en état de démyélinisation active, avec de hauts niveaux d'inflammation (Simpson et al., 2000). De plus, des niveaux élevés de CCL5 ont été rapportés comme étant surtout associés aux cellules endothéliales vasculaires et aux astrocytes et ses récepteurs CCR1, CCR3 et CCR5 ont été retrouvés, dans les tissus post-

mortem de sujets atteints de sclérose en plaques, au niveau des macrophages spumeux[1] et de la microglie activée, au sein des lésions qui contiennent d'ailleurs les plus hauts niveaux de leurs ligands (Balashov et al., 1999; Simpson et al., 1998). De plus, toujours dans le contexte de la sclérose en plaques, des niveaux élevés de CCL5 dans le liquide céphalo-rachidien de sujets atteints de cette maladie. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, le peptide Aβ peut induire la production de CCL5 (parmi d'autres chimiokines) par les astrocytes et les oligodendrocytes, donc CCL5 pourrait participer à l'accumulation de cellules gliales autour des plaques séniles.

[1] *Macrophages spumeux : Les macrophages présents dans les lésions de sclérose en plaques contiennent des lipides reflétant l'ingestion et l'accumulation des lipides de la myéline. Les macrophages sont alors qualifiés de « spumeux » par rapport à leur aspect.*

3. Inflammation et troubles de la régulation centrale du comportement alimentaire et du poids corporel

Comme mentionné précédemment (voir Introduction, 1. Régulation centrale du comportement alimentaire et du poids corporel), l'homéostasie énergétique est finement régulée via une communication bidirectionnelle entre le cerveau et la périphérie ; l'hypothalamus est une région cérébrale capitale dans cette régulation, principalement par production et sécrétion de neuropeptides anorexigènes et orexigènes. Ainsi, il est aisé d'envisager qu'un défaut de la régulation de ces réseaux neuropeptidiques contribuerait à un CA anormal, qu'il s'agisse d'une perte d'appétit ou d'une surconsommation de nourriture. Or, cela a été largement établi par de très nombreuses études lésionnelles, pharmacologiques, génétiques,…

Par ailleurs, l'inflammation, notamment l'inflammation hypothalamique, a été associée à différentes dérégulations du CA : de forte ou de faible intensité, elle a pu être liée à une perte d'appétit et à l'obésité, respectivement (Braun and Marks, 2010; Velloso et al., 2008).

Or, ces dérégulations du CA représentent des problèmes de santé publique majeurs, notamment l'obésité, majoritairement due à une surconsommation de nourriture. En effet, l'obésité, qui ne cesse de se développer depuis la fin du XX^{ème} siècle, est fréquemment associée, entre autres, au diabète, aux maladies cardiovasculaires, à des pathologies hépatiques, à des cancers… qui peuvent être fatals. D'autre part, une perte d'appétit consécutive à certaines pathologies inflammatoires comme les cancers, en entraînant un déficit en ressources énergétiques, peut entraver la guérison.

3.1. Inflammation et perte de poids involontaire

3.1.1. Généralités sur la perte de poids involontaire

Un amaigrissement involontaire peut avoir de multiples causes, et est parfois le signe d'une maladie sous-jacente grave telle qu'un cancer, auquel cas, cette perte de poids est un symptôme auquel il est important de faire attention, notamment lorsque celle-ci est de 10% au minimum en un an.

L'amaigrissement involontaire serait dans la grande majorité des cas associé à des troubles psychiques tels que la dépression qui peut entraîner une perte d'appétit durable, et donc un amaigrissement. Comme suggéré plus haut, une perte de poids involontaire peut être consécutive à des causes organiques, notamment par des maladies du système digestif, mais aussi par des pathologies cardio-vasculaires, endocriniennes, auto-immunes, cancers… Voici quelques exemples : cancer (la perte de poids en est un des premiers

symptômes : 40% diagnostiquées avec un cancer auraient rapporté une perte de poids durant les mois précédents), maladie de Crohn (et autres maladies inflammatoires de l'intestin), maladie infectieuse (ex. infection au VIH, hépatite, tuberculose,…), maladie neurologique (démence, maladie de Parkinson…), maladie cœliaque (perte de poids liée à la malabsorption des aliments), ulcère digestif,…

La consommation abusive de certaines substances a aussi été décrite comme pouvant entraîner un amaigrissement involontaire (drogues, alcool et certains médicaments).

Par ailleurs, le vieillissement a souvent été associé à un amaigrissement, qui la plupart du temps est lié à une perte d'appétit induisant à terme à une malnutrition sévère.

Une perte de poids traduit de manière générale un déséquilibre de la balance énergétique en faveur des dépenses énergétiques face aux apports. Une perte de poids involontaire peut être expliquée par une diminution de la prise alimentaire (elle-même pouvant avoir différentes causes : malabsorption des nutriments, douleurs associées à l'ingestion de la nourriture et surtout une perte d'appétit (anorexie, à ne pas confondre avec l'anorexie mentale),…) mais aussi par une augmentation des dépenses énergétiques par augmentation du métabolisme de base (augmentation de la thermogenèse par exemple).

Il faut donc noter qu'une partie relativement importante des causes organiques de la perte de poids involontaire sont des maladies à composante inflammatoire intense.

3.1.2. L'inflammation de haut-grade dans la pathogenèse de la perte de poids involontaire

De nombreuses pathologies, aiguës ou chroniques (cancers, infections bactériennes, etc…), comptent parmi leurs symptômes l'anorexie et la perte de poids, voire la cachexie. Ceci contribue à une malnutrition et peut donc fortement affecter de manière négative la survie et la qualité de vie. Le dénominateur commun de ces pathologies est un état inflammatoire de « haut-grade », autrement dit, de forte intensité, qui pourrait jouer un rôle dans l'échec des systèmes hypothalamiques concernés, à réguler correctement le CA.

De nombreux états pathologiques bénins sont souvent accompagnées par une perte d'appétit, autrement dit, d'une anorexie, faisant partie d'une réponse classique de défense d'un organisme vis-à-vis d'une infection, d'une blessure etc, qualifiée de « comportement de maladie » (ou « sickness behavior » chez les anglosaxons). En effet, le comportement de maladie implique des changements comportementaux variés qui se développent en même temps que l'infection ou autre pathologie, en particulier au niveau de l'humeur et de l'homéostasie énergétique. Si l'anorexie est de courte durée, comme elle devrait l'être

normalement, similairement aux autres stratégies de lutte adoptées, elle est alors bénéfique et favorise la guérison.

Cependant, dans certains cas, notamment de cancers, la perte d'appétit, et donc de poids, peut perdurer. C'est alors que l'état du sujet va en se dégradant (malaises hypoglycémiques, aménorrhée chez la femme, ou encore une décalcification fragilisant les os et la chute de dents). Si l'anorexie, quelque soit son type et ses causes, se prolonge trop longtemps, les sujets malades peuvent entrer en cachexie, ce qui correspond à un état de maigreur pathologique accompagnée d'une asthénie profonde et d'une dysfonction des organes. Une anorexie trop prolongée peut même être mortelle. Parce qu'une anorexie et une perte de poids non résolues peuvent entraver la guérison, voire mener à la mort d'un sujet, il est important de mieux comprendre les mécanismes liant l'inflammation et les centres cérébraux de la régulation de l'homéostasie énergétique.

Au cours des dernières décennies, un certain nombre d'études ont souligné le rôle capital des cytokines pro-inflammatoires comme le l'IL-1β, l'IL-6 et le TNF-α, dans la perturbation du contrôle de l'homéostasie énergétique dans le syndrome d'anorexie-cachexie.

D'un point de vue mécanistique, les études portant sur le comportement de maladie ont montré que ce dernier peut être initié par des cytokines issues de la périphérie induite par des agents infectieux périphériques. De premières études avaient aussi montré que l'injection ICV d'IL-1β chez les rongeurs induisait de profonds changements comportementaux (Spadaro and Dunn, 1990). Parmi les premières preuves du rôle fondamental des cytokines centrales dans la régulation du comportement de maladie, il y a eu l'aspect cinétique après injection centrale ou périphérique de certaines cytokines (Banks et al., 2001; Kent et al., 1992b). Puis il a été montré que l'injection centrale de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1β empêche les effets induits par l'injection périphérique de la cytokine (Kent et al., 1992a; Kent et al., 1992c). Mettant en avant le rôle des cytokines comme médiateurs fondamentaux dans la réponse à une infection, des études ont montré que l'injection d'IL-1 centrale était toujours capable d'induire un comportement de maladie chez des souris dont le récepteur TLR4 du lipopolysaccharide (LPS) bactérien (composant de la membrane externe des bactéries à Gram négatif) était non-fonctionnel, au contraire de l'injection ICV de LPS (Johnson et al., 1997; Segreti et al., 1997).

Les cytokines impliquées dans l'induction et la régulation du comportement de maladie au niveau central, libérées directement dans la circulation par les cellules immunitaires peuvent être transportées au niveau cérébral (compte-tenu de la perméabilité accrue de la BHE causée par l'inflammation (Wispelwey et al., 1988)), ou directement produites par les neurones et les cellules gliales dans le SNC (Hopkins et Rothwell, 1995; Rothwell et

Hopkins, 1995; Licinio et Wong, 1997; Sternberg, 1997; Mantovani et al., 1998; Haslett, 1998). Dans le contexte de maladies systémiques, on notera que les effets centraux de ces cytokines sur semble indépendants du lieu de leur sécrétion.

Comme évoqué précédemment (voir Introduction, 2. L'inflammation), depuis la périphérie, les cytokines agiraient sur le cerveau par deux voies principales : une voie neurale (depuis les afférences neuronales primaires qui innervent le site infecté) et une voie humorale, impliquant la production de cytokines par des cellules immunitaires au niveau des OCV et du plexus choroïde. Les cytokines diffuseraient alors vers ses cibles cérébrales (Konsman et al., 2002).

La plupart des cytokines agissent au niveau du site d'infection, de manière paracrine. Ainsi, les afférences neurales peuvent être la cible de cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, il est intéressant de noter que le nerf vague innervant les organes de la cavité abdominale contient des macrophages et des cellules dendritiques produisant notamment de l'IL-1 en réponse au LPS. Or, les neurones sensoriels du nerf vague exprime des récepteurs à l'IL-1, et l'IL-1 stimule l'activité sensorielle du nerf vague (Konsman et al., 2002). Le rôle important du nerf vague dans la transmission d'information depuis la périphérie vers le cerveau a été démontrée par des expériences de vagotomie : les afférences vagales ont été montrées comme médiant une partie de l'induction du comportement de maladie, de l'activation neurale du tronc cérébral, de l'hypothalamus et des structures limbiques après injection de LPS ou d'IL-1 en périphérie (Konsman et al., 2002).

Plus lente que la voie neurale, la voie humorale de transmission d'informations depuis le système immunitaire en périphérie vers le cerveau. Elle implique des intermédiaires moléculaires au niveau de l'interface sang-cerveau répondant à des cytokines ou débris de pathogènes circulants. Ce sont les PGE2 qui semblent représenter les acteurs majeurs de la fièvre et de l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) induites par les cytokines (Konsman et al., 2002). Les PGE2 agissent sur des neurones du tronc cérébral et de l'hypothalamus (Konsman et al., 2002). Par ailleurs, comme mentionné précédemment, l'IL-1β peut être synthétisée par des cellules immunitaires dans les OCV et dans les plexus choroïdes en réponse à un stimulus immunitaire périphérique, et la diffusion de l'IL-1β depuis l'éminence médiane jusqu'à l'ARC pourrait expliquer au moins partiellement l'anorexie induite par les cytokines (Konsman et al., 2002). Notons que la nature des neuromédiateurs responsables des effets centraux de l'IL-1β ont été peu décrits.

De manière intéressante, l'administration chronique de ces cytokines est capable de reproduire les caractéristiques du syndrome d'anorexie-cachexie (Gelin et al., 1991; Mantovani et al., 1998; Matthys and Billiau, 1997; Moldawer et al., 1992; Tisdale, 1997) alors

que l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre le TNF en inhibe le développement (Matthys and Billiau, 1997; Noguchi et al., 1996; Sherry et al., 1989). De plus, l'administration d'un antagoniste du récepteur de l'IL-1β empêche l'anorexie dans des modèles animaux de cancer (Laviano et al., 2000). Il a été montré que l'IL-1 endogène du cerveau était un médiateur de l'anorexie induite par le LPS en agissant sur l'expression de cytokines dans l'hypothalamus (Laye et al., 2000) et il semblerait que l'IL-1β puisse agir sur les neurones POMC de l'ARC (Scarlett et al., 2007) alors que le TNF-α favoriserait indirectement la dépense énergétique par signalisation β3 adrénergique au tissu adipeux brun (Arruda et al., 2011). Il a été montré par différentes approches que l'atténuation de l'inflammation coïncide avec une réduction de l'inflammation hypothalamique et empêche la perte de poids chez des animaux modèles d'anorexie. Par exemple, l'inhibition de l'AMPK (« AMP (adenosine monophosphate) protein kinase ») dans l'hypothalamus réduit l'inflammation hypothalamique mais augmente aussi la prise alimentaire dans l'anorexie induite par le cancer et permet une meilleure survie générale (Ropelle et al., 2007). De plus, le traitement avec administration de ghréline, hormone « de faim », diminue l'expression de l'IL-1β et augmente la prise alimentaire (DeBoer et al., 2007).

Comme mentionné auparavant, un modèle couramment utilisé pour l'étude de l'anorexie liée à l'inflammation est celui de l'injection péritonéale (IP) de LPS chez les mammifères (Alexander and Rietschel, 2001). Ce modèle induit un comportement de maladie chez les animaux, avec, entre autres, induction d'une fièvre, activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et anorexie. Or, les aspects métaboliques, physiologiques et comportementaux du comportement de maladie semblent dépendants de signaux moléculaires impliqués dans la réponse inflammatoire locale, tels que les cytokines (IL-1, IL-6, TNF-α, par exemple) qui sont libérées par les cellules immunitaires activées. Il a été notamment postulé que l'anorexie induite par le LPS est indépendante des afférences vagales, suggérant que l'anorexie dépend uniquement de mécanismes inflammatoires centraux et que les effets centraux du LPS périphérique pourraient être, entre autres, médiés par des cytokines et/ou *via* les récepteurs au LPS exprimés par certaines cellules du cerveau (Ueta et al., 2007; Wisse et al., 2007).

En effet, il est connu que les cellules microgliales expriment le TLR4, récepteur du LPS. Or, Hines et ses collaborateurs ont montré que bloquer la signalisation du TLR4 empêche l'activation de la microglie, inhibe la production de cytokines et prévient le développement du comportement de maladie induits par le LPS périphérique (Hines et al., 2013).

Des études ont examiné les changements dans les expressions géniques de neuropeptides hypothalamiques anorexigènes et orexigènes chez des souris ou des rats injectés en IP

avec du LPS (Gayle et al., 1999; Ogimoto et al., 2006; Sergeyev et al., 2001). D'une manière générale, il semble que le LPS périphérique diminue dans un premier temps l'expression des peptides orexigènes et au contraire augmente celle des peptides anorexigènes, puis, dans des phases plus tardives, l'expression des peptides orexigènes ré-augmente probablement pour favoriser de nouveau le prise alimentaire et compenser la perte de poids. Cependant, les médiateurs liant l'inflammation et ses conséquences au niveau des systèmes centraux régulant l'homéostasie énergétique, et finalement sur le poids, n'ont pas été déterminés de manière certaine.

3.2. Inflammation et obésité

De manière intéressante, l'inflammation est une caractéristique à un autre trouble de la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel opposé : l'obésité.

3.2.1. Généralités sur l'obésité

L'obésité, reconnue comme maladie en 1997 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), n'a eu cesse de progresser ces dernières années, de manière inquiétante, menant l'OMS à la qualifier de pandémie. Elle se caractérise par un excès de masse grasse, réparti dans tout l'organisme, et pouvant nuire à la santé. Un individu est considéré obèse dès lors que son Indice de Masse Corporelle (IMC)[2] est supérieur ou égal à 30 (figure 17).

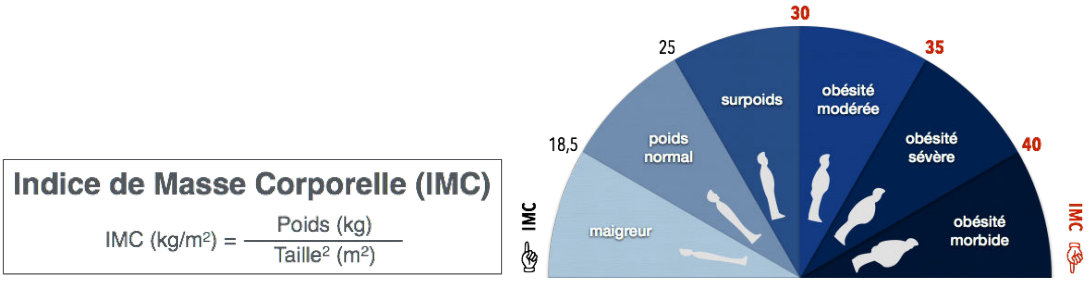


Figure 17. L'indice de masse corporelle (IMC). Formule de calcul de l'IMC. Qualification de l'état corporel d'un individu en fonction de l'IMC.

A l'échelle mondiale, près de 13% de la population adulte (11% des hommes et 15% des femmes) étaient obèses en 2014. Il est intéressant de noter que la prévalence de l'obésité a plus que doublé entre 1980 et 2014 et le développement de l'obésité infantile est inquiétant : environ 42 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids ou obèses en 2013. Par ailleurs, surpoids et obésité augmentent aussi de façon spectaculaire dans les pays à faible ou moyen revenu, surtout en milieu urbain. Actuellement, surpoids, obésité et les troubles qui leur sont associés provoquent davantage de décès que l'insuffisance pondérale.

[2] *IMC : rapport de la masse en kg d'un individu par sa taille en m*

En France, l'Enquête ObEpi, Roche de 2012 comptait 32,3% de la population adulte française comme étant en surpoids, et 15% comme obèses soit près de 7 millions d'individus contre 3,4 millions environ en 1997 date de début de la première Enquête ObEpi.

La dangerosité de l'obésité se situe notamment dans le fait qu'elle représente un facteur de risque de maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle, cardiopathies, accidents vasculaires cérébraux (AVC,…), le diabète, la stéatose hépatique, des maladies respiratoires, les troubles musculo-squelettiques (surtout l'arthrose), certains cancers (endomètre, sein, côlon…), des troubles neurodégénératifs… Elle est aussi parfois associée à la dépression dont elle peut être la cause et/ou la conséquence. Par ailleurs, l'obésité infantile peut entraîner des difficultés respiratoires, une hypertension artérielle, l'apparition des premiers marqueurs de maladies cardiovasculaires, l'augmentation du risque de fracture ou encore une résistance à l'insuline et des problèmes d'ordre psychologique, le tout lié à un risque accru de mort prématurée et d'incapacité à l'âge adulte (figure 18).

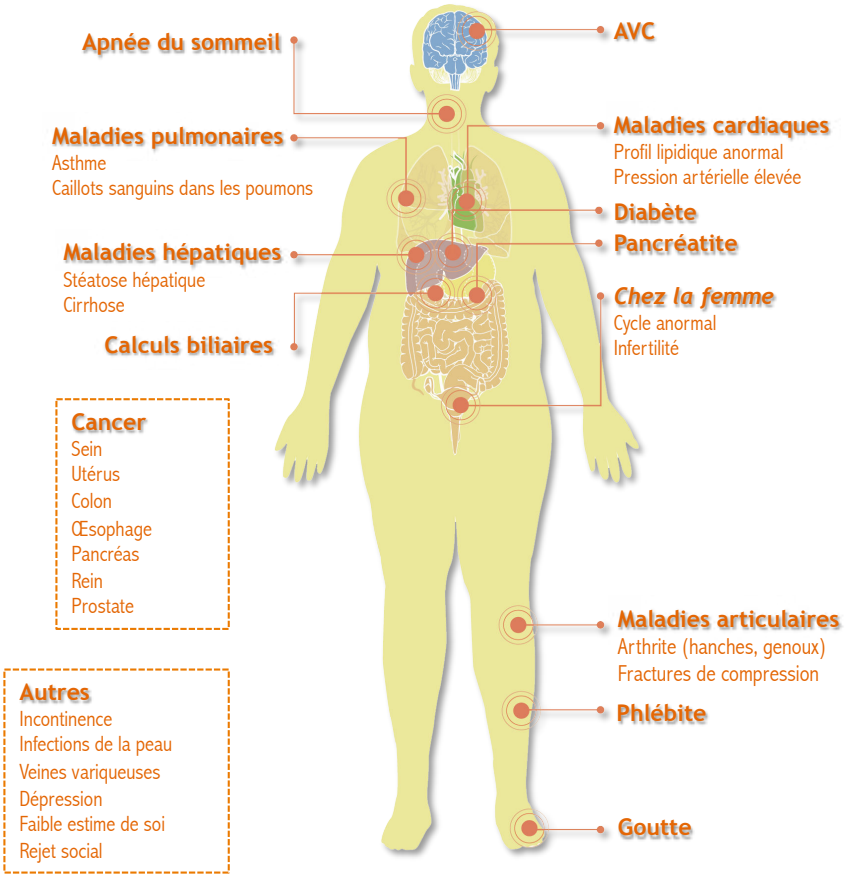


Figure 18. Comorbidités de l'obésité (adapté d'après Center for Disease Control, Etats-Unis).

L'obésité peut avoir une cause génétique, être une conséquence d'une pathologie primaire et/ou de son traitement (facteurs hormonaux et/ou psychologiques, médicaments, etc),…

mais le facteur le plus important est l'environnement. A l'heure actuelle, la cause est souvent comportementale, avec une sédentarité croissante, et la surconsommation de régimes hypercaloriques et hyperénergétiques, où l'excès de calories est majoritairement dû à une augmentation de l'apport lipidique. Or, afin de maintenir un poids normal, un équilibre est nécessaire entre les apports alimentaires et les dépenses énergétiques, autrement dit « la balance énergétique ». Dans le cas des régimes hypercaloriques, la balance va pencher du côté des apports, créant un déséquilibre pouvant mener à l'obésité.
Pour comprendre l'obésité, il est intéressant de noter que le rôle très important de l'inflammation dans la mise en place et/ou le développement de l'obésité et de ses comorbidités.

3.2.2. L'inflammation de bas-grade dans la pathogenèse et le maintien de l'obésité

Il est très important de noter qu'alors que l'inflammation associée à une perte de poids est de haut-grade, l'inflammation associée à l'obésité est, au contraire, de bas-grade. Autre élément intéressant de noter : le caractère chronique de l'inflammation associée à l'obésité.
Concernant l'obésité, l'inflammation a surtout, et largement, été décrite dans les tissus et organes périphériques (tissu adipeux, foie, pancréas, etc). Mais plus récemment, il a été aussi démontré qu'un challenge hypercalorique, en particulier hyperlipidique, même de courte durée, entraîne une inflammation hypothalamique, qui persiste dans les modèles d'obésité nutritionnelle.

- ***Inflammation périphérique et obésité***

Le lien entre inflammation et obésité a été établi depuis longtemps. Il a été montré notamment que l'inflammation liée à l'obésité n'est pas une inflammation « classique » dans la mesure où elle n'en induit pas les signes cardinaux : rougeur, gonflement, chaleur et douleur. De plus, l'inflammation classique est normalement associée à une augmentation du métabolisme et n'est que temporaire. L'inflammation liée à l'obésité est de nature différente. D'une part, il s'agit d'une inflammation aseptique. En effet, le déclencheur de l'inflammation de l'obésité est de nature métabolique : elle est souvent causée par la consommation excessive de certains nutriments. D'ailleurs, la perte de poids permet souvent la résolution de l'inflammation. D'autre part, il est intéressant non seulement que le déclencheur de l'inflammation soit métabolique, mais aussi qu'en périphérie du moins, les cellules où l'inflammation émerge en premier lieu et qui la maintiennent, soient des cellules « spécialisées » dans le métabolisme : adipocytes, hépatocytes, cellules ß-pancréatiques par exemple (mais aussi les neurones des systèmes peptidergiques impliqués dans la

régulation du comportement alimentaire, comme nous le verrons plus loin). Ainsi, on qualifie souvent l'inflammation associée à l'obésité et au syndrome métabolique d' « inflammation métabolique ».

La première découverte concernant l'inflammation dans les tissus obèses a été celle de niveaux élevés de TNF-α dans adipocytes de souris obèses, en comparaison à des souris minces (Hotamisligil et al., 1995). Depuis, de nombreuses études ont montré qu'une multitude de médiateurs inflammatoires sont surexprimés dans le TA de sujets obèses : IL-1β, IL-6, TNF-α, CCL2,… (Berg and Scherer, 2005; Shoelson et al., 2006), mais aussi que le TA n'est le seul à expérimenter un état inflammatoire durant l'obésité : sont aussi touchés l'intestin, le foie, le pancréas, le cerveau et le muscle squelettique (Cai et al., 2005; De Souza et al., 2005; Ehses et al., 2007; Monteiro-Sepulveda et al., 2015; Saghizadeh et al., 1996). Comme mentionné précédemment, l'inflammation associée à l'obésité est de bas-grade : il y a une augmentation significative de l'expression des cytokines, mais qui est modeste et/ou locale par rapport à celle induite par une infection ou un trauma.

Une autre caractéristique de l'inflammation associée à l'obésité est l'infiltration accrue des tissus métaboliques par les cellules immunitaires, notamment l'infiltration du TA par les macrophages, ce qui contribue à augmenter l'expression de médiateurs inflammatoires dans ces tissus (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003b). Cependant, l'implication des cellules immunitaires ne se limite pas à une simple infiltration de macrophages. Dans le TA par exemple, les macrophages peuvent avoir deux états d'activation différents dits M1 et M2, pro- et anti-inflammatoire, respectivement. Cet état d'activation est notamment influencé par des facteurs métaboliques. Chez les souris obèses, il y a été démontré une augmentation de la population de macrophages M1, ainsi que des cellules NK et des mastocytes (Liu et al., 2009; Ohmura et al., 2010). De plus, le ratio de cellules T CD8+/CD4+ dans le TA augmenterait lors du développement de l'obésité alors que le nombre de lymphocytes T régulateurs diminuerait. Ces modifications en termes de populations cellulaires immunitaires pourraient donc contribuer à la physiopathologie métabolique. Par exemple, des études suggèrent que les macrophages M1 participeraient à une désensibilisation à l'insuline (Olefsky and Glass, 2010).

Autre caractéristique de l'inflammation associée à l'obésité mentionnée précédemment : sa chronicité. En effet, les études menées indiquent que la surexpression de cytokines ainsi que l'infiltration des différents tissus par les cellules immunitaires ont lieu graduellement et ne semblent pas se résoudre. Notons que la plupart des études se penchant sur ces aspects temporels se sont concentrés, jusqu'ici, sur le TA. Une hypothèse proposée pour expliquer la chronicité de l'inflammation associée à l'obésité est que l'état inflammatoire

induit par la « surcharge » métabolique ne serait pas assez drastique pour induire un programme de résolution complète. De ce fait, les signaux de bas-grade émanant des tissus seraient maintenus dans le temps. Une autre hypothèse possible est que le renouvellement des adipocytes (où les macrophages auraient pour rôle de phagocyter les débris cellulaires des adipocytes morts) et autres évènements fassent en réalité partie d'un programme résolutif spécifique à ce cas. Il est aussi envisageable que cela pourrait être son origine, métabolique, qui « empêche » ce type de programme. L'absence de ce type de réponse à des signaux métaboliques serait-elle induite par l'obésité ou serait-ce la conséquence d'une disparité trop importante entre l'évolution de la physiologie des espèces et l'évolution environnementale ?

En résumé, les caractéristiques de l'inflammation associée à l'obésité, en périphérie tout du moins, sont i) d'être métabolique – elle est induite par les nutriments et est orchestrée par les cellules « métaboliques » (i.e. spécialisées dans le métabolisme (adipocyte, hépatocyte, cellule β pancréatique, myocyte…)) ; ii) d'être de bas-grade, avec une expression modérée et locale de médiateurs inflammatoires ; iii) de créer un milieu altéré où la « composition » des tissus en cellules immunitaires favorise un environnement tissulaire inflammatoire ; et iv) un maintien dans le temps de cet état inflammatoire, sans résolution apparente.

Comment l'inflammation associée à l'obésité est-elle initiée en périphérie ? Le signal à l'origine de cette inflammation en périphérie reste à éclaircir. Cependant, comme mentionné auparavant, l'inflammation périphérique associée à l'obésité semble commencer au niveau des cellules « métaboliques ». En effet, même ces cellules non-immunitaires possèdent leurs propres mécanismes de défense et peuvent induire une signalisation inflammatoire et communiquer en réponse aux signaux de danger. Par exemple, l'adipocyte peut exécuter de nombreux évènements de signalisation inflammatoire comme l'activation des TLR, l'activation des voies de signalisation de la kinase de stress JNK et de NF-κB ou encore la production de cytokines pro-inflammatoires en réponse aux signaux de stress métabolique.

Une hypothèse serait que durant le cycle prise alimentaire/jeûne, une réponse inflammatoire pulsatile pourrait avoir lieu dans les cellules métaboliques. Celle-ci serait causée soit par la nature inflammatoire intrinsèque des nutriments (ils sont du « non-soi »), soit par le fait même de se nourrir, qui couplerait naturellement les nutriments à des molécules inflammatoires (augmentation de la perméabilité intestinale pour assurer l'absorption maximale de nutriments mais qui favoriserait la libération de molécules inflammatoires dans la circulation (issues probablement du microbiote) comme le LPS). En conditions normales, l'inflammation de faible intensité culmine au moment de la prise alimentaire et est résolue une fois les nutriments métabolisés. En conditions d'obésité et de surconsommation de

nourriture, le signal constant provenant de la prise de nutriments résulterait en une réponse inflammatoire plus importante. Ces signaux de faible intensité s'accumuleraient et seraient amplifiés après chaque exposition aux nutriments, altérant le fonctionnement normal des voies métaboliques, et pourraient même atteindre un niveau où les cellules immunitaires seraient recrutées. Une fois les cellules immunes activées et participant à la réponse à l'inflammation, la sévérité de la réponse augmenterait et le dysfonctionnement des cellules métaboliques s'aggraverait.

Une autre théorie est celle selon laquelle les nutriments en soi ne sont pas inflammatoires, mais d'après laquelle leur excès est capable d'induire les voies classiques senseurs des pathogènes ou les voies de la réponse immunitaire. Le système détecterait que ces nutriments en grande abondance sont pathologiques en les apparentant à des pathogènes. Cette « fausse identité » pourrait être due à une perte dose-dépendante de la spécificité qui exploite la capacité des senseurs de pathogène à différencier les pathogènes d'entités à la structure similaire, comme les lipides. Des études soutiennent cette théorie. Par exemple, on sait que les adipocytes expriment les récepteurs senseurs de pathogènes TLR4 et TLR2 et il a été montré chez la souris que le TLR4 exprimé par les adipocytes peut être activé par une infusion d'acides gras saturés et que cette activation contribue à la résistance à l'insuline (Shi et al, 2006). De plus, l'augmentation du niveau d'acides gras dans le système, causé par la consommation d'un HFD, augmente l'expression du TLR4 et la perte génétique du TLR4 dans ces conditions peut améliorer la résistance à l'insuline (Saberi et al, 2009 ; Tsukumo et al, 2007). Un autre exemple est celui de la kinase senseur de pathogène, PKR (« protein kinase R »), qui perçoit les ARN double brin, signe d'infection virale, et qui induit en conséquence une réponse inflammatoire. Il a été montré que dans l'obésité ou avec une infusion de lipides, et pourtant en l'absence de virus, la PKR est activée (Nakamura et al, 2010). De manière intéressante, la consommation d'un HFD, la PKR peut orchestrer l'activité de la JNK et réguler négativement la signalisation de l'insuline. Le modèle ressortant de ces exemple serait : en conditions normales, les niveaux de nutriments à gérer par le système seraient suffisamment bas pour que seules les voies métaboliques soient engagées. Cependant, avec une surconsommation de nourriture, l'organisme est exposé à de hauts niveaux de nutriments, qui pourraient activer des voies et molécules senseurs de pathogènes au sein des cellules métaboliques. Ce surplus de signaux envoyés par les nutriments pourrait engager un niveau supérieur d'inflammation avec activation des cellules immunitaires, qui perturberaient le bon fonctionnement des tissus métaboliques affectés.

Certaines études ont eu pour but de déterminer si certains nutriments pourraient directement déclencher une réponse et ont permis d'identifier, *in vitro* dans des cultures de

cellules, plusieurs candidats pouvant induire une inflammation « métabolique ». Par exemple, les acides gras libres, et plus particulièrement les acides gras libres saturés ont été décrits comme pouvant activer une signalisation inflammatoire dans plus types cellulaires (Boden and Shulman, 2002; Iyer et al., 2010).

Il est donc établi que l'obésité est associée à une inflammation. Quels sont son rôle et ses conséquences dans l'obésité ? De nombreuses études ont démontré que l'activation de voies de signalisation inflammatoires altère le métabolisme et notamment, interfère avec la signalisation de l'insuline et de la leptine. La perte de sensibilité à l'insuline et à la leptine, qu'elle soit périphérique et/ou centrale, apparaît comme une conséquence de l'obésité, mais participe aussi à son développement.

Les voies de signalisation et molécules inflammatoires ainsi que les cellules immunitaires impliquées dans l'inflammation périphérique associée à l'obésité ont été largement étudiées.

En périphérie, l'inflammation associée à l'obésité affecte majoritairement les tissus métaboliques (particulièrement le TA, l'intestin, le foie, le pancréas et le muscle squelettique) et est associée à une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, dont les canoniques IL-1β, IL- 6 et TNF-α, dans ces tissus et dans le sérum.

Par ailleurs, plusieurs kinases inflammatoires ont été mises en jeu dans les tissus mentionnés précédemment et y ont été identifiées comme des contributeurs majeurs à de l'inflammation associée à l'obésité: par exemple, JNK, IKK (« inhibitor of κ kinase), PKR, S6K (« S6 kinase »), PKCθ (« protein kinase Cθ »), ERK (« extracellular signal-regulated protein kinase ») et mTOR (« mammalian target of rapamycin »). L'activation de ces kinases participe à la désensibilisation périphérique à l'insuline (Boura-Halfon and Zick, 2009) et à la leptine. Parmi ces kinases, celles majoritairement impliquées semblent être JNK, IKK, en particulier la voie IKKβ/NF-κB, et PKR.

De même, les SOCS, dont l'expression peut être induite par l'IL-6 par exemple, ont aussi été impliqués (Lebrun and Van Obberghen, 2008).

Les cellules immunitaires participent aussi à l'inflammation associée à l'obésité. En effet, notamment par l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs, des cellules immunitaires peuvent infiltrer les tissus métaboliques soumis au stress métabolique. L'exemple le plus décrit est l'infiltration du TA par les macrophages, notamment *via* la signalisation CCL2/CCR2 chez les animaux nourris avec un HFD. Les cellules immunitaires infiltrées dans les tissus métaboliques peuvent en influencer l'état inflammatoire. Par exemple, les macrophages peuvent être pro- ou anti-inflammatoires selon leur type d'activation, à savoir M1 et M2 respectivement. Les cellules immunitaires ont donc leurs

effets propres et l'activation de voies particulières telles que celles de l'IKKβ/NF-κB, du CCR2 ou du TLR4 dans les macrophages M1 infiltrant le TA ont été montrées comme impliquées dans la pathogenèse (Arkan et al., 2005; Ito et al., 2008; Saberi et al., 2009), au contraire de la voie JNK (Sabio et al., 2008; Vallerie et al., 2008), dont l'activation dans les adipocytes est suffisante pour déclencher des dysfonctionnements de la signalisation de l'insuline dans le TA. Au contraire, certains gènes permettent l'activation des macrophages vers un phénotype M2, comme ceux des récepteurs nucléaires PPARγ et PPARδ (« peroxisome proliferator-activated receptor » γ et δ) (Kang et al., 2008; Odegaard et al., 2007). De manière générale, concernant les macrophages M1 infiltrant le TA, les études ont confirmé qu'interférer avec les actions pro-inflammatoires des macrophages bénéficie au fonctionnement du TA et à l'homéostasie glucidique dans tout l'organisme.

Par ailleurs, un nouveau champ d'étude ayant attiré l'attention ces dernières années est la contribution du microbiote intestinal aux perturbations métaboliques et à l'obésité. En effet, les interactions entre les bactéries constituant la flore intestinale et les réponses de l'hôte semblent pouvoir influencer notamment le gain de poids, la sensibilité à l'insuline et l'état inflammatoire général, des paramètres fortement impliqués dans cette pathologie. A l'origine de l'engouement pour ce domaine d'étude est la découverte selon laquelle le microbiote des animaux obèses est très différent de celui des animaux minces (Furet et al., 2010; Ley et al., 2005). En effet, chez les animaux et hommes obèses, les niveaux de Bacteroidetes sont réduits alors que ceux des Firmicutes sont augmentés. Il a été suggéré depuis que la composition de la flore bactérienne intestinale des souris obèses augmenterait le niveau d'exposition au LPS, induisant l'activation du récepteur au TLR4 et par conséquent, une réponse immunitaire innée chez l'hôte (Cani et al., 2007). D'autres mécanismes et acteurs inflammatoires, comme le TLR5, pourraient être mis en jeu. De manière générale, il semble qu'en amplifiant l'inflammation, notamment au niveau de l'intestin, le microbiote pourrait participer à la pathogenèse de l'obésité, au niveau du gain de poids, mais aussi au niveau du métabolisme glucidique et de la résistance à leptine, parmi d'autres. Par ailleurs, des études ont montré que des interventions chirurgicales visant à traiter l'obésité (« by-pass » gastrique Roux-en-Y) entraînent des modifications de la composition du microbiote, sans relation avec la prise calorique (Furet et al., 2010; Kong et al., 2013).

De manière fonctionnelle, l'inflammation périphérique a été largement impliquée dans les phénomènes de résistance à l'insuline dans les différents tissus touchés. Rappelons que l'insuline est une hormone hypoglycémiante majoritairement impliquée dans la régulation de l'absorption du glucose et des niveaux d'acides gras libres (AGL) circulants ainsi que dans

la régulation homéostatique de la prise alimentaire. Produite par le pancréas, ses cibles majeures sont le TA, le foie et le muscle. Dans le TA, elle diminue la lipolyse et donc l'efflux d'AGL depuis les adipocytes. Dans le foie, elle inhibe la néoglucogenèse en inhibant des enzymes clés. Dans le muscle squelettique, elle induit majoritairement l'absorption de glucose en stimulant la translocation du transporteur de glucose GLUT4 (« Glucose transporter type 4 ») à la membrane plasmatique des myocytes. La résistance à l'insuline est au départ accompagnée d'une hyperinsulinémie, probablement un mécanisme de compensation visant à maintenir les effets de l'insuline en fonction de l'état métabolique de l'individu. A terme, le stress des cellules β pancréatiques produisant et sécrétant l'insuline est trop important et il y a mort cellulaire, donc absence de production d'insuline, des caractéristiques du diabète de type 2 (DT2). Ainsi, la résistance à l'insuline observée chez les sujets obèses et/ou atteints de DT2, on observe une concentration accrue d'AG libres circulants, une accumulation ectopique de graisses empêchant l'absorption de glucose induite par l'insuline dans le muscle squelettique et une augmentation de la production hépatique de glucose. L'inflammation périphérique associée à l'obésité, dans son ensemble, inhibe la signalisation de l'insuline. Par exemple, des tyrosine kinases comme IKKβ et JNK, phosphorylent l'IRS-1, une protéine adaptatrice essentielle à la signalisation du récepteur à l'insuline, ce qui inhibe la cascade de signalisation du récepteur de l'insuline.
L'insuline est une hormone dont la signalisation est fortement altérée dans l'obésité, cependant, ce n'est pas la seule. En effet, une autre caractéristique majeure de l'obésité est la résistance à la leptine.
Comme mentionné précédemment, historiquement, la leptine a été d'abord considérée comme un signal adipeux surtout impliqué dans la régulation centrale de la balance énergétique (voir Introduction, 1. Régulation centrale du comportement alimentaire et du du poids corporel). L'hyperleptinémie est une manifestation caractéristique de l'obésité qui pourrait expliquer au moins en partie le gain de poids. L'augmentation des niveaux de leptine pourrait avoir pour but de maintenir les effets de l'hormone et d'assurer l'homéostasie énergétique. La résistance à la leptine est utilisée pour déterminer les différents états d'obésité, où l'hyperleptinémie et/ou une diminution de la réponse à l'administration de la leptine est observée. Nombre des effets de la leptine se font au niveau cérébral, mais pas seulement. En réalité, au-delà de son action sur les neurones régulant la prise alimentaire, la leptine est impliquée dans de nombreux processus physiologiques en périphérie, comme l'angiogenèse, l'hématopoïèse, la formation des os, la cicatrisation, l'immunocompétence et surtout la régulation du métabolisme lipidique et glucidique ainsi que l'absorption intestinale des nutriments. De ce fait, le développement de la résistance à

la leptine peut entraver les effets centraux et périphériques de la leptine : prise alimentaire, absorption des nutriments, métabolisme, sensibilité à l'insuline, etc, menant à une dérégulation de la balance énergétique. En effet, l'hyperleptinémie pourrait mener à l'hypertrophie et l'hyperplasie du TA, et contribuer ainsi à l'accumulation de masse grasse. Dans le foie, la résistance à la leptine favoriserait une hyperinsulinémie et une hyperlipidémie. Concernant le muscle squelettique, il est possible de postuler que la résistance à la leptine participe à l'atrophie musculaire associée à l'obésité.

A l'heure actuelle, les mécanismes sous-jacents à la résistance à la leptine restent encore méconnus. Cependant, plusieurs possibilités ont été proposées : une déficience du transport de la leptine au travers de la BHE pour atteindre leurs cibles neuronales, l'inhibition de la cascade de signalisation de la leptine dans des neurones spécifiques, une diminution « défensive » de l'expression des récepteurs de la leptine ou une désensibilisation de la signalisation cellulaire en aval, à la fois centrale et périphérique. Mais d'autres facteurs semblent aussi pouvoir contribuer à la résistance à la leptine comme l'inflammation ou le stress oxydatif, mais aussi le type de régime consommé (Haring and Harris, 2011; Leon-Cabrera et al., 2013; Shapiro et al., 2011). Concernant l'inflammation, il a été montré que le TNF-α, l'IL-1 et le LPS, par exemple, augmente la concentration de leptine circulante chez les rongeurs et les humains (Finck et al., 1998; Janik et al., 1997; Kirchgessner et al., 1997; Sarraf et al., 1997; Zumbach et al., 1997), suggérant que ces médiateurs inflammatoires, et possiblement d'autres, sont impliqués dans l'hyperleptinémie et la résistance à la leptine. Des études ont suggéré que la relation entre inflammation et résistance à la leptine peut être modulée par certains nutriments. Par exemple, de hautes concentrations en glucose ou encore en acides gras libres, peuvent activer des voies inflammatoires (Giugliano et al., 2006), menant au développement d'une résistance à la leptine.

En conclusion, l'inflammation métabolique périphérique associée à l'obésité a des conséquences délétères à de nombreux niveaux et si elle est conséquence de mauvaises habitudes alimentaires favorisant le phénotype obèse, l'inflammation en elle-même favorise les dysfonctionnements tissulaires qui participent eux-aussi au développement de l'obésité.

- ***Inflammation hypothalamique et obésité***

Dans le contexte d'obésité nutritionnelle, en plus d'être activées dans les tissus périphériques, les voies inflammatoires sont aussi activées dans des aires centrales exerçant un contrôle sur le métabolisme énergétique, notamment l'hypohalamus médio-basal (MBH), qui comprend l'ARC et l'EM.

Cette inflammation hypothalamique induite par la consommation de régimes hyperlipidiques a intéressé une partie de mes travaux de thèse.

Quels sont les signaux induisant cette inflammation ? Est-elle une cause ou une conséquence de l'obésité ?

Le lien entre obésité nutritionnelle et inflammation hypothalamique a été décrit pour la première fois il y a 10 ans, par de Souza et ses collaborateurs (De Souza et al., 2005). Les auteurs ont démontré que chez le rat, la consommation d'un HFD pendant 16 semaines augmentait l'activation d'intermédiaires inflammatoires dans l'hypothalamus médio-basal, comme JNK et NF-κB, entraînant la production de cytokines pro-inflammatoires canoniques comme IL-1β, TNF-α et IL-6 ainsi que des défauts de signalisation de l'insuline et de la leptine Ces observations à propos de l'inflammation hypothalamique associée à l'obésité nutritionnelle ont été reconfirmées chez le rat et retrouvées chez la souris obèse et les Primates non humains (Grayson et al., 2010; Holland et al., 2011; Kleinridders et al., 2009; Maric et al., 2014; Morselli et al., 2014; Posey et al., 2009; Thaler et al., 2012; Valdearcos et al., 2014; Weissmann et al., 2014; Zhang et al., 2008c).

Une différence primordiale entre l'inflammation induite par le régime en périphérie et celle induite au niveau de l'hypothalamus est le temps de latence avant son apparition. Des études ont montré que cette inflammation, répondant vraisemblablement à la surnutrition, se développe beaucoup plus rapidement dans l'hypothalamus que dans les tissus périphériques. En effet, il faut plusieurs semaines voire plusieurs mois avant d'observer l'inflammation dans le TA par exemple, alors que dans l'hypothalamus, la consommation d'un HFD pendant une période beaucoup plus restreinte de 24 à 72h suffit à augmenter la transcription des cytokines pro-inflammatoires et à entraîner une gliose, marque d'inflammation dans le cerveau (Thaler et al., 2012).

Ainsi, l'inflammation induite par l'excès de nutriments dans l'hypothalamus précède la mise en place de l'obésité, l'inflammation et les perturbations métaboliques en périphérie. Ceci suggère que l'inflammation hypothalamique joue un rôle dans la modulation métabolique normale, et surtout qu'elle est un acteur majeur dans le développement de la physiopathologie induite par la surnutrition.

Comment l'inflammation hypothalamique est-elle induite ?

D'une part, il a été suggéré que c'est l'excès de nutriments, qui sont normalement des régulateurs physiologiques importants des réseaux neuronaux hypothalamiques, qui médie la mise en place d'une inflammation au niveau de l'hypothalamus. De plus, il a été montré que certaines cytokines, surexprimées chez les obèses, sont capables de mimer les effets de la surnutrition, illustrant le rôle majeur des médiateurs inflammatoires dans l'obésité.

L'excès de nutriments induirait-il une surexpression de médiateurs pro-inflammatoires qui serait responsable du développement de l'obésité ? Cet aspect sera détaillé dans la partie « Résultats, 2. Implication de la chimiokine CCL5 dans la prise de poids par action sur les neurones à MCH : un rôle dans la pathogenèse de l'obésité ».

D'autre part, d'autres études attribuent la faculté de déclencher cette inflammation hypothalamique aux AGS, notamment ceux à longue chaîne, du fait de leur accumulation dans l'hypothalamus lors de la consommation d'un HFD. Pour plus de détails, se référer à la partie « Résultats, 3. La nature des lipides influence-t-elle le développement de l'obésité ? ».

D'autres mécanismes ont été proposés comme pouvant participer à l'inflammation hypothalamique induite par la surnutrition. Par exemple, le stress du réticulum endoplasmique. En effet, celui-ci a été lié au développement de la résistance à l'insuline dans plusieurs types cellulaires (Hotamisligil, 2010) et la surnutrition chez la souris est associée à l'activation hypothalamique de la voie IKKβ/NF-κB, qui induit l'induction d'un stress du réticulum endoplasmique dans les neurones (Purkayastha et al., 2011b; Zhang et al., 2008c). De même, le stress oxydatif pourrait être un facteur initiateur et participant au maintien de l'inflammation hypothalamique induite par la nutrition. En périphérie, le stress oxydatif, avec la production de ROS (« reactive oxygen species »), précède des perturbations métaboliques sévères et la résistance à l'insuline induite par une obésité nutritionnelle (Matsuzawa-Nagata et al., 2008). Le cerveau humain ne représente que 2% du poids total d'un individu, mais utilise près de 20% de l'oxygène et des calories consommées par le corps, le rendant particulièrement vulnérable à la production excessive de ROS et au stress oxydatif. En effet, les mitochondries produisent naturellement des ROS en condition physiologique, notamment lors de l'oxydation des nutriments tels que le glucose ou les acides gras (Leloup et al., 2011). Cependant, il a été montré qu'une production excessive de ROS dans l'hypothalamus se produit chez le rat obèse. Cela participe au stress oxydatif local et altère non seulement la détection du glucose dans cette zone mais aussi la réponse physiologique associée, comme la sécrétion réflexe d'insuline en périphérie (Colombani et al., 2009). Enfin, l'autophagie a aussi été étudiée dans ce contexte. L'autophagie est un processus cellulaire permettant l'élimination d'éléments cytoplasmiques et organelles endommagés afin de maintenir une homéostasie interne et une intégrité structurale. L'autophagie joue aussi un rôle clé dans les réponses cellulaires au stress métaboliques. Dans des conditions de surnutrition, le stress du réticulum endoplasmique et le stress oxydatif peuvent induire l'autophagie (Butler and Bahr, 2006) (Yorimitsu et al., 2006). Perturber les voies de l'autophagie a été montré comme pouvant augmenter la prise alimentaire et le poids, en association avec une augmentation de

l'activation hypothalamique de la voie IKKβ/NF-κB. Ceci illustre la connexion entre les voies autophagiques et inflammatoires dans l'hypothalamus, comme c'est le cas dans d'autres tissus.

Un autre point qui doit attirer notre attention dans la caractérisation de l'inflammation hypothalamique associée à la surnutrition est la contribution des différents types cellulaires de l'hypothalamus. L'hypothalamus, bénéficie d'une position privilégiée pour assurer son rôle dans la régulation du CA puisqu'elle facilite la détection des informations sur l'état métabolique d'un individu circulant depuis la périphérie. En effet, au niveau des OCV, la BHE est perméable, et l'hypothalamus est juxtaposé au 3V, donc au liquide céphalo-rachidien. « Le revers de la médaille » est que ces caractéristiques de l'hypothalamus en font une région cérébrale vulnérable face au stress induit par un excès de nutriments.

Dans ce contexte, un certain nombre d'études se sont intéressées aux conséquences neuronales de la surnutrition, mais ont aussi décrit les réponses des cellules gliales (microglie et astrocytes en particulier) qui prolifèrent et sont activés (gliose) lors de la consommation d'un HFD. (Nous avons nous-mêmes étudié la réponse de ces cellules lors de la consommation d'un HFD, à très court-terme. Cet aspect sera détaillé dans la partie « Résultats, 4. Quelle est la réponse précoce à la consommation d'un régime hyperlipidique dans l'hypothalamus ? ».

Par ailleurs, un autre type spécialisé de cellule gliale a aussi été impliqué dans l'inflammation hypothalamique liée à l'excès de nutriments : les tanycytes. Ce sont des cellules épendymaires. Dans l'hypothalamus, les tanycytes sont localisés au niveau de l'éminence médiane et s'étendent depuis la surface épendymaire du 3V jusqu'à un plexus vasculaire particulièrement fenestré et perméable aux facteurs circulants. Les tanycytes hypothalamiques émergent en tant que composant-clé dans le réseau répondant à la leptine pour contrôler le poids et la balance énergétique (Bolborea and Dale, 2013; Lee et al., 2012). Les tanycytes seraient capables de répondre au glucose et à divers neurotransmetteurs tels que l'ATP (adénosine triphosphate), l'histamine, l'acétylcholine. Les tanycytes seraient impliqués dans le transport de la leptine à travers la BHE et agiraient comme point de contrôle avant que la leptine atteigne les neurones du MBH (Balland et al., 2014). Fait intéressant, les tanycytes pourraient aussi jouer un rôle en tant que progéniteurs neuraux. Au départ, la consommation d'un HFD induit chez la souris la prolifération et la différenciation en neurones fonctionnels des tanycytes (Lee et al., 2012), mais la consommation chronique d'un HFD est au contraire associée à une déplétion des cellules « progenitor-like » dan l'hypothalamus, dont les tanycytes (McNay et al., 2012). Les tanycytes expriment notamment des récepteurs de certaines cytokines comme le TNFR1,

ainsi, les tanycytes pourraient répondre à des signaux inflammatoires et transmettre l'information à d'autres types cellulaires hypothalamiques.

En conclusion, l'inflammation, notamment hypothalamique, est associée à des dérégulations du CA et à des modifications de poids corporel drastiques, qu'il s'agisse d'une perte trop importante ou d'un gain excessif. Que l'inflammation et de mêmes acteurs soient impliqués dans le développement de phénotypes opposés tient probablement aux différences entre les contextes inflammatoires caractérisant obésité et cachexie (tableau 1).

	Inflammation induisant anorexie et perte de poids (cachexie)	**Inflammation « métabolique »**
Maladies associées	• **aigües :** infection systémique, lésion traumatique • **chroniques :** infection systémique, cancer, SIDA…	maladies liées au syndrome métabolique : obésité, diabète de type 2, hypertension liée à l'obésité, maladies de l'artère coronaire, athérosclérose, stéatose hépatique, maladies neurodégénératives liées au vieillissement,…)
Durée	aiguë ou chronique (selon le milieu)	chronique
Intensité	haut-grade et robuste	bas-grade
Nature des stimuli inflammatoires	hauts niveaux circulants de cytokines/ chimiokines et substances inflammatoires (ex. prostaglandines)	• **primaires :** surnutrition (*via* des changements biochimiques et physiopathologiques) • **secondaires :** faibles niveaux de cytokines/ chimiokines dans la circulation et dans le cerveau
Source des stimuli inflammatoires	• **primaires :** facteurs d'inflammation systémiques ou directement issus de l'hypothalamus • **secondaires** (si facteurs primaires systémiques) : induction locale au niveau de l'hypothalamus de l'expression génique de médiateurs inflammatoires due à une stimulation systémique à un stade chronique	• **primaires :** changements subcellulaires locaux dans le cerveau • **secondaires :** faibles niveaux de cytokines/ chimiokines dans la circulation et dans le cerveau
Activateurs de signalisation	surtout par l'activation massive de l'activation de récepteurs des cytokines/chimiokines et des voies des prostaglandines	• divers stress subcellulaires comme le stress oxydatif, le stress du réticulum endoplasmique et défaut d'autophagie • activation modérée des TLR et des récepteurs des cytokines/chimiokines
Médiateurs de signalisation	majoritairement le spectre entier des voies inflammatoires classiques	sous-ensemble de voies inflammatoires classiques (et potentiellement de voies atypiques non-identifiées)
Types cellulaires	• neurones • cellules gliales	
Effets sur la balance énergétique	• balance énergétique négative • souvent : augmentation de la dépense énergétique, mais l'anorexie peut apparaître dans des maladies sévères ou en phase terminale	• balance énergétique positive • souvent : augmentation des apports énergétiques par augmentation de la prise alimentaire
Effet tissulaire	perte de masse grasse mais aussi de masse maigre (ex. sarcopénie)	augmentation de la masse grasse
Effets sur l'homéostasie glucidique	bidirectionnelle: hyper- ou hypoglycémique	hyperglycémique

Tableau 1. Comparaison des caractéristiques de l'inflammation métabolique et de l'inflammation associée à la cachexie (d'après Cai et Liu, 2011).

Si le lien entre inflammation et dérégulations du contrôle de l'homéostasie énergétique a été établi, il est important d'identifier des intermédiaires permettant la communication entre système immunitaire et systèmes neuropeptidergiques de l'hypothalamus.

Mon équipe a postulé que des médiateurs de l'inflammation pourraient être des acteurs majeurs de la dérégulation centrale de la prise alimentaire par action sur les neurones hypothalamiques régulant le comportement alimentaire et l'homéostasie énergétique. Elle s'est concentrée sur les chimiokines, exprimées de manière constitutive dans le cerveau. Comme discuté précédemment, elles participent au développement cérébral et modulent l'activité de neurones en conditions physiologiques chez l'adulte. L'hypothèse de mon laboratoire de thèse a été qu'une surexpression de chimiokines peut déréguler le fonctionnement de réseaux neuronaux hypothalamiques impliqués dans la prise alimentaire par modulation de leur activité. En identifiant les chimiokines participant à cette perturbation, nous aurons mis pour la première fois en lumière le rôle de ces médiateurs inflammatoires dans les dérégulations du CA.

4. Objectifs

Ainsi, j'ai eu pour objectifs :

- d'identifier et de caractériser certaines molécules inflammatoires comme des acteurs majeurs du dérèglement de systèmes neuraux impliqués dans la régulation centrale du comportement alimentaire et du poids corporel pour à terme, évaluer leur potentiel en tant que cibles thérapeutiques dans la lutte contre ces dérégulations du CA. Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur une catégorie de médiateurs inflammatoires particuliers, capables de neuromodulation directe, les chimiokines. J'ai voulu déterminer leur implication dans la mise en place et/ou le maintien de :
    - la perte de poids liée à des pathologies primaires inflammatoires
    - l'obésité;
- d'étudier si la nature des lipides constituant des régimes hyperlipidiques, à taux égal, peut influencer le développement de l'obésité, et notamment au niveau de l'inflammation hypothalamique et des réseaux neuropeptidergiques hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire ;
- de déterminer s'il existe, dans des aires cérébrales clés de la régulation du CA, des manifestations précoces de la consommation d'un régime hyperlipidique (qui à long-terme mène au développement d'une obésité).

RÉSULTATS

1. CCL2 médie la perte de poids induite par une inflammation centrale en inhibant l'activité des neurones à MCH

1.1. Introduction

Comme rapporté précédemment (voir Introduction - 3.1 Inflammation et perte de poids), une inflammation de haut-grade est très souvent associée à une perte d'appétit et de poids. Ces phénomènes font partie intégrante d'une stratégie de l'organisme pour lutter contre le développement de l'infection, connue sous le nom de comportement de maladie. Le comportement de maladie a été décrit comme résultant des actions de cytokines telles que l'IL-1β, l'IL-6 ou encore le TNF-α (Dantzer, 2006). Notamment, les cytokines ont été décrites comme jouant un rôle important dans l'anorexie et l'augmentation du catabolisme induites par l'inflammation, en affectant le cerveau. Elles agissent à travers différentes voies de communication humorale, cellulaire et neurale, que nous ne détaillerons pas ici.

Dans la mesure où les récepteurs des chimiokines sont exprimés et fonctionnels sur les neurones hypothalamiques, et où les chimiokines modulent l'activité de neurones impliqués dans la régulation de fonctions physiologiques (Callewaere et al., 2006), nous avons cherché à identifier une ou plusieurs chimiokines pouvant participer au dérèglement de systèmes neuraux impliqués dans la régulation centrale du comportement alimentaire et du poids corporel et participer ainsi à la perte de poids associée au « comportement de maladie ». Pour procéder à ces études, nous avons choisi le LPS comme inducteur d'inflammation de forte intensité, au niveau central et de manière aiguë, par injection ICV unique.

1.2. Matériels et Méthodes

Les matériels et méthodes concernant les travaux de cet article sont détaillés dans la section « Materials and Methods » de l'article, l'« Appendix Supplementary Methods » et la « Table EV1.

Les animaux utilisés pour cette étude, et leurs conditions d'hébergement, sont détaillés dans la section « Materials and Methods » de l'article. Il en est de même pour l'injection des substances leur ayant été injectées, le protocole d'immunohistochimie ayant permis l'étude de l'expression du CCR2 dans les neurones à MCH, la périfusion des explants hypothalamiques pour les études de sécrétion de la MCH et les analyses statistiques.

Les méthodes employées dans les expériences d'électrophysiologie étudiant l'effet de CCL2 sur l'activité des neurones à MCH sont décrites dans la section « Materials and Methods » de l'article ainsi que dans l'« Appendix Supplementary Methods ».
Les protocoles employés pour les études d'expression génique et protéique des cytokines, chimiokines et neuropeptides sont détaillés dans l'« Appendix Supplementary Methods ».
La « Table EV1 » détaille les séquences des amorces utilisées pour la PCR quantitative en temps-réel.

1.3. Résultats

Dans l'article **« CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity »,** nous nous sommes intéressés à l'inflammation hypothalamique de haut-grade et aux médiateurs inflammatoires pouvant servir d'interface entre inflammation et dysfonctionnements de la régulation centrale de la prise alimentaire et du poids corporel.
Dans un premier temps, nous avons testé l'effet d'une injection aiguë ICV de LPS chez la souris. Nous avons pu vérifier que ce modèle entraîne effectivement une inflammation au niveau de l'hypothalamus, comme attesté par l'augmentation de l'expression hypothalamique des ARNm des cytokines pro-inflammatoires canoniques IL-1β, IL-6 et TNF-α (figure 1A de l'article). Par ailleurs, nous avons aussi étudié l'effet de l'injection ICV de LPS sur l'expression des peptides hypothalamiques de l'ARC et du LHA participant à la régulation de la prise alimentaire et nous avons pu observer dans l'hypothalamus une augmentation de l'expression génique du peptide anorexigène POMC (mais pas de l'autre peptide anorexigène, CART) ainsi qu'une diminution de l'expression génique des peptides orexigènes NPY et AgRP (figure EV1 de l'article). Concernant le LHA, nous avons observé une diminution de l'expression génique des deux peptides orexigènes MCH et OX (ORX dans l'article) (figures 1B et EV2A de l'article), 18h après injection de LPS, en accord avec la diminution de leur expression protéique (figures 1C et EV2B de l'article). Par la suite, nous avons étudié l'expression génique, dans l'hypothalamus, de cytokines et chimiokines 6h après injection de LPS, après la première vague d'activation de l'expression génique des cytokines, et avant la diminution de l'expression génique de la MCH ou de l'OX. Ce criblage par PCR quantitative en temps réel a permis de révéler l'augmentation génique de l'expression de nombreuses cytokines (voir figure EV3A de l'article). Concernant les chimiokines, de manière intéressante, l'activation la plus robuste en terme d'activation génique est celle des ligands des récepteurs de chimiokines CCR2, CCR1, CCR3 et CCR5 (figure EV3B). Compte-tenu du rôle majeur décrit pour CCL2 dans l'inflammation cérébrale

après injection périphérique de LPS, et étant donné que CCL2 est le ligand le plus efficace de CCR2 et que CCL2 interagit sélectivement avec CCR2 dans les cerveaux des rongeurs (Thompson et al., 2008 ; Cazareth et al., 2014 ; Conductier et al., 2010), nous nous sommes concentrés sur la voie de signalisation CCL2/CCR2. Nous avons donc déterminé les variations d'expression génique et protéique de CCL2 au cours du temps après injection de LPS (figures EV3C et D de l'article). Par la suite, nous avons voulu déterminer l'importance relative de la voie CCL2/CCR2 dans la diminution de l'expression génique de la MCH observée 18h après injection de LPS. Pour cela, nous avons co-injecté un antagoniste spécifique du CCR2, l'INCB3344, avec le LPS chez les souris sauvages, ou injecté le LPS seul chez les souris déficientes pour le CCR2 et nous avons observé que cela empêche efficacement la diminution des niveaux d'ARNm de la MCH induite par le LPS (figure 1D de l'article), suggérant que la signalisation CCR2 joue un rôle capital dans la régulation négative de la MCH associée à la neuroinflammation induite par le LPS.

Dans un second temps, nous avons voulu tester notre hypothèse selon laquelle une injection ICV de CCL2, en activant CCR2, pourrait mimer les effets du LPS sur l'expression des cytokines/chimiokines et des neuropeptides dans l'hypothalamus. Nous avons observé en effet une augmentation de l'expression génique dans l'hypothalamus des cytokines canoniques IL-1β, IL-6 et TNF-α (figure 2A de l'article) ainsi que l'augmentation de l'expression génique et protéique de CCL2 dans l'hypothalamus (figures 2B et C de l'article). Par ailleurs, de manière comparable au LPS, CCL2 diminue l'expression de MCH et OX, aux niveaux génique et protéique (figures 2D et EV2C de l'article). Nous avons pu montré que la co-injection de CCL2 et INCB3344 chez des souris sauvages et l'injection de CCL2 seul chez les souris déficientes pour le CCR2 empêche aussi la diminution des niveaux d'ARNm de la MCH, cette fois totalement, 18h après injection (figure 2F de l'article). Nous avons caractérisé alors, par immunohistochimie, la distribution du CCR2 dans le LHA chez des souris exprimant la « Cyan Fluorescent Protein » (CFP) sous le contrôle du promoteur de la MCH (souris MCH-CFP), un modèle permettant d'identifier directement les neurones à MCH. De cette manière, nous avons observé la co-localisation, du CCR2 et de la MCH (en rouge et en vert respectivement dans la figure 3A) sur 70% des neurones à MCH environ. L'observation de l'expression du CCR2 par les neurones à MCH nous a amené à tester si la voie CCL2/CCR2 pouvait affecter directement les neurones à MCH et leur activité. Des expériences de patch-clamp réalisées sur tranches de cerveaux de souris MCH-CFP suggèrent que CCL2 induit une hyperpolarisation des neurones à MCH du LHA (figure 3B de l'article), de manière dose-dépendante. Les expériences menées suggèrent de plus que CCL2 engendre un délai ou un échec dans la décharge de potentiels d'action des

neurones à MCH. Par ailleurs, sur la base de nos observations selon lesquelles CCL2 diminue l'excitabilité des neurones à MCH, nous avons ensuite évalué l'effet de CCL2 sur la libération de MCH par des explants hypothalamiques. Ainsi, nous avons montré que CCL2 diminue drastiquement la libération de MCH induite par le KCl, un effet empêché par l'ajout d'INCB3344.

Enfin, nous avons voulu tester la contribution de la voie CCL2/CCR2 à la perte de poids associée à une inflammation hypothalamique de forte intensité *in vivo.* L'injection ICV de LPS induit une perte de poids chez les souris sauvages significative pendant au moins 48h, allant jusqu'à 10,9% du poids initial 22h après injection (figure 4A de l'article). La co-injection du LPS avec l'INCB3344 diminue la perte de poids induite par le LPS de 19% sur une période d'observation de 48h (figure 4A de l'article). Par ailleurs, nous avons pu observer, 26h après injection, qu'empêcher la signalisation du CCR2 de manière pharmacologique (INCB3344) ou génique (souris déficientes pour le CCR2), diminue la perte de poids engendrée par le LPS d'environ 35% et 51% respectivement. A ce même temps, où l'effet de l'injection de CCL2 sur la perte de poids est maximal chez les souris sauvages, la même injection chez les souris déficientes pour le CCR2 n'a pas d'effet sur le poids par rapport aux souris contrôles (figure 4C de l'article).

Ces travaux ont ainsi identifié la voie CCL2/CCR2 comme agissant directement sur les neurones à MCH du LHA et comme étant primordiale dans la perte de poids associée à une inflammation hypothalamique de forte intensité dans un modèle d'injection aiguë ICV de LPS.

1.4. Conclusion et Discussion

Il est bien établi que les cytokines pro-inflammatoires peuvent agir au niveau central pour contribuer à l'anorexie et favorisent les processus cataboliques après activation du système immunitaire, notamment en réponse à une blessure ou à une infection (Konsman and Dantzer, 2001; McCusker and Kelley, 2013; Plata-Salaman, 2000, 2001). Si des études précédentes se sont intéressées à déterminer le rôle des réseaux neuropeptidergiques de l'ARC dans ces phénomènes induit par le LPS ou directement certaines cytokines (Ogimoto et al., 2006; Reyes and Sawchenko, 2002; Ruud et al., 2013), elles ont clairement indiqué qu'ils n'étaient pas les seuls impliqués. De ce fait, les neurones du LHA semblent des candidats intéressants comme autres médiateurs de la perte de poids et anorexie induite par l'inflammation (Gaykema and Goehler, 2009; Grossberg et al., 2011).

Concernant l'autre objet de notre étude, à savoir les chimiokines, des études suggèrent que certaines d'entre elles au moins sont capables, même en conditions physiologiques, de

modifier l'activité neuronale, notamment au niveau de neurones de l'hypothalamus tels que les neurones à AVP du PVN ou les neurones à MCH du LHA (Callewaere et al., 2006; Guyon et al., 2005a). Ces neurones expriment de multiples récepteurs aux chimiokines. Au contraire, peu de données mentionnent l'expression de récepteurs aux cytokines dans les neurones du LHA, à l'exception notable du récepteur de l'IL-6 (IL-6Rα) dont l'expression a été trouvée dans les neurones à MCH (Schele et al., 2012).

Les actions des chimiokines sur les neurones hypothalamiques semblent pouvoir participer à des processus physiologiques comme la régulation du métabolisme hydrique par exemple (Callewaere et al., 2006). Ainsi, dans un contexte inflammatoire, l'augmentation de l'expression des chimiokines pourrait expliquer le dérèglement de ces processus physiologiques dans lesquels ils sont impliqués.

L'expression du récepteur à l'IL-6 sur les neurones à MCH du LHA et l'effet « catabolique » que certains ont attribué à l'IL-6 (Benrick et al., 2009; Wallenius et al., 2002) ne sont pas incompatibles avec nos résultats attribuant à la voie CCR2/CCL2 un rôle primordial dans la perte de poids induite par le LPS. Les voies IL-6 et CCL2 ont été liées à plusieurs reprises : elles favoriseraient mutuellement leur production (Caiello et al., 2014), mais aussi, une étude récente a montré que l'axe CCL2/CCR2 augmente les effets de l'IL-6 dans le contexte de la transition épithéliale-mésenchymateuse (Chen et al., 2015). De ce fait, il n'est pas exclu que les effets observés de l'IL-6 soient en fait dus à un rôle en amont de l'IL-6 sur CCL2/CCR2, ce qui serait possible d'un point de vue cinétique, ou que les effets de l'IL-6 et CCL2 soient complémentaires. En effet, CCL2/CCR2 contribuerait, d'après nos résultats, « seulement » à approximativement 70% de la réponse MCH au LPS. On pourrait par ailleurs aussi envisager que ce soit l'axe CCL2/CCR2 qui soit indispensable à l'effet de l'IL-6 sur les neurones à MCH dans l'inflammation induite par le LPS, mais nos résultats suggèrent un effet direct de cet axe chimiokinergique.

Parmi les chimiokines dont l'expression augmente après traitement au LPS, nous nous sommes focalisés sur l'axe CCL2/CCR2. En effet, nous avions noté que parmi les chimiokines, ce sont les ligands des récepteurs CCR2 et CCR5 dont l'expression génique était majoritairement augmentée dans notre modèle de neuroinflammation induite par le LPS. Par ailleurs, l'importance de CCL2 dans l'inflammation cérébrale a été montrée dans des études précédentes : son expression est augmentée dans le cerveau après induction d'un challenge immun systémique induit par le LPS (Brown et al., 2010; Cazareth et al., 2014; Skelly et al., 2013), CCL2 est connue pour son rôle dans le recrutement des monocytes périphériques vers le cerveau (Carrillo-de Sauvage et al., 2012; Schellenberg et al., 2012) et les souris déficientes pour CCL2 ont une inflammation cérébrale réduite après

traitement périphérique au LPS (Thompson et al., 2008). Par ailleurs, si leur répartition dans le LHA n'avait pas été étudiée en détails, des études avaient déjà montré que CCL2 et CCR2 étaient exprimés dans le LHA (Banisadr et al., 2005a; Banisadr et al., 2002). Très récemment, la co-expression de MCH et CCR2 dans le LHA a également été montrée aussi par un autre groupe en condition d'induction par une exposition à l'éthanol (Chang et al., 2015). Pour ces raisons, cet axe CCL2/CCR2 semble être un candidat intéressant quant à la neuromodulation des neurones impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, en faisant le lien entre inflammation de haut-grade et phénotype de perte de poids.

Par ailleurs, des résultats du laboratoire suggèrent que la chimiokine CXCL12 (ou SDF-1 ; « stromal-derived factor-1 ») dont le récepteur CXCR4 est aussi exprimé sur les neurones à MCH, exercerait des effets opposés à ceux de CCL2 sur les neurones à MCH et fait intéressant, des données préliminaires de notre laboratoire suggèrent que l'injection de LPS tend à diminuer l'expression de SDF-1 dans l'hypothalamus. Ceci peut nous amener à envisager que l'axe SDF-1/CXCR4 pourrait médier une partie des effets du LPS sur les neurones à MCH.

Nous avons choisi un modèle d'injection cérébrale de LPS, nous plaçant dans un contexte de neuroinflammation « primaire ». De manière intéressante, les résultats de notre groupe et d'autres utilisant des injections IP de LPS (Cazareth et al., 2014; Guyon et al., 2008) suggèrent une cinétique comparable d'augmentation ou de diminution d'expression génique au niveau de l'hypothalamus des cytokines pro-inflammatoires et des peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. Ainsi, la réponse inflammatoire hypothalamique à un challenge immun induit par le LPS, qu'il soit directement cérébral ou initialement systémique, engagerait les mêmes acteurs. Dans ce contexte, il est probable que l'activation de l'axe CCL2/CCR2 soit médiée par l'activation du récepteur au LPS, le TLR4, qui a été montré comme étant impliqué dans la neuroinflammation (Braun et al., 2012; Ogimoto et al., 2006).

Des études ont montré que CCL2, dans le cerveau, peut être produit par les neurones, les astrocytes, la microglie et les oligodendrocytes. De la même manière, les récepteurs des chimiokines sont exprimés par ces 4 types cellulaires, mais seulement dans les neurones et les astrocytes en conditions physiologiques. Dans notre modèle de neuroinflammation induite dans l'hypothalamus par une injection aiguë de LPS, nous n'avons pas déterminé le ou les types cellulaires majoritairement producteurs de CCL2, et si nos résultats suggèrent un effet direct de CCL2/CCR2 sur les neurones à MCH, nous ne pouvons pas exclure l'existence d'intermédiaires, notamment les cellules gliales.

Du fait du rôle fondamental supposément joué par la signalisation CCL2/CCR2 dans le système MCH dans un contexte de perte de poids associée à une neuroinflammation de haut-grade, il est probable que, comme l'axe SDF-1/CXCR4 sur les neurones à AVP du PVN et du noyau supraoptique (SON ; « supraoptic nucleus ») (Callewaere et al., 2006), l'axe CCL2/CCR2 ait un effet sur les neurones à MCH du LHA, et notamment sur la sécrétion de MCH, dans des conditions physiologiques. De manière intéressante, lors de nos expériences étudiant l'effet de CCL2 sur la sécrétion de MCH, nous avons observé en plus de l'effet drastique de la chimiokine sur cette libération induite par le KCl, qu'une nouvelle stimulation au KCl d'explants hypothalamiques prétraités avec l'inhibiteur INCB3344 du CCR2 induit une sécrétion de MCH supérieure en comparaison aux autres conditions, suggérant que le CCL2 endogène agirait sur le système MCH et pourrait participer à la régulation hypothalamique de l'homéostasie énergétique. Comme cela a déjà été montré, CCL2 est exprimé par des neurones du LHA (Banisadr et al., 2005a), et on pourrait postuler qu'en conditions normales, il y a production neuronale, en quantité restreinte, de CCL2, agissant de manière autocrine en se liant aux récepteurs CCR2 exprimés par les neurones à MCH, et qu'en conditions inflammatoires, il y ait surproduction de CCL2 par d'autres cellules alors activées, notamment les astrocytes, amplifiant l'effet de CCL2 sur le système MCH.

Il peut paraître surprenant que nous n'ayons pas de observé de diminution significative de la prise alimentaire dans notre modèle. Les études pharmacologiques ont clairement identifié un effet orexigène de la MCH. Cependant, les résultats issus des études chez les souris transgéniques sont davantage en faveur d'un rôle majeur de la MCH dans la « conservation d'énergie » (Barson et al., 2013). Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier le métabolisme de souris dans nos différentes conditions par calorimétrie indirecte.

Par ailleurs, des résultats non publiés de notre laboratoire suggèrent un lien entre inflammation systémique de haut-grade, perte de poids et axe CCL2/CCR2 dans un contexte de cachexie liée au cancer pancréatique : en effet, le poids chez ces patients évolue proportionnellement à l'inverse de la concentration sérique de CCL2.

Enfin, de manière paradoxale, CCL2 a été largement impliquée dans l'obésité et notamment, il a été suggéré que CCR2 est nécessaire à l'hyperphagie lorsque les souris sont nourries avec un régime « occidental » (Weisberg et al., 2006). Cependant, une différence notable pourrait expliquer au moins en partie ces effets « opposés » de l'axe CCL2/CCR2 sur la prise de poids : l'intensité de l'inflammation selon le contexte. En effet, au contraire de notre modèle LPS, l'inflammation associée à l'obésité est de bas-grade. Il

serait donc intéressant d'étudier la réponse des neurones à MCH dans des conditions de balance énergétique positive et négative.

En résumé, nos résultats démontrent que l'injection cérébrale de LPS induit une neuroinflammation, et notamment la synthèse de CCL2, qui pourrait inhiber la signalisation du système MCH par liaison à son récepteur CCR2 exprimé par les neurones en question, et de cette manière participer à la perte de poids observée dans ce contexte.

Cette étude illustre pour la première fois l'implication d'un axe chimiokinergique dans la régulation de la prise alimentaire par action sur les réseaux neuropeptidergiques de l'hypothalamus et ouvre la voie à des études mécanistiques plus approfondies. Par exemple, dans un premier temps, il serait intéressant de déterminer si tous les types cellulaires du cerveau mentionnés précédemment répondent au LPS en produisant davantage de CCL2. Pour cela, la stimulation de cellules primaires de chaque type, avec du LPS, pourrait donner des éléments de réponse. Par ailleurs, pour confirmer le rôle fondamental de l'effet de CCL2/CCR2 sur les neurones à MCH dans la perte de poids liée à l'injection cérébrale de LPS, il serait intéressant de réitérer les injections de LPS chez des souris où la signalisation CCR2 serait inhibée spécifiquement dans les neurones à MCH (siRNA, shRNA, système conditionnel Cre/Lox,…). Aussi, comme mentionné précédemment, il est primordial d'étudier le métabolisme des souris après injection par calorimétrie indirecte et d'étudier la prise alimentaire et prise hydrique dans des cages métaboliques pour affiner notre étude.

1.5. Article « CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity »

Voir page suivante.

CCL2 mediates central inflammation-induced weight loss through inhibition of MCH neuronal activity

Ophélia Le Thuc[1,2], Alice Guyon[1,2], Julie Cazareth[1,2], William Rostène[3], Catherine Heurteaux[1,2], Nicolas Blondeau[1,2#], Jean-Louis Nahon[1,2,*,#] and Carole Rovère[1,2,*,#]

[1] Université de Nice Sophia Antipolis, IPMC, Sophia Antipolis, F-06560, France;

[2] CNRS, IPMC, Sophia Antipolis, F-06560, France;

[3] Institut de la Vision, UMRS 968-Université Pierre et Marie Curie, F-75012 Paris, France.

Authorship note

#These co-authors share last author position.

*Correspondence to Dr Carole Rovère (rovere@ipmc.cnrs.fr) and Dr Jean-Louis Nahon (nahonjl@ipmc.cnrs.fr)

Running title

LPS-induced weight loss is mediated through CCL2

Abstract

Injuries or infections induce endocrine, autonomic and behavioral changes known as sickness behavior. Among them, appetite and weight loss appear driven by hypothalamic cytokines. When centrally injected, lipopolysaccharide (LPS) induces weight loss that is correlated to a temporal sequence of expression linking pro-inflammatory cytokines (IL-1β, IL-6 and TNF-α) and chemokines (notably CCL2) with down-regulation of the orexigenic neuropeptide, melanin-concentrating hormone (MCH). The particular CCL2 overexpression profile led us to investigate whether CCL2 could mediate LPS effects. When centrally injected, CCL2 triggers neuroinflammation, MCH down-regulation and weight loss. Furthermore, CCL2 hyperpolarizes MCH neurons and reduces KCl-induced MCH release from perifused hypothalamic explants. These effects are reversed by the CCR2 antagonist INCB3344 and in CCR2-deficient mice. Finally, the demonstration that MCH neurons express CCL2 receptor confirms that CCL2 could act directly on MCH-neurons to promote inflammation associated weight loss. We conclude that CCL2 up-regulation through modulation of the MCH neuronal network mediates LPS-induced weight loss.

Keywords: Weight loss / neuroinflammation / CCL2 chemokine / CCR2 signaling pathway / Melanin Concentrating Hormone

Introduction

Sickness behavior refers to the broad behavioral changes in response to inflammation involving pro-inflammatory cytokines, like interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α). Its striking features, that are mood and eating behavioral alterations (Kent et al., 1992), depend on many neuronal cell groups (McCusker and Kelley, 2013), including hypothalamic neurons that regulate energy balance and stress response.

Cytokines and chemokines, known to play an important role in inflammation-induced anorexia and catabolism (Konsman and Dantzer, 2001; Plata-Salaman, 2001) affect the brain through several pathways (McCusker and Kelley, 2013). In visceral injuries, local cytokines act on primary afferent nerves, like the vagus and the trigeminal nerves, to rapidly act on the brain. Following bacterial infection, activation of resident macrophages of the choroid plexus and circumventricular organs, devoid of blood-brain-barrier (BBB), induce synthesis of pro-inflammatory cytokines that directly enter the brain. Peripheral cytokines may also cross the BBB using saturable transport systems or through local openings. In addition, cytokine activation of perivascular macrophages and brain endothelial cells generate prostaglandins E2 that act on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to regulate stress responses (Serrats et al., 2010). Finally, the central nervous system (CNS) may also synthesize *de novo* cytokines following systemic or central inflammation (Dantzer, 2004) but the functional link between hypothalamic circuitry and cytokines in altering feeding behavior remains poorly understood.

Systemic injections of lipopolysaccharide (LPS) are used to study peripheral and central inflammation associated to sickness behavior. LPS-exposition triggers suppression of appetite and weight loss (Konsman et al., 2002) that appear mainly dependent upon central inflammatory mechanisms (Wisse et al., 2007). CNS inflammation can be triggered independently from systemic cytokines by non-hematopoietic cells of the brain expressing the LPS receptor: the Toll like receptor 4 (TLR4) (Chakravarty and Herkenham, 2005).

The CNS networks underlying anorectic responses, mostly composed of peptidergic cell types, involve both "first order" neuronal populations such as the neuropeptide Y (NPY)/agouti-related polypeptide (AgRP) and pro-opiomelanocortin (POMC)/cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expressing neurons in the arcuate nucleus (ARC) (Sohn et al., 2013) and "second order" neurons such as those from the lateral hypothalamic area (LHA) (Swanson et al., 2005), namely the melanin-concentrating hormone (MCH)

(Bittencourt et al., 1992; Huang et al., 1999; Leibowitz et Wortley, 2004; Nahon, 2006; Sakurai et al., 1998) and the hypocretins/orexins (ORX) (de Lecea et al., 1998) neurons, which control feeding and body weight.

Thus, it was tempting to speculate that central inflammatory signaling may temporarily alter "first order" and "second order" neurons to promote LPS-provoked weight loss. While few interleukins receptors were found on hypothalamic neurons (Ericsson et al., 1995; Hanisch et al., 1996), they are particularly lacking in the LHA neurons. In contrast, chemokine receptors are widely expressed and functional on hypothalamic neurons (Callewaere et al., 2007). We thus hypothesized that chemokines could be crucial intermediates between cytokines and neuropeptides in the cascade linking inflammation to anorexia. Among chemokines, we paid a particular attention to the monocyte chemoattractant protein 1 MCP-1/ C-C motif chemokine ligand 2 CCL2 because it is distributed in glial cells but also in discrete neuronal populations in the CNS (Banisadr et al., 2005), that its brain level is increased in several inflammatory diseases (Rostene et al., 2007) and that decreased brain inflammation was found in CCL2 knockout (KO) mice after peripheral LPS injection (Thompson et al., 2008). So far, neither the relative role of CCL2, nor of the C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2) (Charo et al., 1994) was studied in inflammation-induced anorexia following central injection of LPS. Here, we demonstrate that CCL2 inhibits MCH expression/release in the hypothalamus, one of the major systems regulating feeding behavior, to mediate the weight loss observed in inflammation-associated sickness behavior.

Results

Brain-injected LPS reduces MCH mRNA and peptide expression through CCR2 signaling

We first determined levels of mRNA encoding cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α), and neuropeptides (NPY, AgRP, POMC, MCH, ORX, CART), 1, 3 and 6 h after intracerebroventricular (icv) injection of LPS, to cover primary responses, and 18 and 24 h after injection, to analyze secondary and counteractive responses. As shown in Fig 1A, IL-1β mRNA expression levels displayed two distinct waves that peaked at 3 h and 18 h (23-fold) post-injection while IL-6 mRNA (16-fold) and TNF-α mRNA (7-fold) levels were transitorily elevated at 3 h in the LPS-treated group as compared to the saline controls.

For the neuropeptides-encoding mRNAs, a 12-fold and transitory peak of induction was found for POMC (but not for CART) (Fig EV1A and B) whereas NPY (and also AgRP) mRNA expression was down-regulated by 2-fold at 1 h post-injection (Fig EV1C and D). In contrast, a late and sustained down-regulation occurred for MCH (Fig 1B) and ORX mRNA (Fig EV2A) 18h and 24h after LPS injection.

The protein levels of MCH and ORX followed the mRNA patterns observed at 1, 6, 18h LPS post-injection. MCH (53.5±5.2 ng/mg of proteins) (Fig 1C) and ORX (83.1±2.1 ng/mg of proteins) (Fig EV2B) dropped down compared to saline group at 18h post-LPS. No change was observed for both neuropeptides in the cerebellum extracts used as negative controls (Fig 1C and EV2B).

We then quantified the hypothalamic gene expression of cytokines and chemokines 6 h after LPS or saline injection, i.e. after the first wave of increased cytokine gene expression and before down-regulation of MCH or ORX gene expression. LPS induced a 4- to 8-fold increase in mRNA encoding IL-1b, IL1rn and several other pro-inflammatory cytokines, including TNFa (Fig EV3A). Strikingly, the most robust activation of expression was found for genes encoding the CCL chemokines that bind to the CCR2 and/or CCR5 receptors (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7; Fig EV3B). As CCL2 plays a major role in brain inflammation following peripheral injection of LPS and interacts selectively with CCR2 in rodent brains (Cazareth et al., 2014; Conductier et al., 2010; Thompson et al., 2008), we focused on the CCL2/CCR2 signaling pathway. We determined the temporal patterns of expression of CCL2 mRNAs and protein induced by icv injection of LPS and confirmed the strong up-regulation of both gene and protein 6 h after LPS injection (Fig EV3C and D). Then, we examined the relative importance of the CCR2 signaling pathway in the MCH-expressing neuronal network. Strikingly, the 2-fold decrease in MCH mRNA expression at 18h LPS post-injection was reversed in mice treated with INCB3344, a selective CCR2 antagonist (Brodmerkel et al., 2005) and in CCR2 KO mice (at 81% and 77% of the initial MCH mRNA content, respectively) (Fig 1D), suggesting that CCR2 signaling plays a fundamental role in the LPS-based neuroinflammatory response leading to MCH gene down-regulation.

Brain-injected CCL2 suppresses MCH mRNA and peptide expression through CCR2 signaling

We tested thereafter the hypothesis that a specific activation of CCR2 signaling may mimic the spectrum of cytokine/chemokine and neuropeptide gene expression variations observed following LPS treatment. We found that CCL2 icv injection increased mRNA coding for IL-

1β, IL-6 and TNF-α by a 5.5-, 2.3- and 2.8-fold respectively at 6h post-injection (Fig 2A). A fast (1h) and long-lasting (up to 18h) activation of both CCL2 mRNA and protein levels was also found in the hypothalamus (Fig 2B and C). Finally, expression of MCH or ORX-encoding mRNA was down-regulated by 2.1 and 2.6-fold at 6 and 18h, respectively (Fig 2D and EV2C).

CCL2 injection significantly decreased by 2-fold both MCH and ORX peptides concentrations compared to control group at 6 and 18h post-injection (Fig 2E and EV2D). No change was observed for both neuropeptides in the cerebellum extracts used as negative controls (Fig 2E and EV2D). The demonstration that CCL2-induced MCH down-regulation in the LHA was fully dependent upon the CCR2 signaling pathway was obtained in CCR2 KO mice and in mice treated with INCB3344 that didn't display the 2-fold decrease in MCH mRNA expression at 18h LPS post-injection (Fig 2F).

CCR2 is expressed by MCH neurons in the LHA of normal mice

As the distribution of CCR2 in normal rodent brain was poorly described (Rostene et al., 2007), we characterized CCR2-immunoreactivity (CCR2-IR) in mice expressing cyan fluorescent protein (CFP) under the control of the MCH promoter (MCH-CFP) (Guyon et al., 2009; Stanley et al., 2010). MCH (green) and CCR2 (red) immunoreactivities largely overlapped demonstrating that most of the MCH neurons expressed CCR2 receptors (approximately 70 %; Fig 3A).

CCL2 directly hyperpolarizes MCH neurons in mouse brain slices

To explore whether alteration of MCH release could be the result of a direct action of CCL2 on MCH neurons, we performed patch-clamp experiments on fluorescent neurons expressing MCH of the lateral hypothalamic slices prepared from MCH-CFP mice. CCL2 application hyperpolarizes MCH neurons (Fig 3B). CCR2 antagonist INCB3344 prevented CCL2-induced hyperpolarization (Fig 3B) and the hyperpolarization amplitude was dependent on CCL2 concentration (Fig 3C). It was of (absolute value in mV) 2.17±0.94 at 0.1 nM CCL2, 3.45±0.56 at 1 nM CCL2 and 5.63±1.08 at 10 nM CCL2.

As a small increase in membrane conductance suggested that CCL2 could induce channel openings, we investigated whether the hyperpolarization induced by CCR2 activation could be due to the activation of a G protein activated inward rectifier current (GIRK). The effect inverted around -80 mV that is the equilibrium potential for K^+ ions. We found that the effect

of 1 nM CCL2 was significantly blocked by previous application of 200 µM barium, a concentration known to inhibit specifically KIR channels (Fig 3C). 200 µM barium alone induced a significant depolarization of MCH neurons (of 10.00±1.67 mV), suggesting that KIR channels are spontaneously opened under control conditions in MCH neurons. We then measured the current induced by CCL2 in voltage clamp at a holding potential of -60 mV, with a KCl intracellular solution. CCL2 (10 nM) induced a small outward current (+7.5±1.44 pA) associated with a decrease in membrane resistance (Fig EV4A and B). CCL2 (10 nM) also increased by 30% the frequency of spontaneous post-synaptic currents without significant effect on the amplitude of these events (Fig EV4C and D).

Finally, we investigated the consequences of the CCL2 effects on action potential (AP) discharge (Fig 3D). CCL2 induces either delays (Fig 3D, left panel) or failures (Fig 3D, right panel) in action potential emission. This effect was likely a consequence of a decrease in membrane resistance due to GIRK channels and/or receptor channels opening.

CCL2 abolishes KCl-induced MCH release from hypothalamic explants

Based on our observations of decrease in MCH neurons excitability we evaluated whether CCL2 could modulate the MCH release induced by a robust KCl-mediated neuronal depolarization. Perifusion of hypothalamic tissues with 60 mM KCl for 30 min induced a 3.1-fold increase in MCH release (Fig 3E, black line). Strikingly, this increase was fully blunted by co-application of CCL2 (Fig 3E, red line), an inhibitory effect reversed by addition of the CCR2 antagonist INCB3344 (Fig 3E, blue line).

LPS decreases body weight through a CCR2-dependent mechanism

We evaluated the effect of icv injection of LPS or CCL2 on feeding behavior and body weight in CCR2 KO or CCR2 antagonist-treated mice and controls. Icv injection of 500 ng LPS did not seem to decrease significantly food intake in WT mice. Yet, it decreased body weight, with a maximum effect after 22h (-10.9%±0.64; $p<0.001$) and for at least 48 h relative to saline-injected WT mice (Fig 4A, left panel). CCR2 antagonist injection or invalidation of the CCR2 gene in transgenic mice prevented this weight loss (globally 19 %; Fig 4A, right panel), with a maximum effect at the early times (6-8 hours) and a late partial recovery which represented 35 and 51 % of the fold increase observed at 26h LPS post-injection (Fig 4B), respectively. Interestingly, icv injection of CCL2 (100ng) reduced body-weight with a maximum decrease at 26h post-injection (5 % of initial weight). The

invalidation of the CCR2 gene conferred completely prevented CCL2-induced weight loss (Fig 4C).

Discussion

While a participation of the ARC was established in inflammation–induced anorexia or weight loss (Ogimoto et al., 2006; Reyes and Sawchenko, 2002; Ruud et al., 2013), a contribution of LHA neurons expressing orexigenic neuropeptides like MCH or orexins could also be considered (Gaykema and Goehler, 2009; Grossberg et al., 2011). Furthermore, brain CCL2/CCR2 signaling is activated by systemic LPS injection (Cazareth et al., 2014; Thompson et al., 2008).

Here, we demonstrated that central LPS-induced weight loss depends on the activation of the CCR2 signaling in MCH-expressing neurons and revealed for the first time that locally produced brain chemokines may act directly on appetite–regulating neuronal networks. Brain inflammation was induced by icv injection of LPS, as confirmed by an up-regulation of cytokines like IL-1β, that followed the characteristic two wave patterns observed after peripheral LPS injection (Quan et al., 1998).

This cerebral inflammation was associated to a striking decrease in orexigenic peptides MCH and ORX and to an increase in many CCR2 ligands. Among potential candidates, CCL2 was particularly considered, based on i) its strong brain expression following systemic LPS challenges (Brown et al., 2010; Cazareth et al., 2014; Skelly et al., 2013), ii) its key role in the recruitment of monocytes in the brain (Carrillo-de Sauvage et al., 2012; Schellenberg et al., 2012) and iii) on the fact that brain inflammation following peripheral LPS injection is markedly reduced in CCL2 KO mice (Thompson et al., 2008). Furthermore, CCL2 and CCR2 are expressed in LHA neurons (Banisadr et al., 2005; Banisadr et al., 2002), in contrast to sporadic cytokine receptors expression (Ericsson et al., 1995; Hanisch et al., 1996). Therefore we investigated whether CCL2 would act as intermediate between cytokines and neurons in the cascade linking inflammation to alteration of neuronal networks involved in food behavior. Firstly, its particular kinetics of activation following central LPS injection arises between inflammatory cytokines activation and down-regulation of MCH and ORX. Secondly, its primary receptor, CCR2 is expressed into MCH-producing neurons leading to hypothesize that CCL2 could directly modulate MCH-neurons activity. Indeed, in mice with genetic or pharmacological CCR2 disruption, icv LPS injection was inefficient in reducing MCH mRNA. Such mandatory effect of CCL2/CCR2 signaling on MCH gene regulation was

confirmed by the full reversion of CCL2-induced MCH mRNA decrease in the CCR2 KO and INCB3344 treated mice.

CCL2 generates a hyperpolarization blocked by low barium concentration associated to an increase in membrane conductance, characteristic of activation of a GIRK current. This will tend to shunt somatic excitatory currents and block the propagation of excitatory events. Indeed, CCL2, via the direct stimulation of CCR2, depresses the frequency of discharge of evoked APs. Finally, we addressed the effect of CCL2 on the release of MCH induced by KCl-mediated depolarization (Sekiya et al., 1988). We found a drastic reduction in MCH secretion by adding CCL2, an effect fully blocked by the INCB3344 antagonist. Intriguingly, further MCH secretion induced by KCl-mediated depolarization was observed only in the presence of the INCB3344 antagonist (data not shown) suggesting that endogenous CCL2 may also contribute to the strong inhibition of MCH release. As a significant proportion of MCH neurons could express both CCR2 and CCL2 and could be activated by the general depolarization induced by KCl, the locally expressed chemokine would act as a short-loop autocrine modulator amplifying the CCL2 responses driven by astrocyte activation (Carrillo-de Sauvage et al., 2012; Morrone et al., 2014). Thus both sources of brain CCL2 are likely to contribute to the inhibition of MCH secretion.

Among the myriad of mediators involved in the LPS-driven brain inflammation that modify the activity of neurons (Bezzi et al., 2004; Block and Hong, 2005; Jourdain et al., 2007; Mariotto et al., 2007), we demonstrated here that CCL2/CCR2 signaling could directly inhibit a major orexigenic neuronal network, i.e. the MCH neuronal pathway.

As CCL2's effects on feeding behavior and body weight were poorly investigated (Plata-Salaman and Borkoski, 1994) this study is the first demonstrating selective weight loss following CCL2 icv injection in mice, an effect fully abolished in CCR2 KO mice. Interestingly, the LPS-induced weight loss was markedly reduced in CCL2 antagonist-treated mice and in CCR2 KO mice, suggesting that CCR2 signaling contribute significantly to LPS-driven weight loss, likely through a MyD88-independent mechanism (Braun et al., 2012; Ogimoto et al., 2006). However this hypothesis needs to be addressed using mice deficient for MyD88 in the CNS (Kleinridders et al., 2009).

Paradoxically, CCR2 signaling is involved in metabolic disorders associated to obesity (Panee, 2012) as underlined by its role in the hyperphagic response to a high fat diet(Weisberg et al., 2006). Nevertheless, a low-grade inflammation both in the CNS and at the periphery is associated to obesity (Gregor and Hotamisligil, 2011; Velloso et al., 2008)

while sickness response is associated to high-grade inflammation (explored here) eliciting different inflammatory signaling in the CNS(Thaler et al., 2009). Therefore resolving the paradox about the central effects of CCR2 signaling would require to evaluate the response of MCH neurons under conditions that promote either positive or negative energy balance.

In summary, our results demonstrate that brain LPS injection drives CCL2 synthesis that could lead to inhibition of MCH neuron activity through selective CCR2 signaling and subsequently decreases body weight. This represents the first evidence that a chemokine may directly affect a major orexigenic pathway to contribute to modulate a cardinal response of the sickness behavior.

Materials and Methods

Animals

6 to 8 weeks-old C57Bl/6J male mice (Janvier) or MCH-CFP transgenic mice (gift of Prof. J.M. Friedman, Rockefeller University, NY, USA) and CCR2 KO mice (Jackson Laboratories) were provided water and standard chow (SAFE) *ad libitum*. Mice were housed at 22-24°C with a 12h light/12h dark cycle and were acclimatized for one week before experiments were performed. All of the protocols were carried out in accordance with French standard ethical guidelines for laboratory animals (agreement no 06-128, 27-05-2004).

Drugs injections and tissues collection for gene and protein analysis

Drugs were dissolved in saline solution (NaCl 0.9%) for injection. LPS (500ng; Sigma-Aldrich), CCL2 (100ng; Peprotech) and INCB3344 (10µM; MedChem Express) were stereotaxically injected with a 23-gauge stainless steel cannula in the right lateral ventricle (coordinates from bregma: anteroposterior: -0.5mm; +1.6mm from midline; dorsoventral: -2.4mm) of anesthetized (isofluran) WT or CCR2 KO mice, in a total volume of 5µl at a rate of 0.5µl/min. The localization of the injection sites was systematically controlled. Control mice received saline solution. Experimental groups were injected the same day. Mice body weight was regularly monitored until sacrifice at different times of interest after injection. Hypothalami and cerebellum were dissected and processed to study mRNA and protein contents by quantitative RT-PCR and CBA, ELISA or EIA respectively (for methods details, see the Appendix Supplementary Methods). Primers for real-time quantitative PCR were designed using Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems) and are detailed in Table EV1.

Immunohistochemistry

Phenotype of MCH-CFP neurons was determined by immunostaining of CCR2 and NeuN on 50µm thick brain floating sections of MCH-CFP mice using the following antibodies: anti-rabbit CCR2 (1:400, (Banisadr et al., 2002)), anti-mouse NeuN (neuron-specific nuclear protein, 1/250, Millipore) and secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488 or 594 (1/1000; Molecular Probes). Confocal microscopy observations were performed with a Laser Scanning Confocal Microscope (TCS SP, Leica).

Whole-cell patch-clamp recordings

Hypothalamic slices obtained from brains of 11-28 days old MCH-CFP-KI mice were studied in current-clamp experiments as we previously described (Guyon et al., 2005a) and detailed in the Appendix Supplementary Methods.

Perifusion of hypothalamic tissue

Three hypothalamic explants from 8 week-old male C57Bl/6J mice (coordinates: bregma -0.22 mm to -3,28 mm) were placed in each perifusion chamber in a controlled environment (37°C, 5%CO_2/95%O_2, constant flow of 1ml/10min of MEM (no glutamine, no phenol red, no HEPES; 51200-046 Invitrogen) with added 20µM bacitracin (Sigma), 1 mg/ml BSA (Sigma), 2mM L-glutamine and proteases inhibitors Complete EDTA-free (Roche). After a 2-h perifusion to reach equilibrium, the sampling procedure consisted of a 30-min control basal period, a 30-min period during which drugs were added independently or in combination (60mM KCl, 100nM CCL2, 1µM INCB3344) and a 60-min wash with the medium. After each experiment, 60mM KCl was applied to control the responsiveness of hypothalamic explants. Samples were collected and immediately frozen every 10 min. MCH concentration was measured by MCH EIA kit (ref EK-070-47, Phoenix Pharmaceuticals). At least 3 experiments were carried out for each substance tested (3 chambers per group in each experiment).

Statistical Analysis

Data obtained following icv injections were analyzed with GraphPad Prism 6 using statistical tests (ANOVA and Student's unpaired two-tailed t-test). The threshold for significance was $p< 0.05$. For electrophysiology experiments, ANOVA test was used to analyze the differences between groups, followed by a Student's Newman–Keuls *post hoc* test with a threshold of significance of $p < 0.05$ using a statistical software package (SigmaStat 2.03, Jandel Sci).

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr S. Mélik-Parsadaniantz (Institut de la Vision, UMRS 968, Paris) for the gift of the anti-rabbit CCR2 antibody, F. Massa, S. Berthezène and L. Lucas for their technical support. This work was supported by the CNRS, the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20150331738 to J.L.N. and DRM20101220421 to N.B. and C.R.) and by the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01.

Author contributions

C.R., N.B. and J.L.N. conceived and supervised the study, designed experiments, and wrote the manuscript. C.R., N.B. designed and performed the majority of the experiments, interpreted results, generated figures and tables, and wrote the manuscript. O.L.T. participated to most and performed experiments, developing notably the perifusion set-up with W.R., interpreted results, generated figures and tables. A.G. performed and analyzed results from electrophysiology experiments. J.C. contributes to the fax-array analysis and all other authors discussed results and/or reviewed the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Banisadr, G., Gosselin, R.D., Mechighel, P., Kitabgi, P., Rostene, W., and Parsadaniantz, S.M. (2005). Highly regionalized neuronal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in rat brain: evidence for its colocalization with neurotransmitters and neuropeptides. J Comp Neurol *489*, 275-292.

Banisadr, G., Queraud-Lesaux, F., Boutterin, M.C., Pelaprat, D., Zalc, B., Rostene, W., Haour, F., and Parsadaniantz, S.M. (2002). Distribution, cellular localization and functional role of CCR2 chemokine receptors in adult rat brain. J Neurochem *81*, 257-269.

Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J.L., Seifert, G., Steinhauser, C., Pilati, E., and Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. Nat Neurosci *7*, 613-620.

Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W., and Sawchenko, P.E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. J Comp Neurol *319*, 218-245.

Block, M.L., and Hong, J.S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. Prog Neurobiol *76*, 77-98.

Braun, T.P., Grossberg, A.J., Veleva-Rotse, B.O., Maxson, J.E., Szumowski, M., Barnes, A.P., and Marks, D.L. (2012). Expression of myeloid differentiation factor 88 in neurons is not requisite for the induction of sickness behavior by interleukin-1beta. J Neuroinflammation *9*, 229.

Brodmerkel, C.M., Huber, R., Covington, M., Diamond, S., Hall, L., Collins, R., Leffet, L., Gallagher, K., Feldman, P., Collier, P*., et al.* (2005). Discovery and pharmacological characterization of a novel rodent-active CCR2 antagonist, INCB3344. J Immunol *175*, 5370-5378.

Brown, C.M., Mulcahey, T.A., Filipek, N.C., and Wise, P.M. (2010). Production of proinflammatory cytokines and chemokines during neuroinflammation: novel roles for estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology *151*, 4916-4925.

Callewaere, C., Banisadr, G., Rostene, W., and Parsadaniantz, S.M. (2007). Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. J Mol Endocrinol *38*, 355-363.

Carrillo-de Sauvage, M.A., Gomez, A., Ros, C.M., Ros-Bernal, F., Martin, E.D., Perez-Valles, A., Gallego-Sanchez, J.M., Fernandez-Villalba, E., Barcia, C., Sr., Barcia, C., Jr*., et al.* (2012). CCL2-expressing astrocytes mediate the extravasation of T lymphocytes in the brain. Evidence from patients with glioma and experimental models in vivo. PLoS One *7*, e30762.

Cazareth, J., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., and Petit-Paitel, A. (2014). Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. J Neuroinflammation *11*, 132.

Chakravarty, S., and Herkenham, M. (2005). Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. J Neurosci *25*, 1788-1796.

Charo, I.F., Myers, S.J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A.J., and Coughlin, S.R. (1994). Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 2752-2756.

Conductier, G., Blondeau, N., Guyon, A., Nahon, J.L., and Rovere, C. (2010). The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. J Neuroimmunol *224*, 93-100.

Dantzer, R. (2004). Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. Eur J Pharmacol *500*, 399-411.

de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S., 2nd*, et al.* (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 322-327.

Ericsson, A., Liu, C., Hart, R.P., and Sawchenko, P.E. (1995). Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. J Comp Neurol *361*, 681-698.

Gaykema, R.P., and Goehler, L.E. (2009). Lipopolysaccharide challenge-induced suppression of Fos in hypothalamic orexin neurons: their potential role in sickness behavior. Brain Behav Immun *23*, 926-930.

Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. Annu Rev Immunol *29*, 415-445.

Grossberg, A.J., Zhu, X., Leinninger, G.M., Levasseur, P.R., Braun, T.P., Myers, M.G., Jr., and Marks, D.L. (2011). Inflammation-induced lethargy is mediated by suppression of orexin neuron activity. J Neurosci *31*, 11376-11386.

Guyon, A., Conductier, G., Rovere, C., Enfissi, A., and Nahon, J.L. (2009). Melanin-concentrating hormone producing neurons: Activities and modulations. Peptides *30*, 2031-2039.

Hanisch, U.K., Rowe, W., van Rossum, D., Meaney, M.J., and Quirion, R. (1996). Phasic hyperactivity of the HPA axis resulting from chronic central IL-2 administration. Neuroreport *7*, 2883-2888.

Huang, Q., Viale, A., Picard, F., Nahon, J., and Richard, D. (1999). Effects of leptin on melanin-concentrating hormone expression in the brain of lean and obese Lep(ob)/Lep(ob) mice. Neuroendocrinology *69*, 145-153.

Jourdain, P., Bergersen, L.H., Bhaukaurally, K., Bezzi, P., Santello, M., Domercq, M., Matute, C., Tonello, F., Gundersen, V., and Volterra, A. (2007). Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. Nat Neurosci *10*, 331-339.

Kent, S., Bluthe, R.M., Kelley, K.W., and Dantzer, R. (1992). Sickness behavior as a new target for drug development. Trends Pharmacol Sci *13*, 24-28.

Kleinridders, A., Schenten, D., Konner, A.C., Belgardt, B.F., Mauer, J., Okamura, T., Wunderlich, F.T., Medzhitov, R., and Bruning, J.C. (2009). MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. Cell Metab *10*, 249-259.

Konsman, J.P., and Dantzer, R. (2001). How the immune and nervous systems interact during disease-associated anorexia. Nutrition *17*, 664-668.

Konsman, J.P., Parnet, P., and Dantzer, R. (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. Trends Neurosci *25*, 154-159.

Leibowitz, S.F., and Wortley, K.E. (2004). Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. Peptides *25*, 473-504.

Mariotto, S., Suzuki, Y., Persichini, T., Colasanti, M., Suzuki, H., and Cantoni, O. (2007). Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. Curr Med Chem *14*, 1940-1944.

McCusker, R.H., and Kelley, K.W. (2013). Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. J Exp Biol *216*, 84-98.

Morrone, S.R., Wang, T., Constantoulakis, L.M., Hooy, R.M., Delannoy, M.J., and Sohn, J. (2014). Cooperative assembly of IFI16 filaments on dsDNA provides insights into host defense strategy. Proc Natl Acad Sci U S A *111*, E62-71.

Nahon, J.L. (2006). The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. C R Biol *329*, 623-638; discussion 653-625.

Ogimoto, K., Harris, M.K., Jr., and Wisse, B.E. (2006). MyD88 is a key mediator of anorexia, but not weight loss, induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 beta. Endocrinology *147*, 4445-4453.

Panee, J. (2012). Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. Cytokine *60*, 1-12.

Plata-Salaman, C.R. (2001). Cytokines and feeding. Int J Obes Relat Metab Disord *25 Suppl 5*, S48-52.

Plata-Salaman, C.R., and Borkoski, J.P. (1994). Chemokines/intercrines and central regulation of feeding. Am J Physiol *266*, R1711-1715.

Quan, N., Whiteside, M., and Herkenham, M. (1998). Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. Neuroscience *83*, 281-293.

Reyes, T.M., and Sawchenko, P.E. (2002). Involvement of the arcuate nucleus of the hypothalamus in interleukin-1-induced anorexia. J Neurosci *22*, 5091-5099.

Rostene, W., Kitabgi, P., and Parsadaniantz, S.M. (2007). Chemokines: a new class of neuromodulator? Nat Rev Neurosci *8*, 895-903.

Ruud, J., Nilsson, A., Engstrom Ruud, L., Wang, W., Nilsberth, C., Iresjo, B.M., Lundholm, K., Engblom, D., and Blomqvist, A. (2013). Cancer-induced anorexia in tumor-bearing mice is dependent on cyclooxygenase-1. Brain Behav Immun *29*, 124-135.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richarson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S*., et al.* (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell *92*, 1 page following 696.

Schellenberg, A.E., Buist, R., Del Bigio, M.R., Toft-Hansen, H., Khorooshi, R., Owens, T., and Peeling, J. (2012). Blood-brain barrier disruption in CCL2 transgenic mice during pertussis toxin-induced brain inflammation. Fluids Barriers CNS *9*, 10.

Sekiya, K., Ghatei, M.A., Lacoumenta, S., Burnet, P.W., Zamir, N., Burrin, J.M., Polak, J.M., and Bloom, S.R. (1988). The distribution of melanin-concentrating hormone-like immunoreactivity in the central nervous system of rat, guinea-pig, pig and man. Neuroscience *25*, 925-930.

Serrats, J., Schiltz, J.C., Garcia-Bueno, B., van Rooijen, N., Reyes, T.M., and Sawchenko, P.E. (2010). Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. Neuron *65*, 94-106.

Skelly, D.T., Hennessy, E., Dansereau, M.A., and Cunningham, C. (2013). A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of systemic LPS, IL-1beta, [corrected] TNF-alpha and IL-6 challenges in C57BL/6 mice. PLoS One *8*, e69123.

Sohn, J.W., Elmquist, J.K., and Williams, K.W. (2013). Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. Trends Neurosci *36*, 504-512.

Stanley, S., Pinto, S., Segal, J., Perez, C.A., Viale, A., DeFalco, J., Cai, X., Heisler, L.K., and Friedman, J.M. (2010). Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 7024-7029.

Swanson, L.W., Sanchez-Watts, G., and Watts, A.G. (2005). Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. Neurosci Lett *387*, 80-84.

Thaler, J.P., Choi, S.J., Sajan, M.P., Ogimoto, K., Nguyen, H.T., Matsen, M., Benoit, S.C., Wisse, B.E., Farese, R.V., and Schwartz, M.W. (2009). Atypical protein kinase C activity in the hypothalamus is required for lipopolysaccharide-mediated sickness responses. Endocrinology *150*, 5362-5372.

Thompson, W.L., Karpus, W.J., and Van Eldik, L.J. (2008). MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. J Neuroinflammation *5*, 35.

Velloso, L.A., Araujo, E.P., and de Souza, C.T. (2008). Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. Neuroimmunomodulation *15*, 189-193.

Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. J Clin Invest *116*, 115-124.

Wisse, B.E., Ogimoto, K., Tang, J., Harris, M.K., Jr., Raines, E.W., and Schwartz, M.W. (2007). Evidence that lipopolysaccharide-induced anorexia depends upon central, rather than peripheral, inflammatory signals. Endocrinology *148*, 5230-5237.

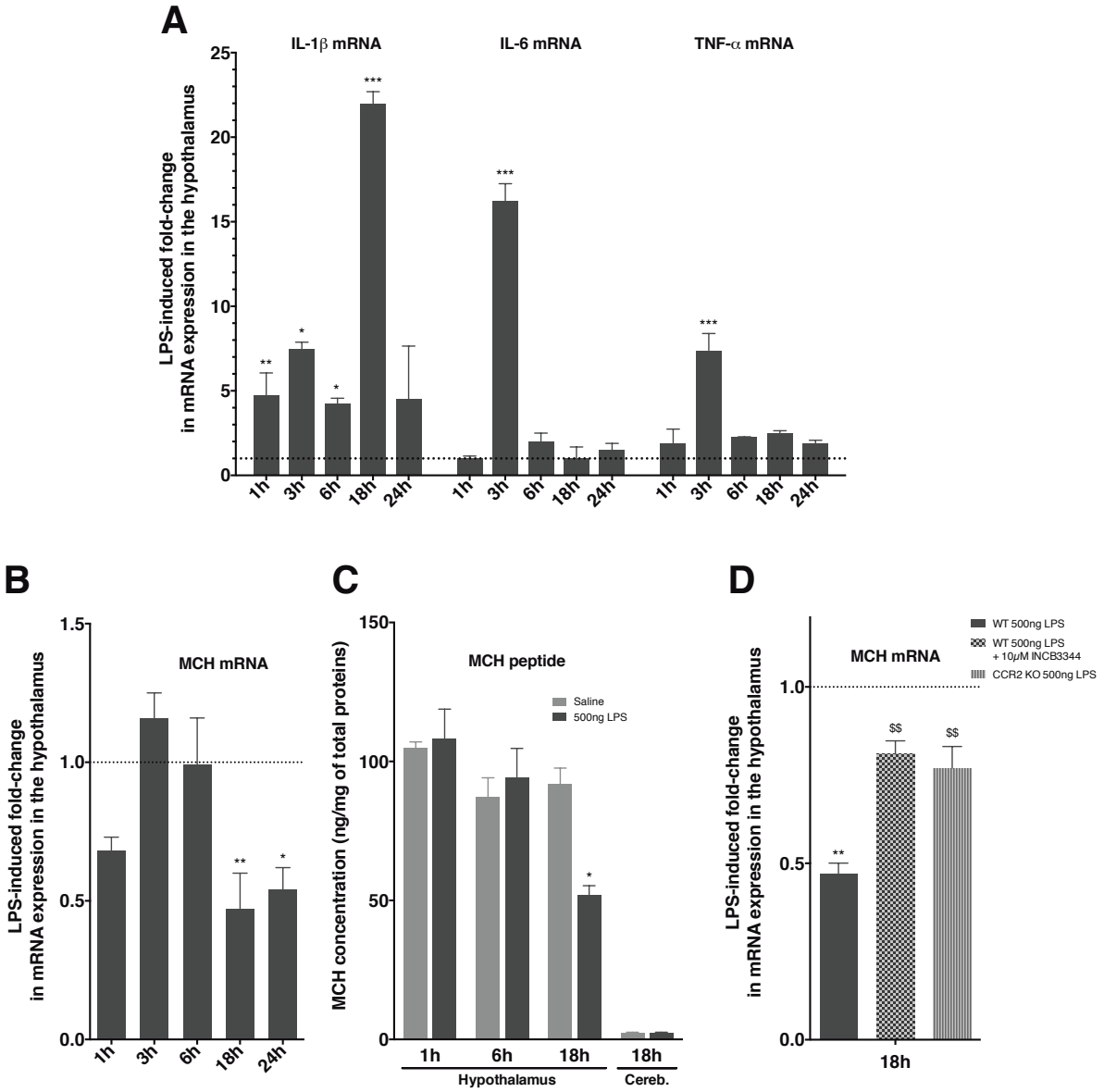


Figure 1. Brain-injected LPS induced differential variations in hypothalamic expression of cytokines and of the orexigenic neuropeptide MCH.

A, B Real-time PCR analysis of the genes coding for the pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, TNF-α (**A**) and the orexigenic peptide MCH (**B**) in the hypothalamus of LPS icv injected mice at different times after injection (from 1h to 24h), normalized to values in saline icv injected mice (n = 6 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, LPS icv injection versus saline icv injection. Data are expressed as means ± SEM.

C Measurement of MCH concentration by EIA in the hypothalamus after LPS icv injection (grey bars) or saline icv injection (black bars) at 1h, 6h and 18h post-injection. Cerebellum was used as negative control (3 independent experiments, n=6 per group in each experiment). *p<0.05, **p<0.01, LPS icv injection versus saline icv injection. Data are expressed as means ± SEM.

D The decrease in MCH mRNA levels observed 18h after LPS icv injection is abolished by the CCR2 antagonist INCB3344 (1 M) and in CCR2 KO mice, as shown by real-time

PCR analysis for MCH in the hypothalamus. Results were normalized to values in saline icv injected WT mice (n=6 per group). ** or $$ p<0.01. * compare saline and LPS icv injection in WT mice. $ compare LPS icv injection WT mice and LPS+INCB3344 icv injection in WT mice or LPS icv injection in CCR2 KO mice. Data are expressed as means ± SEM.

See also Figures EV1, EV2 and EV3.

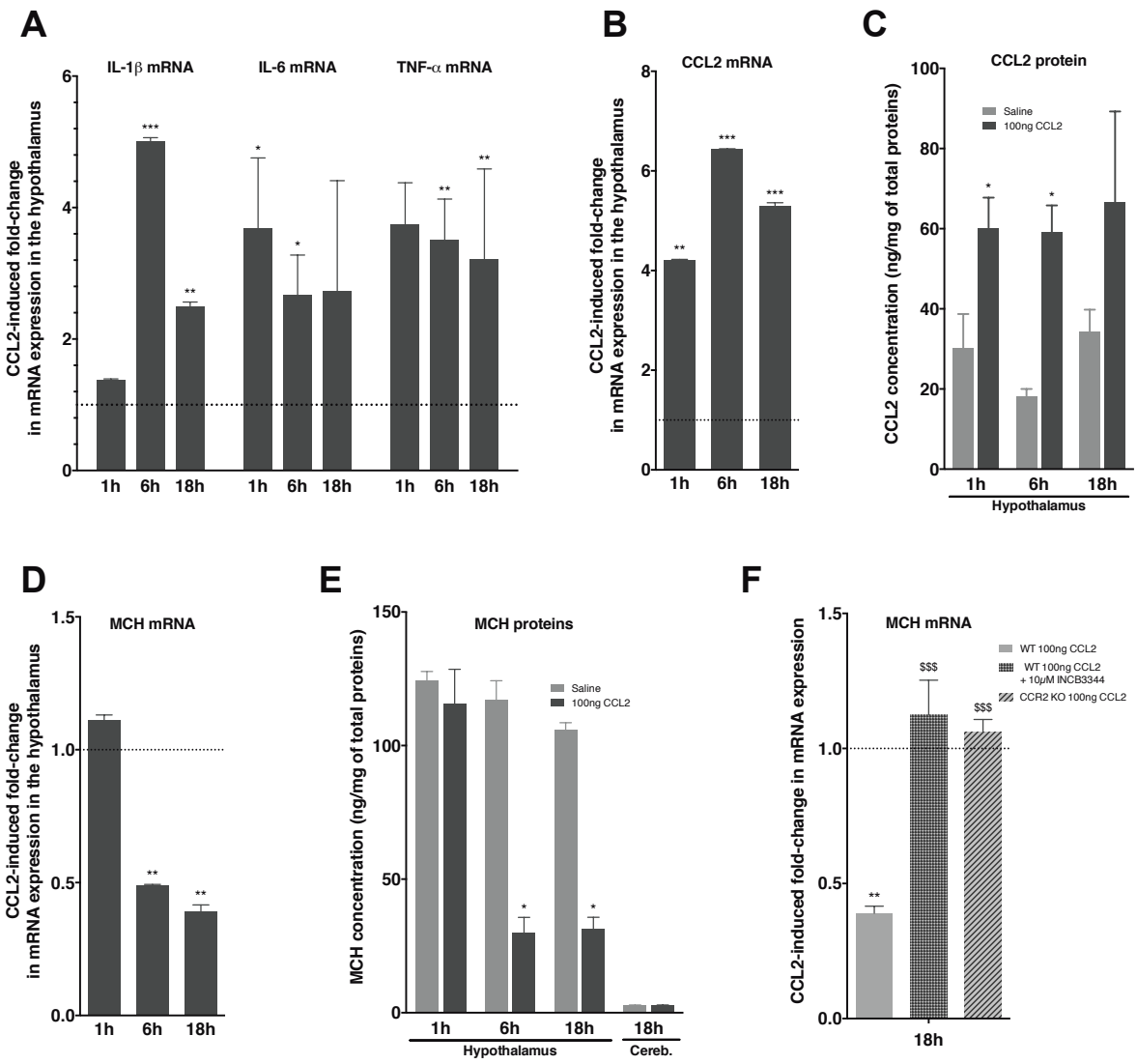


Figure 2. Brain-injected CCL2 altered the expression of pro-inflammatory cytokines and of the orexigenic neuropeptide MCH in the hypothalamus.

A Real-time PCR analysis of the genes coding for the pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, TNF-α in the hypothalamus of CCL2 icv injected mice at different times after injection (from 1h to 18h), normalized to values in saline icv injected mice (n = 6 per group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, CCL2 icv injection versus saline icv injection. Data are expressed as means ± SEM.

B, C Study of gene and protein hypothalamic expression of the chemokine CCL2 in CCL2 icv injected mice. Real-time PCR analysis for CCL2 (**B**) in CCL2 icv injected mice at different times after injection (from 1h to 18h), normalized to values in control saline icv injected mice (n = 6 per group). Measurement of CCL2 concentration by EIA (**C**) in the hypothalamus after CCL2 icv injection (black bars) or saline icv injection (grey bars) in mice at 1h, 6h and 18h after injection (3 independent experiments, n = 6 per group in each experiment). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, CCL2 versus saline condition. Data are expressed as means ± SEM.

D, E Study of gene and protein expression of the hypothalamic orexigenic peptide MCH in CCL2 icv injected mice. Real-time PCR analysis for MCH (**D**) in CCL2 icv injected mice at different times after injection (from 1h to 18h), normalized to values in control saline icv injected mice (n = 6 per group). Measurement of MCH concentration by EIA (**E**) in the hypothalamus after CCL2 icv injection (black bars) or saline icv injection (grey bars) in mice at 1h, 6h and 18h after injection (3 independent experiments, n = 6 per group in each experiment). Cerebellum was used as negative control. *p<0.05, ** p<0.01, CCL2 versus saline condition. Data are expressed as means ± SEM.

F The decrease in MCH mRNA levels observed 18h after CCL2 icv injection is abolished by the CCR2 antagonist INCB3344 (1 M) and in CCR2 KO mice, as shown by

real-time PCR analysis for MCH in the hypothalamus. Results were normalized to values in saline icv injected WT mice (n=6 per group). ** p<0.01, $$$ p<0.001. * compare saline and CCL2 icv injection in WT mice. $compare CCL2 icv injection WT mice and CCL2+INCB3344 icv injection in WT mice or CCL2 icv injection in CCR2 KO mice. Data are expressed as means ± SEM.

See also Figure EV2.

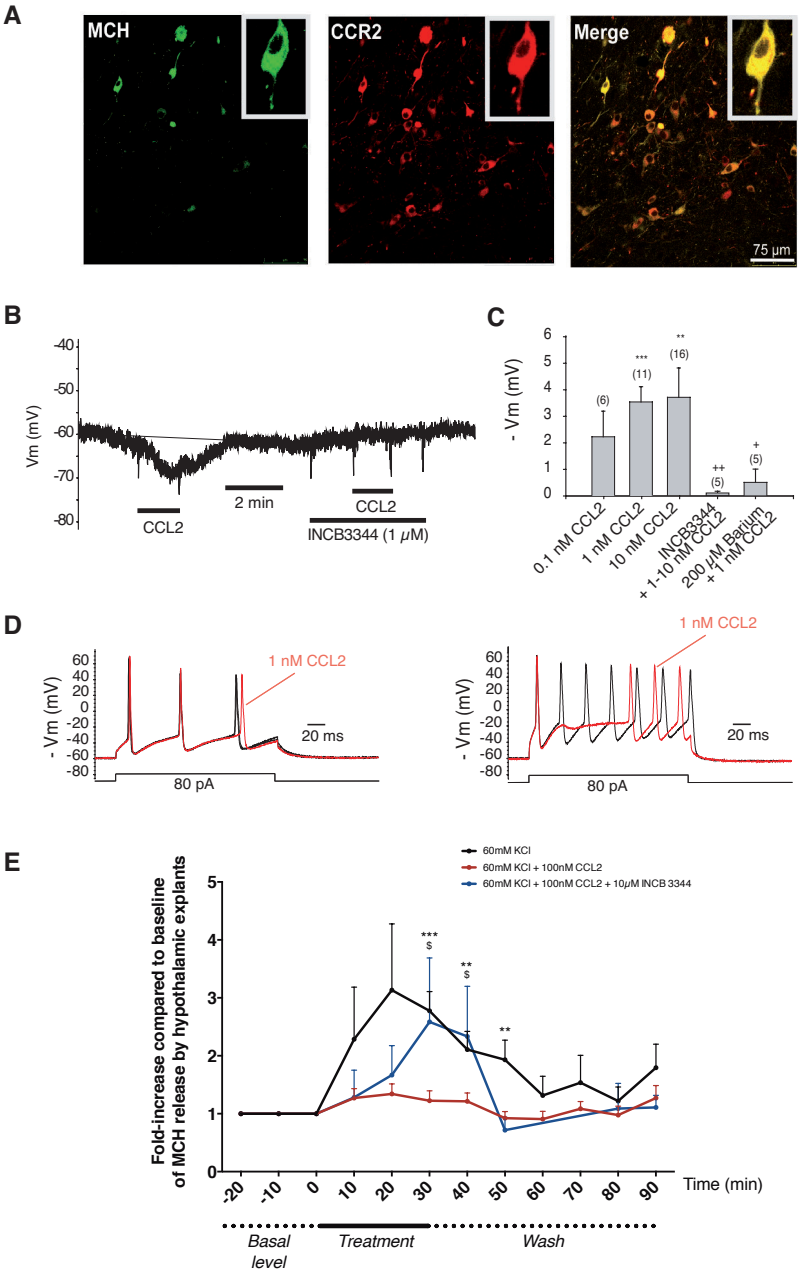


Figure 3. The chemokine CCL2 can directly modulate MCH neurons.
A Colocalization of MCH and the receptor for CCL2 (CCR2) in the LHA of mice expressing CFP under the promoter of MCH. The overlap of MCH and CCR2 immunoreactivity indicates that CCR2 is expressed on MCH neurons in the LHA.
B, D CCL2 effects on MCH neurons of MCH-CFP knock-in mice recorded in current- clamp mode. Representative trace of the effects of CCL2 on MCH neurons (**B**). The CCR2 antagonist INCB3344 prevents the small hyperpolarization of MCH neurons elicited by CCL2. Effects of CCL2 at various concentrations, alone or in the presence of the INCB3344 (1µM) or barium (200µM) on the membrane potential of MCH neurons (n= 5 to 16) (**C**). ** p<0.01, *** p< 0.001, t test after ANOVA; + p<0.05, ++ p<0.01 paired t test, against their own control. Data are expressed as means ± SEM. Discharge pattern of two representative MCH neurons in response to a depolarizing current pulse injection (current pulses applied every 10s) in control condition and in the presence of CCL2 (**D**). The control trace is recorded just before the application of CCL2 while the CCL2 trace is recorded 1 min after the beginning of CCL2 application. CCL2 delayed the third action potential (left panel) and induced failures in the action potential evoked in the right panel.
E Effect of CCL2 on KCl-induced MCH release. Perfusion of hypothalamic tissues with 60mM KCl for 30 min induces an up to 3.1-fold increase in MCH release. CCL2 (100 nM) dramatically blunts KCl-induced MCH release, which is prevented by the addition of INCB3344 (10µM) (3 to 5 independent experiments, 3 chambers per condition in each experiment). * or $ p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. * compare KCl and KCl+CCL2 conditions. $ compare KCl+CCL2 and KCl+CCL2+INCB3344 conditions. Data are expressed as mean fold-increase in MCH release per chamber versus basal secretion, ± SEM. See also Figure EV4.

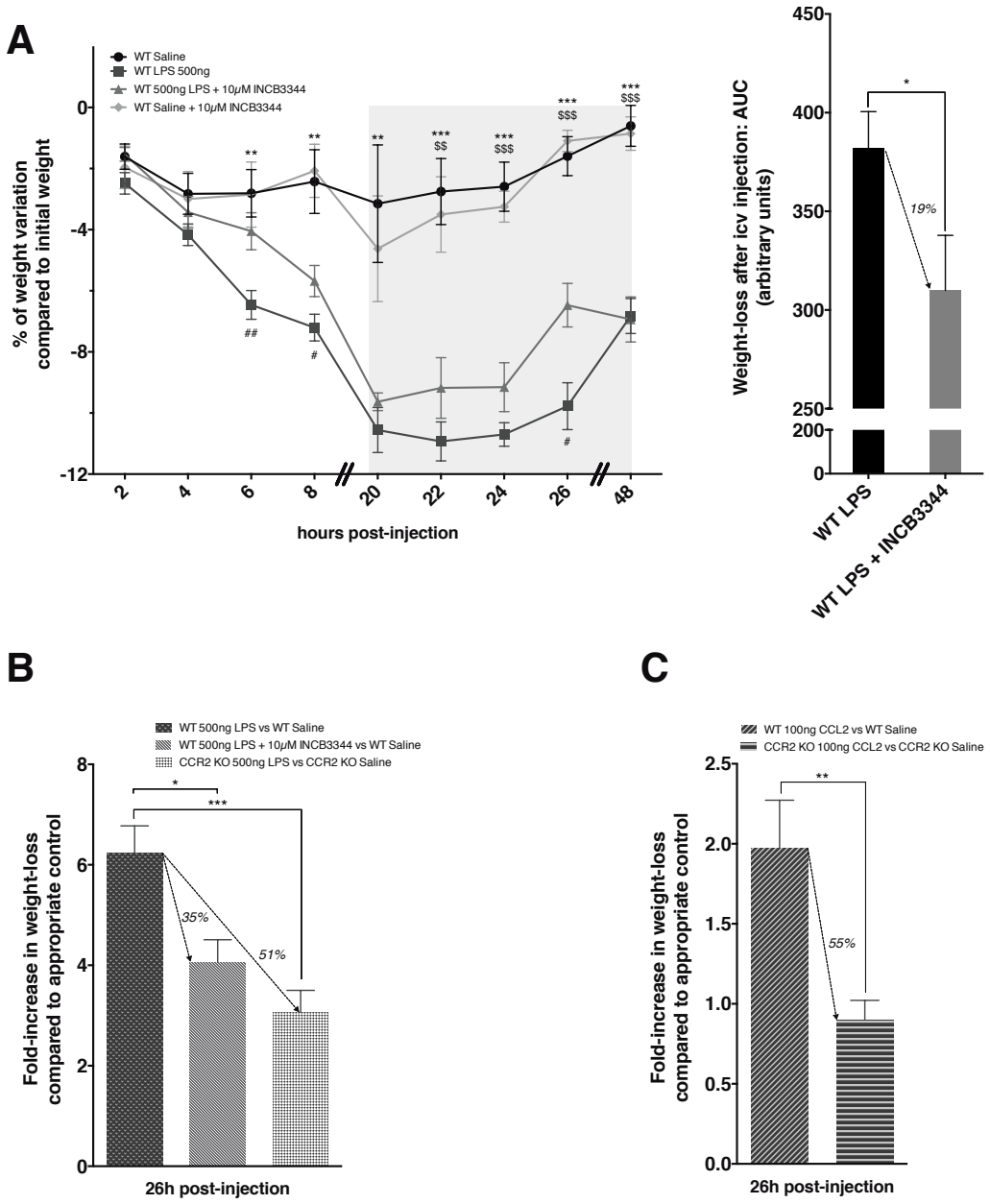


Figure 4. LPS and CCL2 decrease body weight through a CCR2-dependent mechanism.
A Effects of an acute icv injection of saline or LPS and/or INCB3344 on the weight of WT mice. Left panel: % of weight variation compared to the initial weight of the animals at different times after injection (from 2 to 48h) (n=6 in each group except for LPS: n=5). *, $, #, p<0.05; ##, p<0.01 and ***, $$$, p<0.001. *, $ and # compare saline versus LPS, saline versus LPS+INCB3344 and LPS versus LPS+INCB3344, respectively. Data are expressed as means ± SEM. Right panel: the area under curve (AUC) was calculated for curves representing the % of weight variation versus the initial weight after injection of each animal in each condition using Prism 6 software, with baseline set up at 0% of weight variation. * p<0.05, LPS versus LPS+INCB3344 conditions. Data are expressed as mean net AUC ± SEM.
B Weight-loss induced by LPS is blunted by INCB3344 and in CCR2 KO mice. Fold- increase in weight-loss 26h after icv injection of LPS and/or INCB3344 in WT mice or in CCR2 KO mice is determined by calculating the ratio of weight loss in test conditions and weight loss in their appropriate control conditions. * p<0.05, *** p<0.001, LPS+INCB3344 treatment in WT mice or LPS treatment in CCR2 KO mice versus LPS treatment in WT mice. Data are expressed as means ± SEM.
C Weight-loss induced by CCL2 is blunted in CCR2 KO mice compared to WT mice. Fold- increase in weight-loss 26h after icv injection of CCL2 in WT mice or in CCR2 KO mice is determined by calculating the ratio of weight loss in CCL2 icv injected WT or CCR2 KO mice and weight loss in their appropriate control conditions. ** p<0.01, CCL2 treatment in KO CCR2 mice versus CCL2 treatment in WT mice. Data are expressed as means ± SEM.

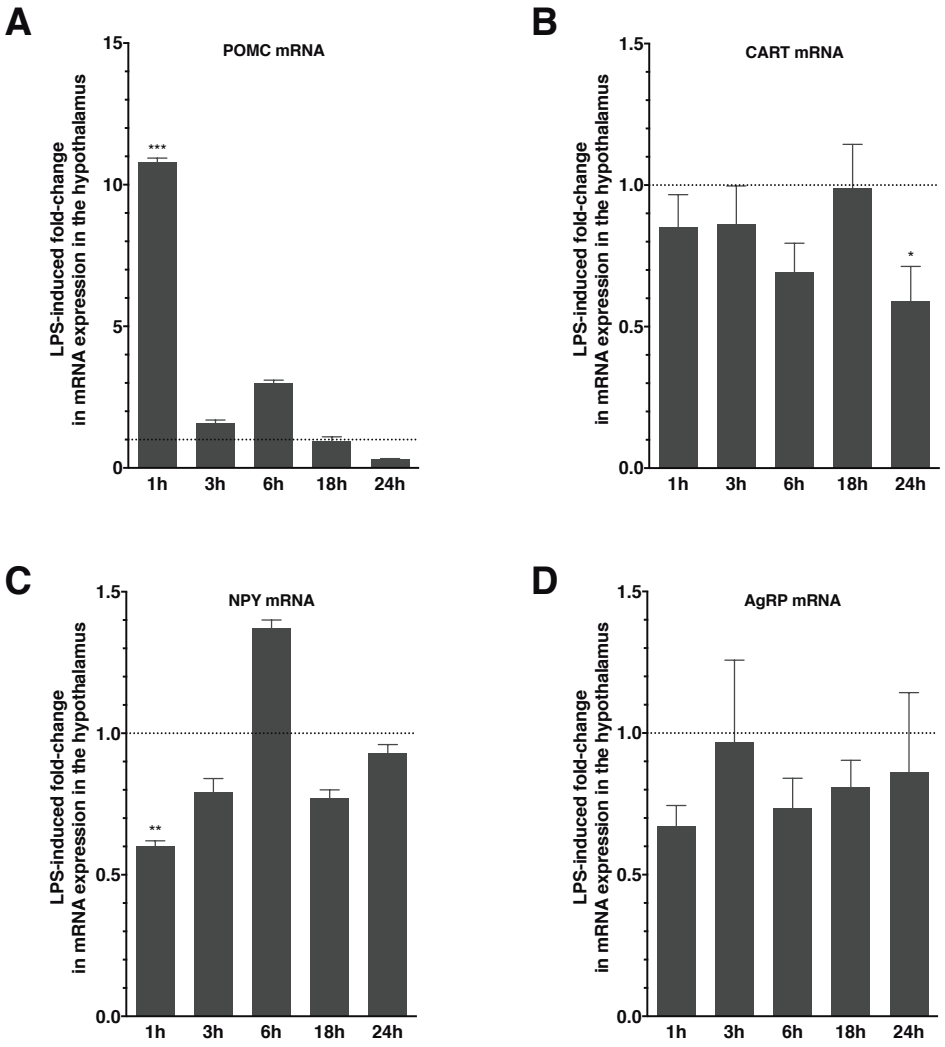


Figure EV1. Study of gene expression of the ARC peptides in LPS icv injected mice.
A, B, C, D Real-time PCR analysis of the genes coding for the hypothalamic peptides POMC (**A**), CART (**B**), NPY (**C**) and AgRP (**D**) in LPS icv injected mice at different times after injection (from 1h to 24h), normalized to values in saline icv injected mice (n = 6 per group).
* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, LPS condition versus saline condition. Data are expressed as means ± SEM.See also Figure 1.

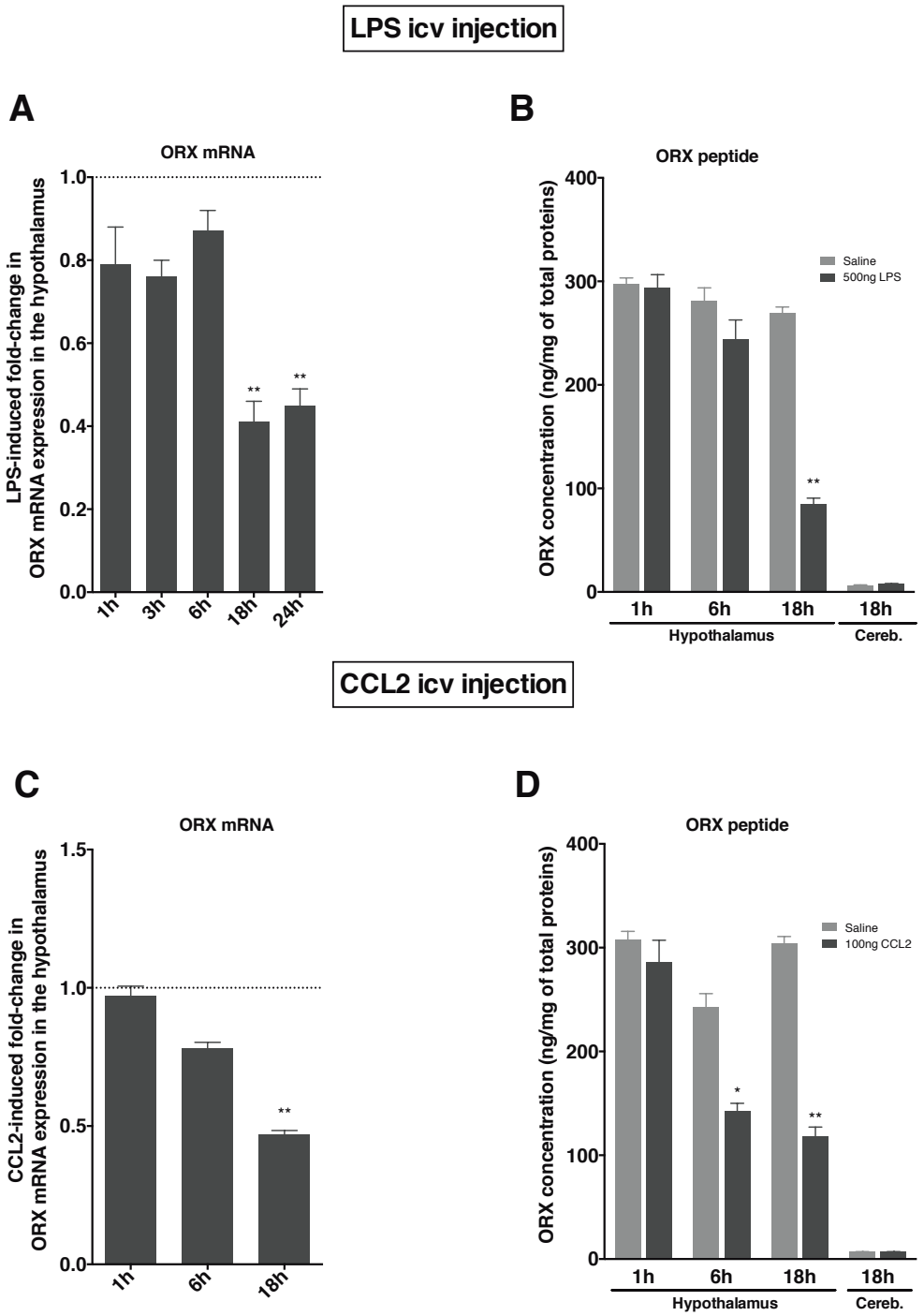


Figure EV2. Study of gene and protein expression of the hypothalamic peptide ORX in LPS (A, B) CCL2 (C, D) icv injected mice.

A Real-time PCR analysis for ORX in LPS icv injected mice at different times after injection (from 1h to 24h), normalized to values in control saline icv injected mice (n = 6 per group).

B Measurement of ORX concentration by EIA in the hypothalamus after LPS icv injection (black bars) or saline icv injection (grey bars) in mice at 1h, 6h and 18h after injection (3 independent experiments, n = 6 per group in each experiment). Cerebellum was used as negative control.

** $p<0.01$, LPS condition versus saline condition. Data are expressed as means ± SEM.

C Real-time PCR analysis for ORX in CCL2 icv injected mice at different times after injection (from 1h to 18h), normalized to values in control saline icv injected mice (n = 6 per group).

D Measurement of ORX concentration by EIA in the hypothalamus after CCL2 icv injection (black bars) or saline icv injection (grey bars) in mice at 1h, 6h and 18h after injection (3 independent experiments, n = 6 per group in each experiment). Cerebellum was used as negative control.* $p<0.05$, ** $p<0.01$, CCL2 condition versus saline condition. Data are expressed as means ± SEM.See also Figures 1 and 2.

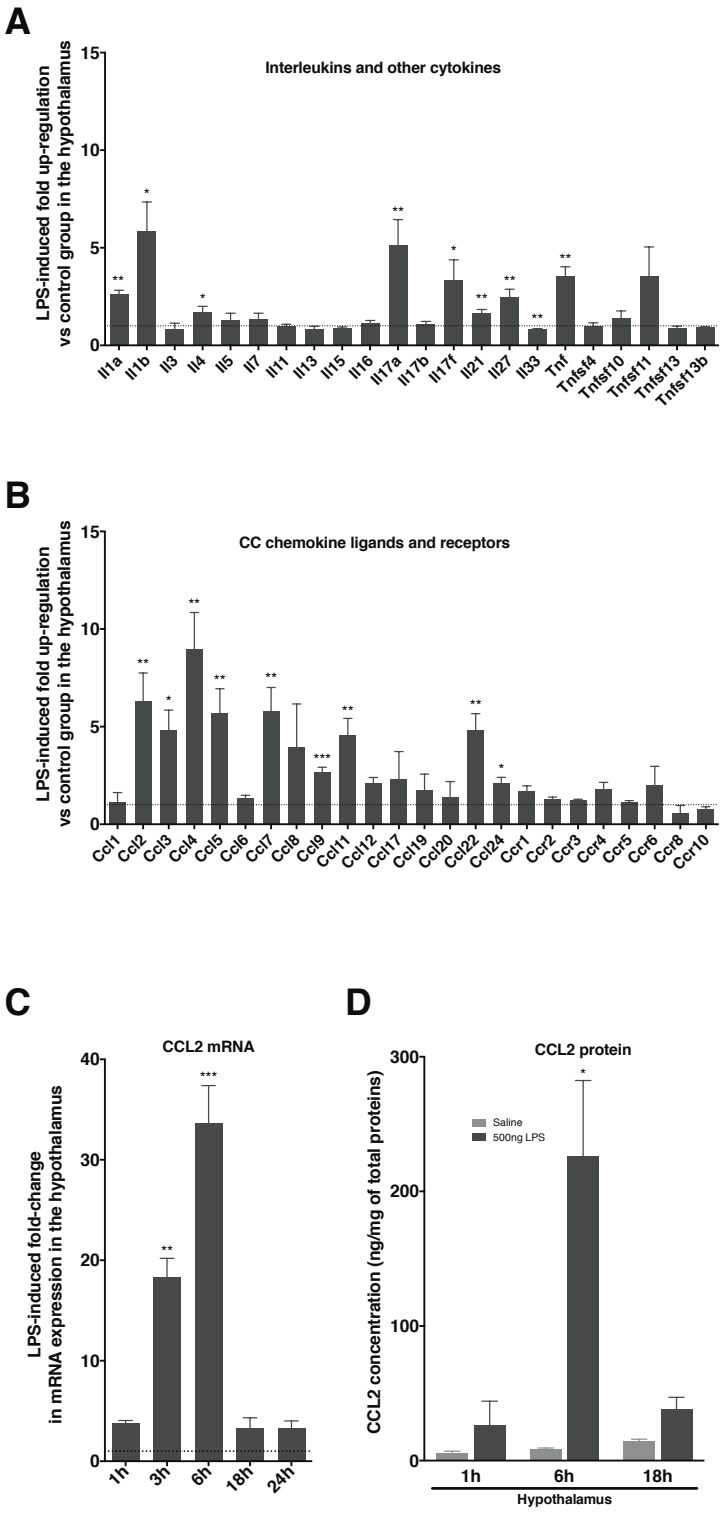


Figure EV3. Analysis of inflammatory markers expression in LPS icv injected mice.
A, B Analysis by real-time PCR Arrays of interleukins, cytokines (**A**) and CC chemokine ligands and receptors **(B**) gene expression in the hypothalamus 6h after an acute icv injection of LPS versus saline in WT mice (n = 6 per group). LPS-induced fold up-regulation versus saline condition was calculated using the ΔΔCT method according to the manufacturer's protocol.
C, D Study of gene and protein hypothalamic expression of the chemokine CCL2 in LPS icv injected mice. Real-time PCR analysis for CCL2 (**C**) in LPS icv injected mice at different times after injection (from 1h to 24h), normalized to values in control saline icv injected mice (n = 6 per group). Measurement of CCL2 concentration by EIA (**D**) in the hypothalamus after LPS icv injection (black bars) or saline icv injection (grey bars) in mice at 1h, 6h and 18h after injection (3 independent experiments, n = 6 per group in each experiment).*p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, LPS versus saline condition. Data are expressed as means ± SEM.See also Figure 1.

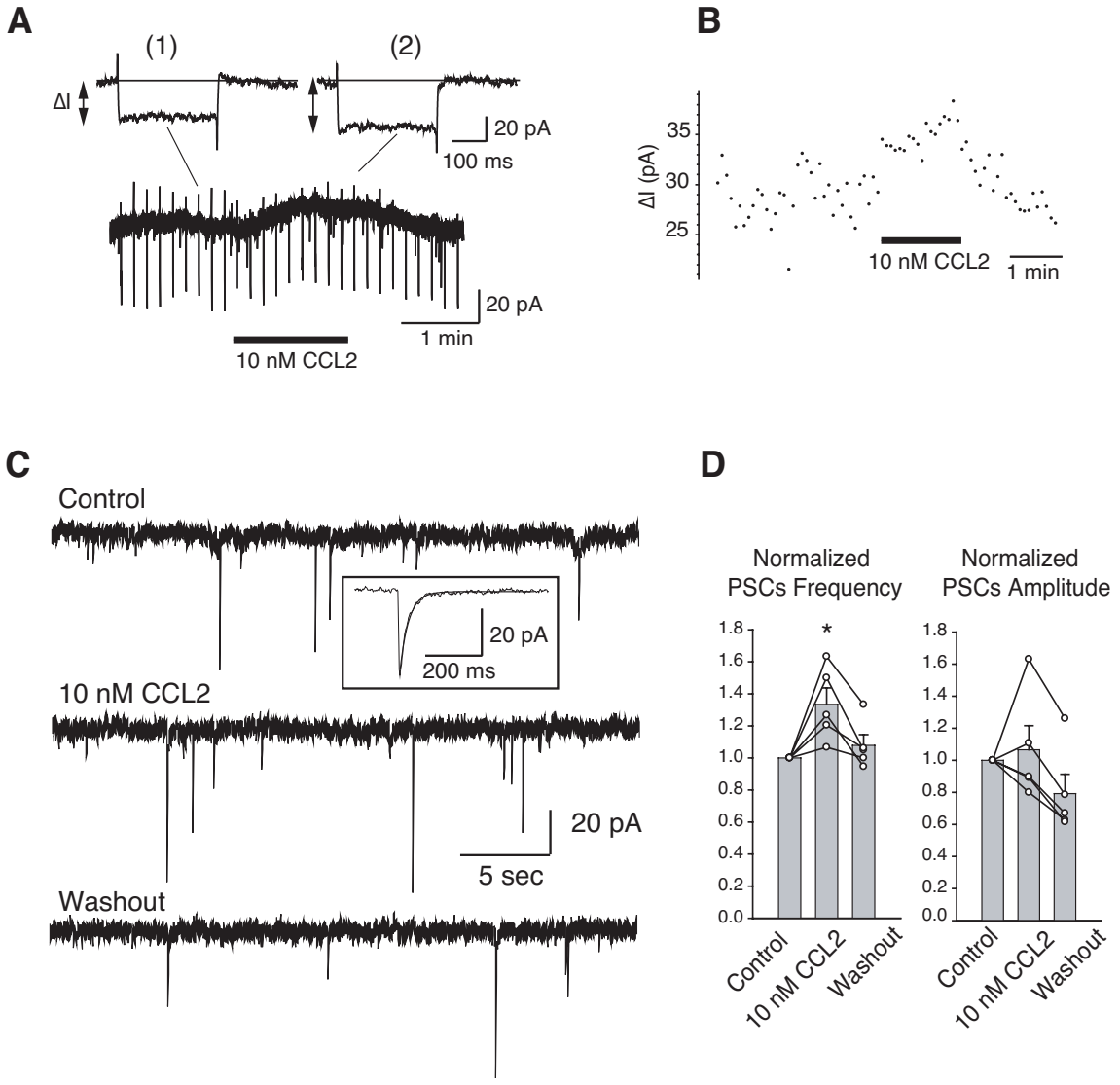


Figure EV4. Effects of CCL2 on MCH neurons of the LHA recorded in brain slices from MCH-CFP knock-in mice.
A, B MCH neurons were recorded in voltage-clamp using the KCl solution (trace filtered at 0.25 kHz) (n = 4). Example of the inward current induced by a local application of CCL2 (**A**). Rapid inward deflections were due to spontaneous activity and vertical bars represent the currents in response to hyperpolarizing steps of -10 mV from -60 mV during 300 ms every 10 s, as extended on the inset on top in the absence (1) and in the presence of CCL2 (2). Effect of CCL2 on the absolute value of the instantaneous current amplitude (ΔI) plotted against time of the cell presented in A (**B**).
C, D Effect of CCL2 on the spontaneous post-synaptic currents recorded on MCH neurons. Example of recordings obtained in whole-cell voltage-clamp on a MCH neuron maintained at a holding potential of -60 mV before (control), during the application of CCL2 (10 nM CCL2) or after CCL2 has been washed out (washout). Inset shows an example of event with an expanded time scale. The decay has been fitted to a single exponential (**C**). Effect of 10 nM CCL2 on the frequency (left) and amplitude (right) of post-synaptic currents (PSCs). Individual cells are indicated by circles and thin lines (n = 5). *p<0.05. 10 nM CCL2 versus control condition. Data are expressed as means ± SEM (**D**).

Appendix Supplementary Methods

RNA isolation

Total mRNA was isolated according the method described by Chomczynski and Sacchi (Chomczynski et al, 1987) using Fast Prep apparatus (Q-Biogene). 2 mg of total mRNAs were denatured at 65°C for 5min in presence of 0.5 mM dNTP and oligodT primers (25ng/µl).

RT-PCR

Except for RT^2 Profiler PCR arrays (see below) where manufacturer's protocol was followed, reverse transcription of mRNAs, was performed using SuperScript® III Reverse Transcriptase (100U; Life Technologies) in a total volume of 20 ml. A negative control lacking RT enzyme was also performed in each assay (NRT). RT and NRT mixtures were diluted 5 times to be used in quantitative real time PCR experiments.

Polymerase Chain Reaction Array for Cytokines and Chemokines

RT^2 Profiler Mouse Inflammatory Cytokines and Receptors PCR arrays (PAMM-011Z) (n = 6) were used to analyze the expression of a focused panel of genes. Data analysis was performed using the $\Delta\Delta C_T$ method according to the manufacturer's protocol (SABiosciences).

Quantitative Real Time PCR

Real time PCR was performed from reverse transcribed cDNA samples for relative quantitation of mRNA levels for the genes of interest. Quantitative real time PCR was performed in a LightCycler® 480 apparatus (Roche) using LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2X) as described by the manufacturer. Primers were designed using Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems) and are detailed in Table 1. Real time PCR was performed for amplification of mouse IL-1β, IL-6, TNF-α, CCL2, MCH, ORX, POMC, CART, NPY, AgRP and GAPDH mRNA. In each assay, PCR were performed in duplicate. Relative quantities of target genes were determined by comparison with results for the control housekeeping gene GAPDH.

Chemokine, cytokine and neuropeptide quantification

Cerebellar and hypothalamic areas were harvested in ice-cold HBSS (Invitrogen) containing protease inhibitor cocktail (Roche). Extracts were homogenized by polytron and centrifuged. Supernatants were kept frozen until use. The protein content of the extracts was determined using the Bio-Rad protein assay reagent (Biorad). A cytometric bead array (BD™ CBA

Mouse Inflammation Kit; BD Biosciences) and a mouse IL-1b ELISA Ready-SET-Go (eBiosciences) were used to measure protein levels of IL-6/TNF-α/CCL2 and IL-1b, respectively according the manufacturers protocols. MCH or ORX peptide levels in tissue lysates or in perifusion samples were measured by enzyme immunoassay kits, as described by manufacturer (refs EK-070-47 and EK-003-30 respectively; Phoenix Pharmaceuticals).

Whole-cell patch-clamp recordings

Whole-cell patch-clamp recording were carried out as previously described (Guyon et al., 2005a). Briefly, hypothalamic slices obtained from brains of 11-28 days old MCH-CFP-KI mice were continuously superfused with a microperfusion system. For current-clamp experiments, we used a K-gluconate internal solution containing (mM): K-gluconate 135, $CaCl_2$ 0.3, $MgCl_2$ 1, HEPES 10, EGTA 1, Mg2ATP 4, Na3GTP 0.4, pH adjusted to 7.3 with KOH. Values of access resistance ranged from 12 to 20 MW and were left uncompensated. The liquid junction potential between the internal solution (negative) and the standard PBBS solution was 13.2 mV. Membrane potential values given in the text were not corrected for the junction potentials. Measurements were made 2-3 min after obtaining the whole-cell to ensure dialysis. MCH neurons were recognized using fluorescence as CFP in these transgenic mice is expressed under the control of MCH promoter thus only in MCH-producing neurons.

Data were digitized at 5-10 kHz using a Digidata interface coupled to a microcomputer running pClamp 9 (Axon Instruments). Current-clamp data were digitized at 0.5 kHz using the same interface. Potentials were digitally filtered at 1-3 kHz. Average data are expressed as mean ± SEM, n = number of neurons.

Table EV1: Primers used for real-time PCR

Gene	sequence 5'-3'	concentration
mIL-1β-F	TGGTGTGTGACGTTCCCATT	
mIL-1β-R	CGACAGCACGAGGCTTTTTT	300 nM
mIL-6-F	CCCAATTTCCAATGCTCTCC	
mIL-6-R	TGAATTGGATGGTCTTGGTCC	300 nM
mTNF-α-F	TGTACCAGGCTGTCGCTACA	
mTNF-α-R	AGGGCAATTACAGTCACGGC	300 nM
mCCL2-F	CCAACTCTCACTGAAGCCAGC	
mCCL2-R	CAGGCCCAGAAGCATGACA	300 nM
mMCH-F	GAAGGAGAGATTTTGACATGCTCA	
mMCH-R	CCAGCAGGTATCAGACTTGCC	300 nM
mORX-F	GCCGTCTCTACGAACTGTTGC	
mORX-R	CGCTTTCCCAGAGTCAGGATA	300 nM
mPOMC-F	AGTGCCAGGACCTCACCA	
mPOMC-R	CAGCGAGAGGTCGAGTTTG	300 nM
mCART-F	CGAGAAGAAGTACGGCCAAG	
mCART-R	CTGGCCCCTTTCCTCACT	300 nM
mNPY-F	CCGCTCTGCGACACTACAT	
mNPY-R	TGTCTCAGGGCTGGATCTCT	300 nM
mAGRP-F	CCCAGAGTTCCCAGGTCTAAGTCT	
mAGRP-R	CACCTCCGCCAAAGCTTCT	300 nM
mGAPDH-F	GAACATCATCCCTGCATCC	
mGAPDH-R	CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	300 nM

2. Implication de la chimiokine CCL5 dans la prise de poids par action sur les neurones à MCH : un rôle dans la pathogenèse de l'obésité ?

2.1. Introduction

Comme discuté précédemment dans l'introduction (voir Introduction, section 3.2.2., paragraphe « Inflammation hypothalamique et obésité »), la communauté scientifique tend aujourd'hui à considérer l'inflammation hypothalamique comme à l'origine du développement de l'obésité nutritionnelle.

En effet, les nutriments, en temps normal, fluctuent avec les paramètres physiologiques normaux et sont des régulateurs importants des réseaux neuronaux hypothalamiques. Pour autant, la consommation excessive de ces mêmes nutriments semble être impliquée dans le déclenchement de l'inflammation métabolique dans l'hypothalamus. Par exemple, chez la souris, une administration aiguë de glucose dans le 3V augmente l'activité de NF-κB dans l'hypothalamus et non en périphérie (Zhang et al., 2008c). De même, l'augmentation de la concentration de certains lipides a été montrée comme pouvant exercer des effets pro-inflammatoires dans l'hypothalamus. Par exemple, l'administration ICV d'AG saturés (AGS) à longue chaîne chez le rat induit l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans l'hypothalamus (Milanski et al., 2009). Des études soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'inflammation métabolique hypothalamique est initiée par l'excès de nutriments plutôt que par le gain de poids et de masse grasse : par exemple, la consommation d'un HFD pendant 24 h suffit à augmenter l'expression génique de médiateurs pro-inflammatoires ainsi qu'une gliose (Thaler et al., 2012). Cette cinétique est bien trop rapide pour refléter une prise de poids significative dans le contexte de l'obésité. Par ailleurs, certains travaux ont montré que celle-ci disparaît longtemps après le retour à une consommation d'un régime « normal » et la perte de poids (Wang et al., 2012). D'autre part, la résistance à la leptine dans les neurones POMC/CART de l'ARC, qui s'installe en parallèle de l'inflammation hypothalamique, n'est pas réversible avant que les souris ayant été précédemment nourries avec un HFD de manière chronique aient consommé pendant 20 semaines un régime pauvre en lipides (Enriori et al., 2007). Ceci suggère que, si l'inflammation hypothalamique se met en place rapidement en réponse à la consommation d'un HFD, la restauration d'une fonction hypothalamique normale, après les dérégulations induites par la consommation d'un HFD, elle, est très lente.

D'autre part, le rôle des cytokines inflammatoires dans l'inflammation hypothalamique a aussi été étudié. Les données obtenues par les différentes études sont parfois

contradictoires. La surnutrition est associée à des niveaux relativement élevés d'activation d'IKKβ et de plusieurs cytokines inflammatoires (Zhang et al., 2008c). L'augmentation d'activité IKKβ/NF-κB pharmacologiquement ou par expression de formes constitutivement actives dans l'hypothalamus de souris induit une obésité et une insensibilité à la leptine et à l'insuline. L'inhibition de NF-κB maintient la sensibilité à l'insuline et à la leptine et protège contre l'obésité face au challenge nutritionnel (Zhang et al., 2008c). Cependant, l'activation forcée de la voie IKKβ/NF-κB spécifiquement dans les neurones hypothalamiques n'augmente pas l'expression de cytokines inflammatoires dans l'hypothalamus, suggérant que c'est l'activation de cette voie dans des cellules hypothalamiques non-neuronales qui induit l'expression de cytokines dans la mise en place de l'inflammation métabolique dans l'hypothalamus. Par ailleurs, des études ciblant de manière individuelle la signalisation de cytokines inflammatoires ont pu mettre en avant la capacité du TNF-α administré centralement, à mimer les effets de la surnutrition (Arruda et al., 2011; Calegari et al., 2011; Purkayastha et al., 2011a; Romanatto et al., 2007; Romanatto et al., 2009; Uysal et al., 1997; Ventre et al., 1997). Il est intéressant de noter que l'injection ICV d'acide stéarique (un AGS) mime les effets de celle de TNF-α, indiquant que ces acteurs modulent les mêmes voies ou des voies parallèles dans l'hypothalamus. La signalisation de NF-κB peut être intégrée par l'inflammasome NLRP3 (« NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 »), or, de manière intéressante, les lipides tels que le cholestérol sous forme cristalline ou les AGS, peuvent induire l'activation du NLRP3, menant à l'activation de la caspase-1 et à la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18. Des études ont montré que le NLRP3 est importante dans la pathogenèse de l'inflammation hypothalamique induite par la nutrition dans les tissus périphériques et les souris déficientes pour le Nlrp3 et la caspase-1 sont résistantes au développement de l'inflammation hypothalamique induite par le régime. Cependant, comme rappelé précédemment, les cytokines inflammatoires au niveau central ne mènent pas nécessairement à une prise de poids, et peuvent mener au contraire à une perte de poids. Notamment, l'IL-6 et l'IL-10 semblent contrecarrer les effets néfastes de la surnutrition, et même réduire la prise alimentaire, et il a été montré que dans l'obésité nutritionnelle, les niveaux d'IL-10 provenant de la rate sont diminués chez le rat. De manière surprenante, l'IL-4, cytokine anti-inflammatoire ayant montré des effets bénéfiques dans d'autres maladies neuroinflammatoires, semble favoriser les effets pro-inflammatoires au niveau hypothalamique lors de la consommation d'un HFD (Oh et al., 2010).

Dans ce contexte, notre équipe a cherché à identifier des intermédiaires « inflammatoires » entre les cytokines et les réseaux neuropeptidergiques de l'hypothalamus, qui pourraient participer aux dérégulations de la prise alimentaire et du poids corporel de manière à

favoriser l'obésité. Pour des raisons similaires à celles nous ayant conduit à étudier les chimiokines dans la perte de poids associée à une inflammation de haut-grade, nous nous sommes encore une fois donnés pour but d'identifier une ou plusieurs chimiokines pouvant induire une prise de poids dans ce contexte d'inflammation hypothalamique de bas-grade. Nos résultats préliminaires nous ont permis d'identifier la chimiokine CCL5 comme candidat potentiel pour médier ce type d'effets.

2.2. Matériels et Méthodes

2.2.1. Animaux et régimes

Dans un premier temps, nous avons développé un modèle d'obésité nutritionnelle chez la souris mâle C57BL6/J par consommation d'un régime hyperlipidique, le HFD Soja/Maïs (SAFE Diets), composé pour mimer les apports nutritionnels moyens d'un régime occidental.

Les souris sont nourries jusqu'à l'âge de 4 semaines avec un régime standard, puis sont séparées en deux groupes, dont un reste sous régime standard alors que l'autre est alors nourri avec le régime HFD Soja/Maïs pendant une période comprise entre 8 et 16 semaines. La composition des régimes est détaillée dans le tableau ci-dessous (Tableau 1).

Tout au long de l'expérience, les souris ont un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Le poids des animaux, la prise alimentaire et la prise hydrique sont mesurés tous les deux jours.

	Régime standard	**HFD Soja/Maïs**
Energie (kcal/g)	**2,8**	**4,5**
Protéines (%)	21,4	18,2
Glucides (%)	51,7	46,8
Lipides (%)	**5,1**	**20,0**
Détail de la composition en lipides du régime HFD		6,1% beurre anhydre 6% Crisco (huile hydrogénée) 6% saindoux *1,3% huile de soja* *0,5% huile de maïs* 0,15% cholestérol
Energie apportée par les lipides (%)	**13,6**	**40,3**
Rapport LA (omega-6)/ALA (omega-3)	**8,9**	**8,3**
Fibres, Minéraux, Humidité etc (%)	21,8	15

Tableau 2. Détails de la composition des régimes utilisés : régime standard et HFD Soja/Maïs

2.2.2. Injections

La chimiokine recombinante CCL5 de souris (Peprotech), diluée dans une solution saline (NaCl 0,9%) a été injectée chez des souris âgées de 8 semaines, soit en intrapéritonéal (5µg dans un volume de 200µl), soit en ICV (500ng dans un volume de 5µl), dans le 3V (pour coordonnées utilisées et détails de l'injection ICV, voir le paragraphe « Material and Methods» de l'article « CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity », section « Drugs injections and tissues collection for gene and protein analysis ».

2.2.3. Quantification de l'expression génique et/ou protéique de médiateurs inflammatoires et de la leptine en périphérie et/ou dans l'hypothalamus.

- ***Prélèvements de sérum et de tissus cérébraux***

Le sang des souris anesthésiées par voie respiratoire (isoflurane, 3%) est prélevé par ponction rétro-orbitaire après 8, 12 et 16 semaines de régime. Le sang est récupéré à l'aide de pipettes Pasteur héparinées (héparine 50mg/ml Sigma) et est collecté dans un tube « sérum-gel » (Sarsted) et centrifugé pendant 10min, à 4°C, à 10000 rpm. Le sérum (surnageant) est alors récupéré et congelé à -80°C. Après le prélèvement de sang, les souris sont sacrifiées et leur hypothalamus est prélevé et congelé à -80°C avant l'extraction des ARNs.

- ***Extraction protéique dans l'hypothalamus***

Voir l' « Appendix Supplementary Methods » de l'article « CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity », paragraphe « Chemokine, cytokine and neuropeptide quantification ».

- ***Dosage de la leptine***

La leptine est dosée dans le sérum grâce à ELISA (Assay Pro), d'après le protocole décrit par le fournisseur. L'intensité de la couleur est lue à 450 nm et les données sont exploitées grâce au logiciel GraphPad Prism.

- ***Dosage de médiateurs inflammatoires par cytométrie de flux***

La cytokine pro-inflammatoire IL-6 ainsi que des chimiokines CCL5 et CCL2 sont dosées par cytométrie de flux dans un appareil FACS Array à l'aide d'un kit CBA Flex Set (BD Biosciences). La quantification est effectuée d'après la fluorescence émise par la

phycoérythrine émettant à 585nm. Le dosage par cytométrie de flux ci-dessus est réalisé sur des échantillons de sérum et dans des extraits protéiques d'hypothalamus.

- ***Etude de l'expression génique : extraction d'ARN, transcription inverse et PCR quantitative en temps réel***

Voir l' « Appendix Supplementary Methods » de l'article « CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity », paragraphes « RNA isolation », « RT-PCR » et « Quantitative Real Time PCR ». Pour les séquences des amorces utilisées en qPCR, voir le Table EV1 de l'article « CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity », avec en supplément les amorces utilisées pour CCL5 :

mCCL5-F	ACACCACTCCCTGCTGCTTT	
mCCL5-R	AAATACTCCTTGACGTGGGCA	300 nM

2.2.4. Etudes électrophysiologiques de l'effet de CCL5 sur l'activité des neurones à MCH.

Pour les détails des méthodes utilisées, voir l' « Appendix Supplementary Methods » de l'article « CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity », paragraphes « Whole-cell patch-clamp recordings ».
Les bloqueurs ont été utilisés aux concentrations suivantes : TTX, 1µM, CNQX, 10µM, D-APV, 25µM et bicuculline, 10µM.

2.2.5. Expériences de superfusion : libération de glutamate.

- ***Préparation de synaptosomes et gliosomes***

Les synaptosomes et gliosomes purifiés ont été préparés selon un protocole adapté de (Dunkley et al., 1986). En bref, les tissus hypothalamiques ont été homogénéisés dans 10 volumes de sucrose (0,32M) tamponné à pH 7,4 à l'aide de Tris-(hydroxyméthyl)-amino méthane (concentration finale de Tris = 0,01M) en utilisant un broyeur en verre/Teflon. Les homogénats sont centrifugés (5min – 1000 g) pour éliminer les noyaux et les débris. Le surnageant est laissé à stratifier sur un gradient discontinu de (2%, 6%, 10% and 20% (v/v) dans du sucrose tamponné au Tris) et centrifugé (5min – 33500 g). La fraction entre 2% et 6% de Percoll (fraction gliosomale) et celle entre 10% et 20% de Percoll (fraction synaptosomale) ont été collectées par centrifugation. Les culots synaptosomaux et gliosomaux sont resuspendus dans une solution physiologique composée ainsi : NaCl,

140mM; KCl, 3mM; MgSO4mM, 1.2; CaCl2mM, 1.2; NaH2PO4, 1.2mM; NaHCO3, 5mM; HEPES, 10mM; glucose, 10mM; pH 7.2–7.4.

- ***Expériences de libération de glutamate***

Les synaptosomes et gliosomes sont incubés pendant 15min à 37°C dans un bain-marie. Des portions identiques de suspensions synaptosomales et gliosomales sont disposées sur des filtres microporeux au fond de chambres parallèles dans un « Superfusion System » ((Raiteri et al., 1974) Ugo Basile, Comerio, Varese, Italy) maintenu à 37°C. L'appareillage consiste en 24 unités identiques où les synaptosomes et gliosomes sont étalés sur des filtres microporeux sous aspiration modérée et « superfusés » avec une solution physiologique à un débit de 0,5ml/min pendant une période totale de 48min. Au sein de chaque expérience, chaque condition expérimentale a été conduite en triplicat.
Lors de l'étude de l'effet de CCL5 sur la libération spontanée du glutamate endogène, les synaptosomes et les gliosomes ont été d'abord équilibrés pendant les 36 premières minutes de superfusion, puis 4 fractions consécutives de 3min ont été collectées. CCL5 était appliquée à la fin de la première fraction collectée. Du Polypep 0,1% dialysé était présent pour empêcher la rétention de peptides dans le dispositif, notamment dans les tubes. Les fractions ont été collectées selon le schéma suivant : 2 fractions de 3min (libération basale), puis une fraction de 3 min avant, une fraction de 6 min puis une fraction après. L'effet de CCL5 sur la libération basale de glutamate a été évalué par calcul du ratio entre le contenu en acides aminés dans la fraction où l'effet maximal observé et celui de la première fraction, et en comparant ce rapport à celui obtenu en conditions contrôles.

- ***Détermination de la concentration de glutamate***

Les fractions collectées et synaptosomes et gliosomes superfusés sont analysées pour déterminer le contenu en neurotransmetteurs endogènes. Le glutamate endogène a été mesuré par HPLC après une dérivatisation pré-colonne avec du o-phthalaldéhyde et séparation sur une colonne chromatographique à phase inverse C18 (10 × 4,6 mm, 3 µm; à 30°C; Chrompac) couplée à une détection fluorimétrique (longueur d'onde excitatrice, 350nm ; longueur d'onde d'émission, 450nm ; (Grilli et al., 2004)). L'homosérine a été utilisée comme standard interne.

- ***Analyses statistiques***

Voir le paragraphe « Material and Methods» de l'article « CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity », section « Statistical analysis ».

2.3. Résultats

Notre but était donc d'identifier une chimiokine pouvant participer à la dérégulation des systèmes neuropeptidergiques de l'hypothalamus de manière à favoriser la prise alimentaire et/ou la prise de poids, et ainsi pouvant participer à la mise en place et/ou au développement de l'obésité.

2.3.1. Développement d'un modèle murin d'obésité nutritionnelle

Ainsi, nous avons développé un modèle d'obésité nutritionnelle. Pour cela, des souris mâles C57Bl6/J, âgées de 4 semaines au début de l'expérience, ont été nourries avec un HFD « HFD Soja/Maïs » (composé notamment d'huile de soja et de maïs) contenant 20% de lipides correspondant à 40,3% de l'énergie totale apportée par ce régime pendant 8 à 16 semaines. En parallèle, les animaux contrôles étaient nourris avec un régime standard contenant 5% de lipides correspondant à 13,6% de l'énergie totale apportée par ce régime.
Nos études ont été réalisées aux temps d'intérêt 8, 12 et 16 semaines, car 8 semaines de HFD correspondent à l'apparition des premiers signes d'obésité, 16 semaines de HFD mènent à un état d'obésité installée et nous avons choisi le temps 12 semaines comme représentatif d'un état d'obésité intermédiaire (Lin et al., 2000).

- ***Le régime HFD Soja/Maïs est obésogène***

Le régime HFD Soja/Maïs est induit une prise de poids significativement supérieure à celle induite par le régime standard dès la deuxième semaine (supérieure de 2% ; figure 19). A la 8ème semaine de régime, les souris du groupe HFD Soja/Maïs pèsent en moyenne 29,61 ± 0,32 g, soit un poids significativement supérieur de 10% à celui des animaux du groupe contrôle ($p<0,001$), qui pèsent en moyenne 26,99 ± 0,22 g. Cette prise de poids accrue induite par le régime HFD Soja/Maïs par rapport au régime standard est maximum à la 14ème semaine (+15%) et reste significative jusqu'à la 16ème semaine minimum (+12%) soit un poids moyen de 30,49 ± 0,43 g contre 34,28 ± 0,66 g.
Nous avons par ailleurs mesuré le taux de leptine dans le sérum des animaux contrôles et du groupe HFD, puisque l'hyperleptinémie est un indicateur indirect de l'obésité. Le taux circulant de leptine est significativement supérieur chez le groupe HFD, dès la 8ème semaine (figure 20). La concentration sérique de la leptine des animaux du groupe HFD était de 17,4 ± 2,5 pg/ml, 19,4 ± 3,2 pg/ml et 22,6 ± 1,7 pg/ml contre 9,0 ± 1,0 pg/ml, 7,1 ± 1,0 pg/ml et 7,1 ± 0,7 pg/ml chez les animaux contrôles, aux semaines 8, 12 et 16, respectivement. Cela représente une augmentation du taux de leptine multiplié par 1,9

(p<0,01), 2,7 (p<0,01) et 3,2 (p<0,001) après 8,12 et 16 semaines de régime, respectivement.

D'après la littérature, les souris rendues obèses auraient un poids significativement supérieur à celui des souris contrôles dès 2 semaines de régime et un poids approximativement supérieur de 10% après 8 semaines de régime ainsi qu'un taux de leptine multiplié par 2 environ après 8 semaines de régime (Buettner et al., 2007; Lin et al., 2000). Ainsi, le régime HFD Soja/Maïs apparaît comme capable d'induire une obésité, validant notre modèle d'obésité nutritionnelle.

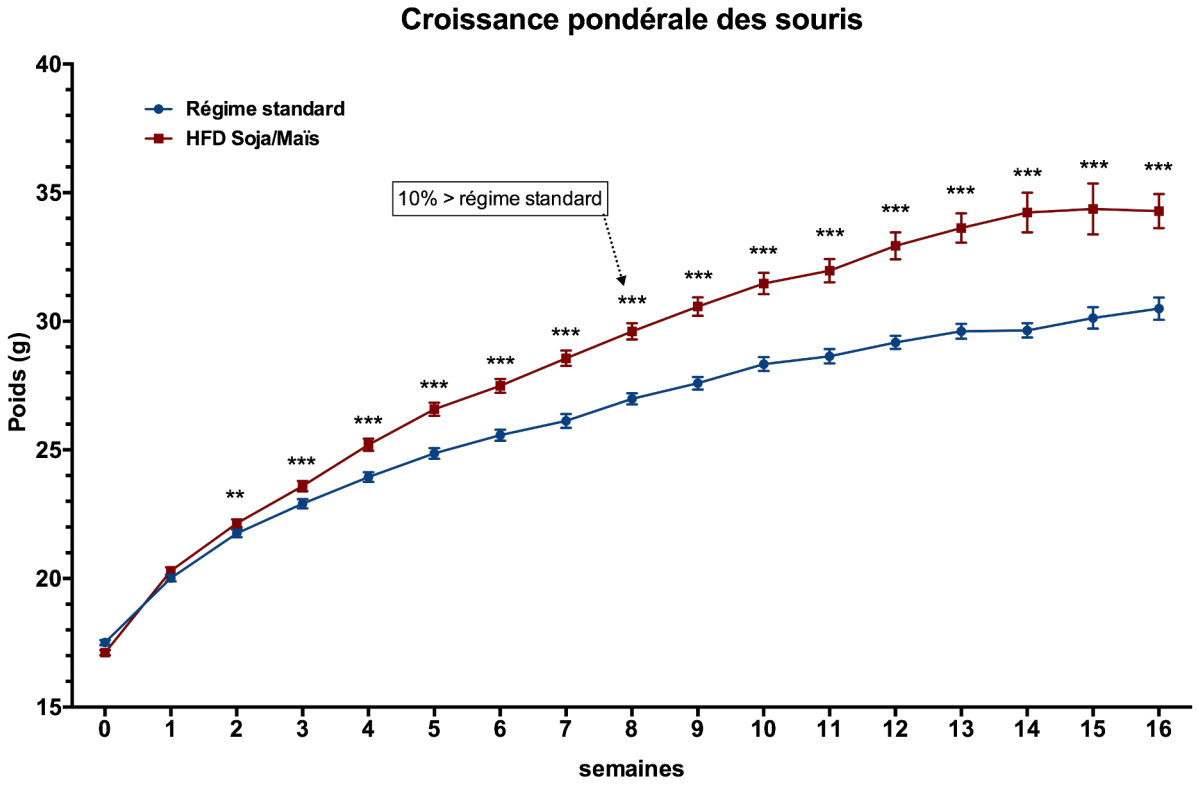


Figure 19. Croissance pondérale des souris sous régime HFD Soja/Maïs. Suivi de la prise de poids des souris nourries avec le régime standard ou le HFD Soja/Maïs. Les souris étaient âgées de 4 semaines au début du protocole et étaient pesées tous les 2 jours (3 expériences indépendantes, n=10 par groupe) Les souris HFD Soja/Maïs sont considérées obèses à partir de la 8ème semaine, lorsque leur poids est supérieur à celui des contrôle de plus de 10%. **p<0,01, *** p<0,001, régime standard vs HFD Soja/Maïs. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

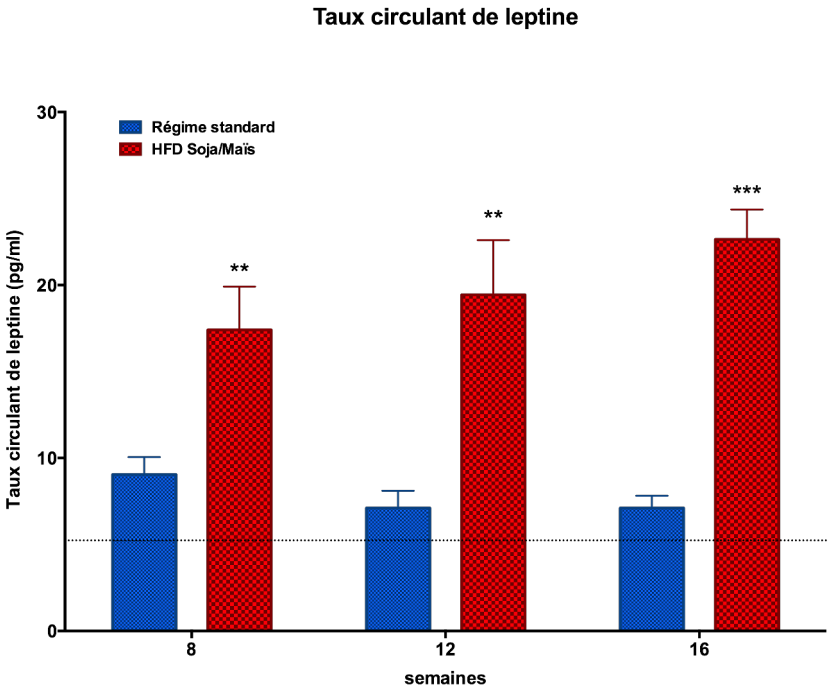


Figure 20. Concentration sérique en leptine des animaux. Dosage de la concentration sérique de la leptine par ELISA chez des souris nourries avec le régime standard ou le HFD Soja/Maïs. (n=10 par groupe). **p<0,01, *** p<0,001, régime standard vs HFD Soja/Maïs. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

- ***Le régime HFD Soja/Maïs induit une inflammation en périphérie et dans l'hypothalamus***

Par ailleurs, pour déterminer si la consommation du régime HFD Soja/Maïs induit aussi une inflammation dans l'hypothalamus, nous avons mesuré, dans l'hypothalamus, l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires canoniques IL-1β, IL-6 et TNF-α et des chimiokines CCL2 et CCL5 dans l'hypothalamus (figures 21 et 22). Dans l'hypothalamus, les taux d'ARNm des gènes codant les cytokines (figure 21) et les chimiokines (figure 22) augmentent significativement à la 8ème semaine chez les souris du groupe HFD Soja/Maïs par rapport aux souris contrôles : par rapport aux souris contrôles, les niveaux d'ARNm des souris HFD Soja/Maïs augmentent d'un facteur 6,2 pour l'IL-1β ($p<0,05$), 3,1 pour l'IL-6 ($p<0,01$) et 3,6 pour le TNF-α ($p<0,05$) (figure 21). Le niveau des ARNm des cytokines pro-inflammatoires diminue à partir de la 12ème semaine de HFD Soja/Maïs et n'est plus significativement différent de celui des animaux contrôles sauf pour l'IL-6 dont l'expression génique est 1,4 fois supérieure aux contrôles ($p<0,05$) (figure 21). On observe des résultats similaires concernant l'expression génique des chimiokines dans l'hypothalamus. A la 8ème semaine de régime HFD Soja/Maïs, l'expression génique de CCL2 est augmentée d'un facteur 5,2 ($p<0,01$) et celle de CCL5 d'un facteur 1,8 ($p<0,01$) par rapport aux souris contrôles (figure 22). Là encore, l'expression génique des chimiokines tend à diminuer à partir de la 12ème semaine mais reste significativement différente : l'expression génique de

CCL2 chez les souris du groupe HFD Soja/Maïs est 2,7 supérieure à celles des contrôles ($p<0,05$) et celle de CCL5 l'est d'un facteur 1,8 ($p<0,05$) (figure 22). Ceci démontre que la consommation du régime HFD Soja/Maïs entraîne effectivement une inflammation hypothalamique avec production locale de médiateurs pro-inflammatoires.

Pour déterminer si l'obésité induite par le régime HFD Soja/Maïs récapitule aussi les « symptômes » inflammatoires connus de l'obésité en périphérie, nous avons mesuré l'expression protéique de la cytokine pro-inflammatoire canonique IL-6 et des chimiokines CCL2 et CCL5, connues pour être augmentées en périphérie dans l'obésité (Gregor and Hotamisligil, 2011; Wu et al., 2007). Nous avons trouvé que la concentration sérique de ces médiateurs inflammatoires augmente significativement dans le groupe HFD Soja/Maïs à partir de la 12ème semaine pour l'IL-6 et CCL5 où elle est augmentée par rapport au groupe contrôle, d'un facteur 5 ($p<0,01$) et d'un facteur 1,4 ($p<0,05$) respectivement (figures 21 et 22). A la 16ème semaine, l'expression de ces médiateurs inflammatoires, dans le sérum des souris HDF Soja/Maïs continue d'augmenter par rapport au groupe contrôle : 30,2 ± 13,5 pg/ml contre 4,1 ± 0,6 pg/ml pour l'IL-6 (ns), 186,7 ± 17,3 pg/ml contre 43,8 ± 8,0 pg/ml pour CCL5 ($p<0,001$) et 142,2 ± 20,1 pg/ml contre 29,2 ± 2,4 pg/ml ($p<0,001$) (figures 21 et 22) . Ainsi, la consommation du régime HFD Soja/Maïs récapitule aussi l'inflammation périphérique observée dans l'obésité.

De manière intéressante, l'inflammation hypothalamique précède effectivement celle en périphérie puisque l'expression des ARNm des cytokines et chimiokines dans l'hypothalamus augmente dès la 8ème semaine, contre la 12ème pour l'augmentation de la concentration sérique des mêmes médiateurs. Par ailleurs, il semble que l'inflammation hypothalamique soit transitoire, au contraire de celle périphérique qui semble être chronique, jusqu'au moins la 16ème semaine de régime.

2.3.2. La consommation du régime HFD Soja/Maïs modifie l'expression de neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

Au-delà d'augmenter l'expression génique des médiateurs pro-inflammatoires dans l'hypothalamus, la consommation du régime HFD Soja/Maïs modifie aussi l'expression des peptides de l'ARC et du LHA.

Concernant les peptides anorexigènes de l'ARC, l'expression de POMC augmente significativement dans le groupe HFD Soja/Maïs à partir de la 8ème semaine et continue d'augmenter à la 12ème semaine : par rapport aux souris contrôles, elle est augmentée d'un facteur 1,6 ($p<0,05$) et d'un facteur 6,3 ($p<0,05$) aux semaines 8 et 12 respectivement (figure

23). Cette augmentation disparaît à la 16ème semaine. L'expression du peptide CART suit la même tendance, mais de manière non significative (figure 23). Concernant les peptides orexigènes de l'ARC, l'expression génique de l'AgRP a un profil similaire à celui du CART (figure 23) et les niveaux d'ARNm du NPY sont eux augmentés dès la 8ème semaine et jusqu'à la 12ème semaine : par rapport aux niveaux du groupe contrôle, ils sont augmentés d'un facteur 2,0 ($p<0,05$) et d'un facteur 2,1 ($p<0,05$) aux semaines 8 et 12, respectivement.

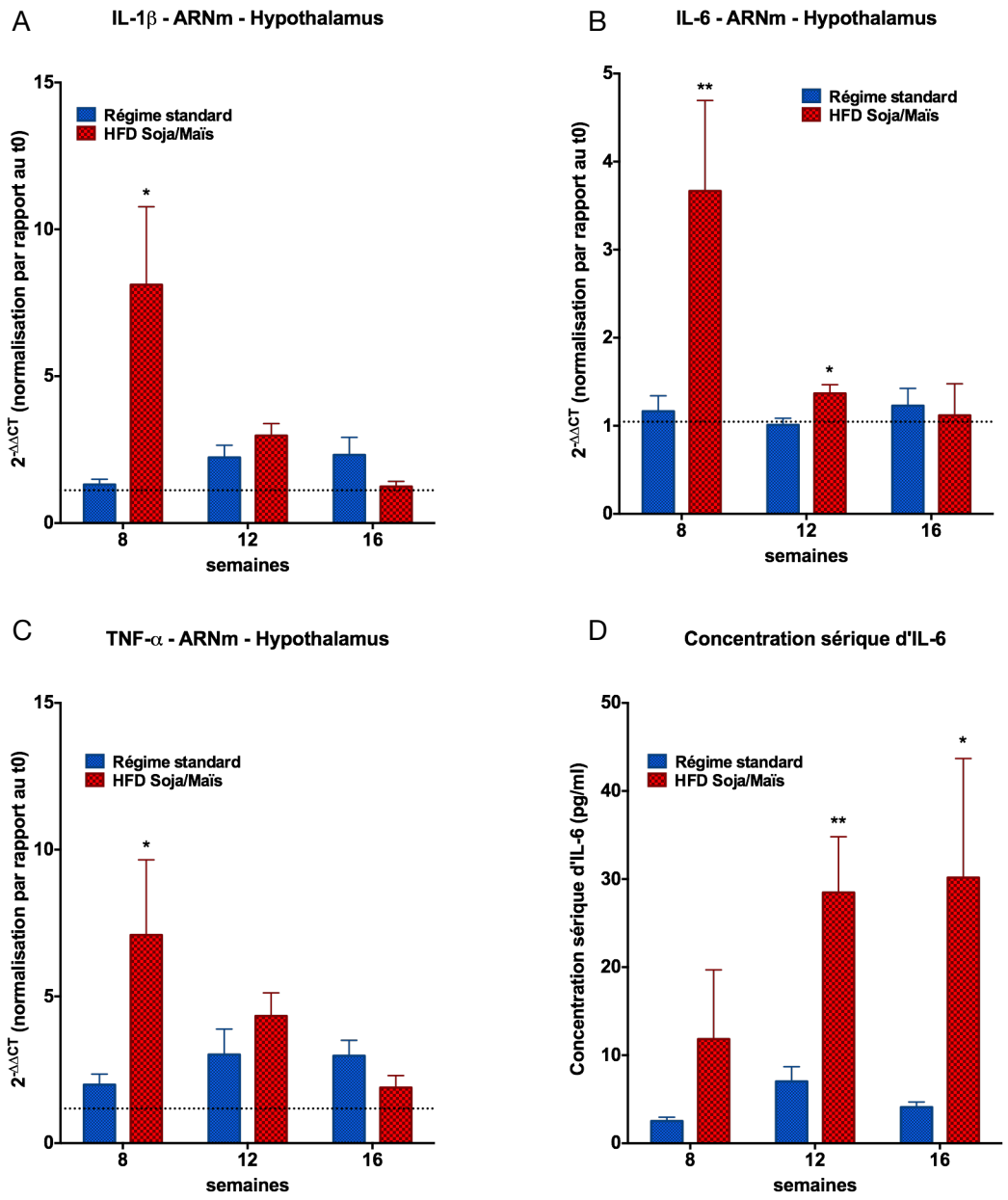


Figure 21. Expression génique dans l'hypothalamus et concentration sérique de cytokines pro-inflammatoires.
A-C Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les cytokines pro-inflammatoires IL-1β (A) IL-6 (B) et TNF-α (C) dans l'hypothalamus de souris nourries avec le régime standard ou le HFD Soja/Maïs. Les valeurs sont normalisées par rapport la condition à t0 (n=10 par groupe).
D Dosage de la concentration sérique de l'IL-6 par FACS Array chez des souris nourries avec le régime standard ou le HFD Soja/Maïs. (n=10 par groupe).
*p<0.05, **p<0,01, régime standard vs HFD Soja/Maïs. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

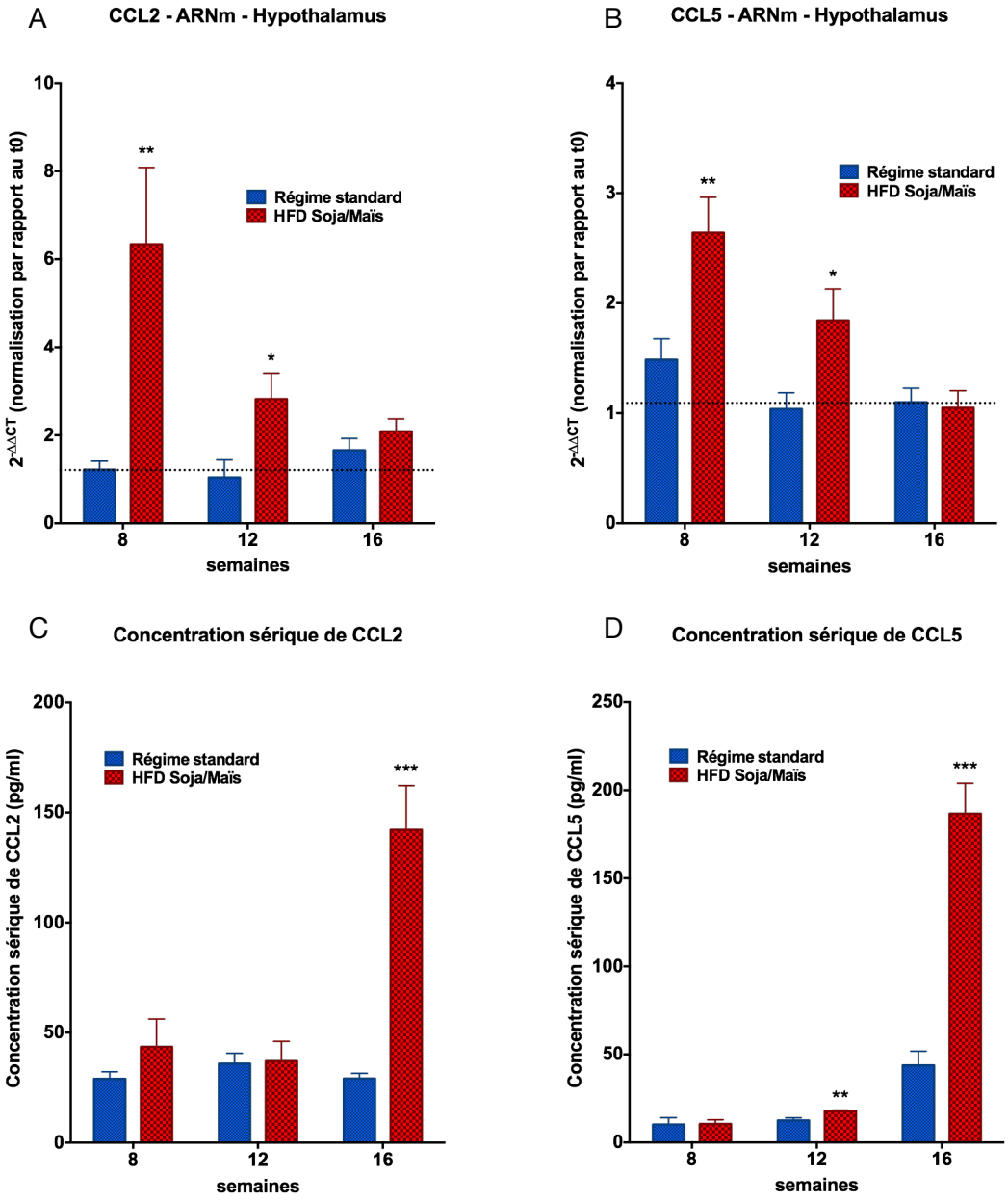


Figure 22. Expression génique dans l'hypothalamus et concentration sérique de chimiokines.
A-B Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les chimiokines CCL2 (A) et CCL5 (B) dans l'hypothalamus de souris nourries avec le régime standard ou le HFD Soja/Maïs. Les valeurs sont normalisées par rapport la condition à t0 (3 expériences indépendantes, n=10 par groupe).
C-D Dosage de la concentration sérique de CCL2 (C) et CCL5 (D) par FACS Array chez des souris nourries avec le régime standard ou le HFD Soja/Maïs. (n=10 par groupe).
*p<0.05, **p<0,01, *** p<0,001, régime standard vs HFD Soja/Maïs. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

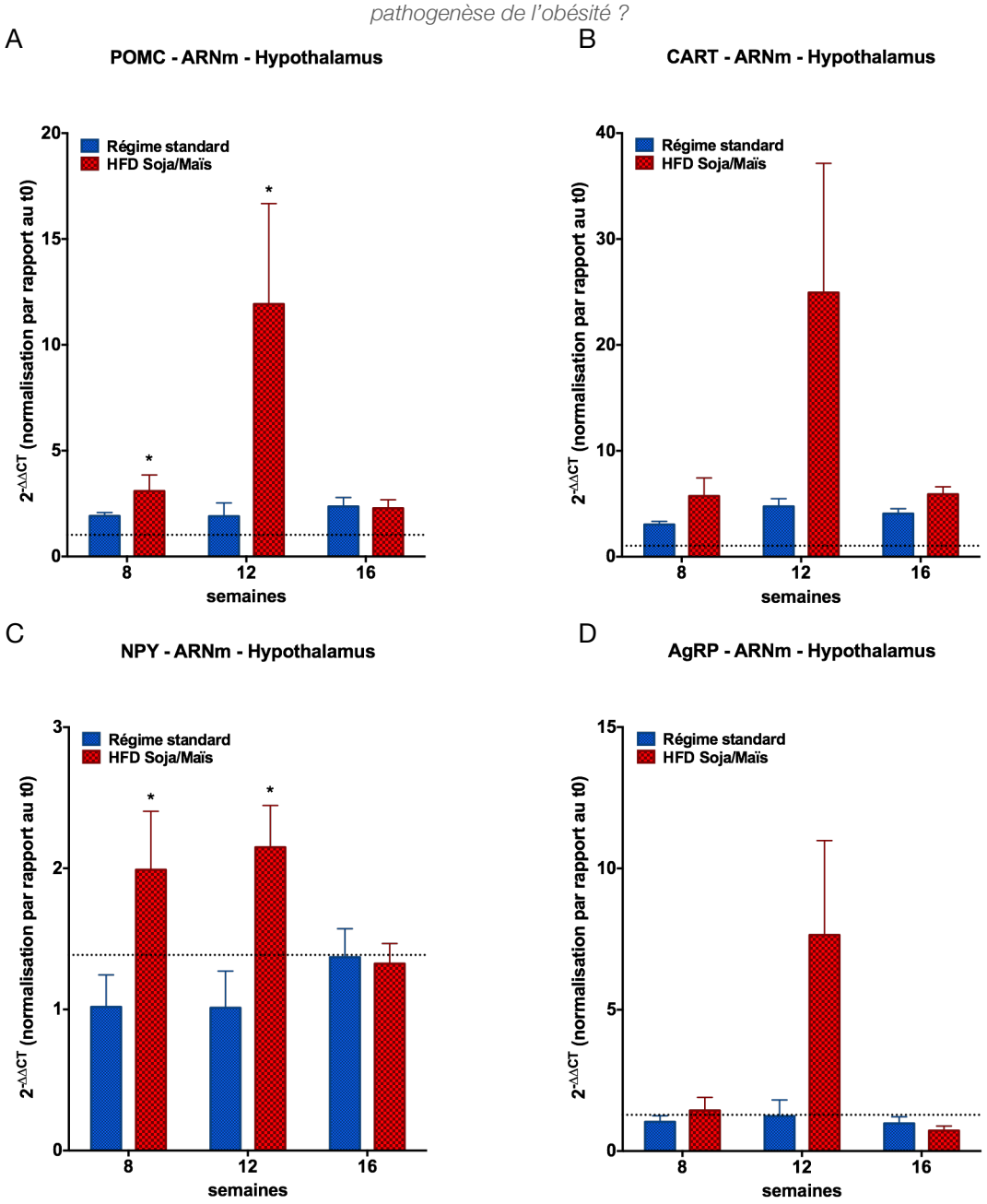


Figure 23. Expression génique des peptides de l'ARC : POMC, CART, NPY et AgRP.
A-B Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les peptides anorexigènes de l'ARC, POMC (A) et CART (B) dans l'hypothalamus de souris nourries avec le régime standard ou le HFD Soja/Maïs.
C-D Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les peptides orexigènes de l'ARC, NPY (C) et AgRP (D) dans l'hypothalamus de souris nourries avec le régime standard ou le HFD Soja/Maïs.
Les valeurs sont normalisées par rapport la condition à t0 (n=10 par groupe). *p<0.05, régime standard vs HFD Soja/Maïs. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

Concernant l'expression des peptides orexigènes du LHA, l'expression génique de l'OX suit une tendance similaire à celle observée pour la POMC : elle est le plus augmentée par la consommation du régime HFD Soja/Maïs à la 12ème semaine où elle est multipliée par 1,8 par rapport au groupe contrôle ($p<0,05$) (figure 24). Pour ce qui est de la MCH, son expression génique est significativement augmentée dès la 8ème semaine dans le groupe HFD Soja/Maïs par rapport au groupe contrôle et l'est toujours à la 16ème semaine. En effet,

par rapport au groupe contrôle elle est augmentée dans le groupe HFD d'un facteur 1,5 ($p<0,05$), 1,9 ($p<0,05$) et 2,0 ($p<0,001$) aux semaines 8, 12 et 16, respectivement (figure 24). Il apparaît donc que la consommation d'un régime hyperlipidique tel que le HFD Soja/Maïs affecte les systèmes neuropeptidergiques de l'hypothalamus, au moins de l'ARC et du LHA. L'augmentation de l'expression des peptides anorexigènes peut témoigner d'une tentative de l'organisme de compenser. Fait intéressant, l'expression de la MCH a un profil d'activation singulier par rapport aux autres peptides : son expression génique est augmentée dès la 8ème semaine et l'est toujours après au moins 16 semaines de régime HFD Soja/Maïs. Le système MCH est-il le plus affecté dans ce modèle d'obésité nutritionnelle ? Ces effets de la consommation d'un HFD sur ces neurones est-elle liée à l'inflammation ?

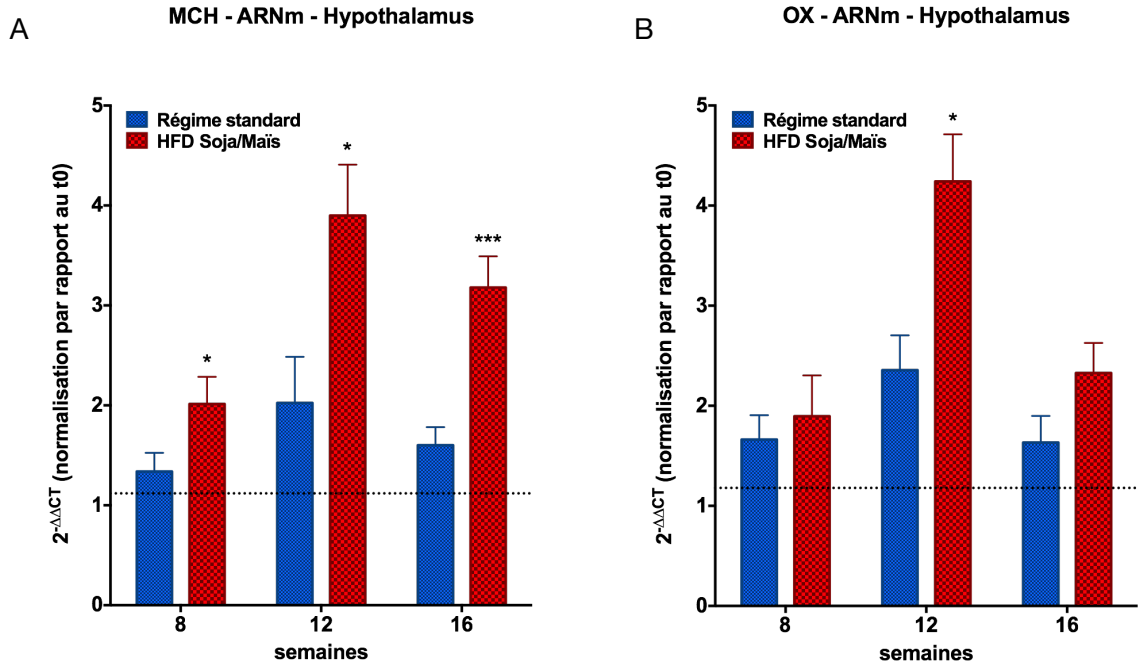


Figure 24. Expression génique des peptides du LHA : MCH et OX.
A-B Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les peptides du LHA, MCH (A) et OX (B) dans l'hypothalamus de souris nourries avec le régime standard ou le HFD Soja/Maïs. Les valeurs sont normalisées par rapport la condition à t0 (n=10 par groupe). *p<0.05, ***p<0,001, régime standard vs HFD Soja/Maïs. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

2.3.3. Lien entre la chimiokine CCL5, le comportement alimentaire et le poids corporel

Comme mentionné auparavant, notre objectif était d'identifier une ou plusieurs chimiokines pouvant influencer l'activité des neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation du CA et du poids corporel, pouvant participer au développement et/ou au maintien du phénotype obèse. Nous nous sommes focalisés pour la suite de nos travaux sur la chimiokine CCL5 qui a été montrée comme augmentée en périphérie dans un contexte d'obésité, et dont l'expression génique dans l'hypothalamus est augmentée dans notre modèle.

D'autres arguments ont justifié notre intérêt pour CCL5.

- ***La chimiokine CCL5 est augmentée dans le sérum de patients obèses***

En collaboration avec le laboratoire du Dr Karine Clément (Equipe Nutriomics, Institut de Cardiométabolisme et Nutrition ICAN, INSERM UMRS U1166, Paris), notre laboratoire a montré en 2011 (Dalmas et al., 2011) que la concentration sérique de CCL5 est multipliée dans le sérum de patients obèses par un facteur 8 par rapport aux patients contrôles et que 3 mois après chirurgie bariatrique (« bypass » gastrique de type Roux-en-Y), quand la prise calorique et donc le poids diminuent, la concentration sérique de CCL5 diminue (figure 25). Fait notable, parmi tous les médiateurs inflammatoires mesurés, seule CCL5 évoluait proportionnellement à la prise calorique.

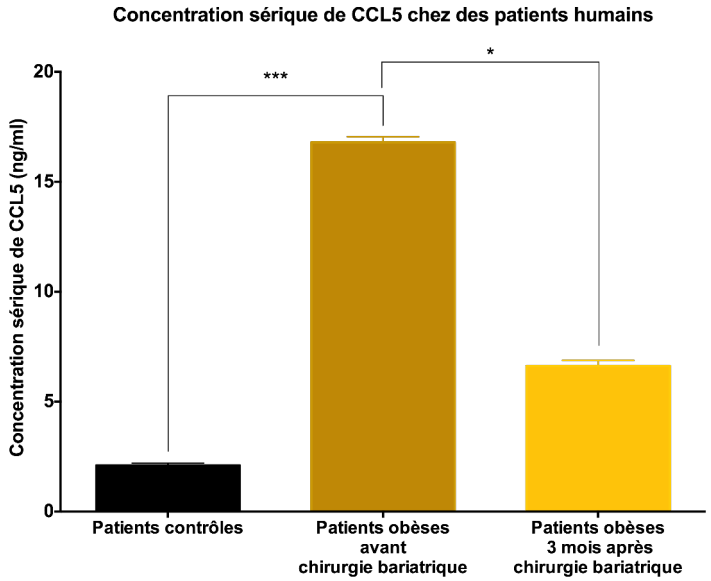


Figure 25. Evolution de la concentration sérique de CCL5 chez des sujets humains obèses avant et après chirurgie bariatrique (d'après Dalmas et al., 2011). La concentration sérique de la chimiokine CCL5 a été dosée par FACS Array chez des patients avant et après chirurgie bariatrique (by-pass gastrique type Roux-en-Y). (n=14 pour le groupe contrôle et n=48 pour le groupe obèse). *p<0,05, ***p<0,001. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

2.3.4. L'injection de la chimiokine CCL5 induit une prise de poids chez la souris

- ***L'injection de CCL5 induit une prise de poids chez la souris***

Une injection IP aiguë de CCL5 (2 µg) entraîne effectivement un gain de poids chez les souris par rapport aux souris contrôles injectées avec une solution saline (NaCl 0,9%). Cette augmentation est significative 72h après injection (gain de 0,6 ± 0,08 g contre gain de 0,2 ± 0,04 g ; p<0,05) (figure 26).

Nous avons voulu tester ensuite si l'effet de CCL5 sur le gain de poids pouvait être central, pour cela, nous avons injecté de manière aiguë, CCL5 (500 ng) en ICV et nous avons observé de nouveau une augmentation du poids après injection significative par rapport au

groupe contrôle (figure 27). Le poids des souris injectées CCL5 en ICV est significativement supérieur à celui des contrôles dès 24h (contre 72h en IP) : +1,8 ± 0,1 g contre +1,1 ± 0,0 g après 24h, +1,8 ± 0,1 g contre 1,1 ± 0,1 g après 48h et 1,5 ± 0,0 g contre 1,1 ± 0,1 g après 72h ($p<0,05$ pour les 3 temps) (figure 27).

Ces résultats suggèrent que l'injection de CCL5 induit une prise de poids, et que cette action de CCL5 est probablement centrale puisqu'elle est plus rapide et plus forte lors d'une injection ICV.

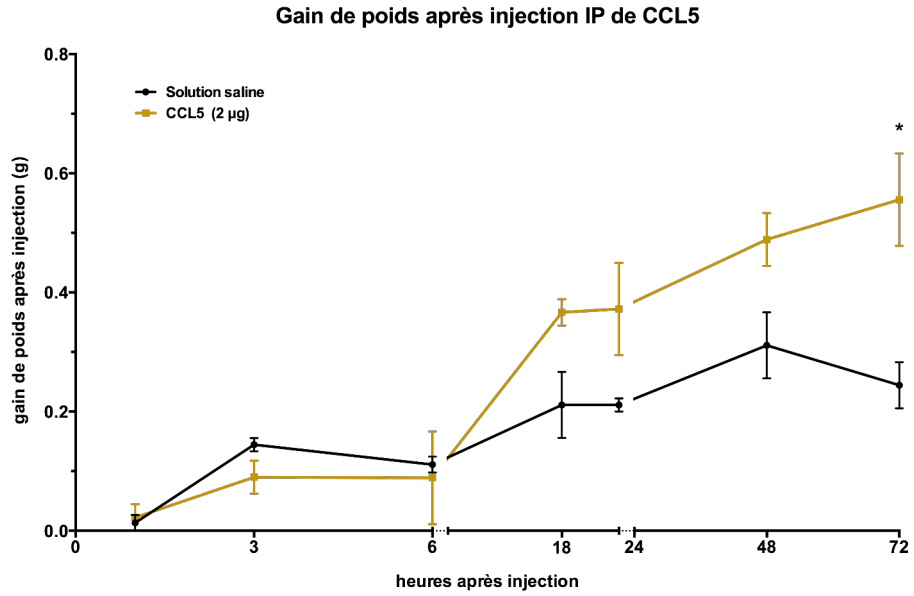


Figure 26. Gain de poids des souris après injection IP de CCL5. Variation de poids des souris après injection IP de CCL5 (2 µg) ou du véhicule seul au cours du temps (n=6 par groupe). *p<0,05, injection de CCL5 vs injection de véhicule (solution saline). Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

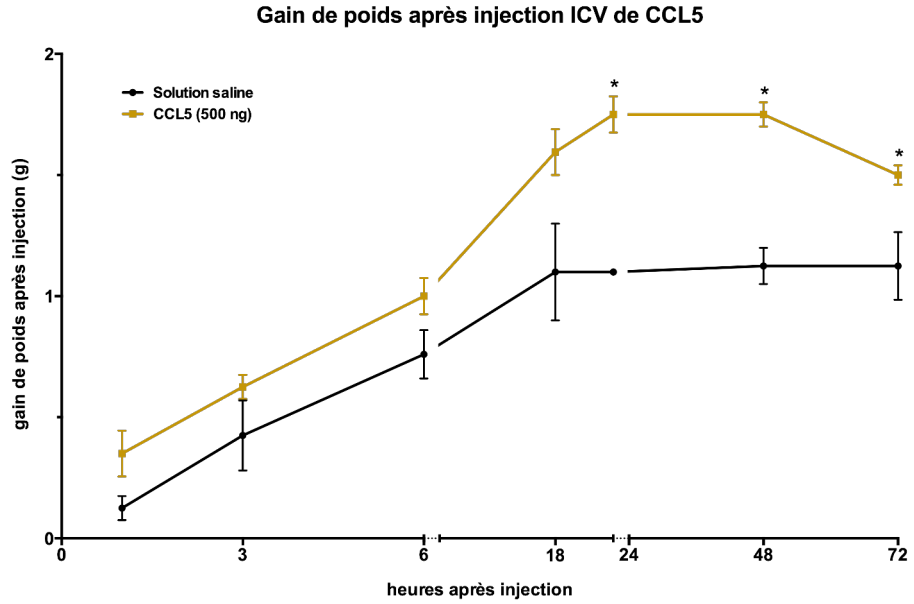


Figure 27. Gain de poids des souris après injection ICV de CCL5. Variation de poids des souris après injection ICV de CCL5 (500ng) ou du véhicule seul au cours du temps (n=6 par groupe). *p<0,05, injection de CCL5 vs injection de véhicule (solution saline). Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

2.3.5. L'injection de la chimiokine CCL5 induit l'augmentation de l'expression des peptides orexigènes du LHA : MCH et OX

L'injection IP de CCL5 induit une augmentation significative de l'expression des peptides orexigènes MCH et OX, au niveau génique et protéique. Il est intéressant de noter que cette augmentation d'expression est plus précoce pour la MCH (dès 6h suivant l'injection) que pour l'OX (figure 28), et semble persister dans le temps (au moins jusqu'à 24h après injection).

L'injection ICV de CCL5 induit elle-aussi une augmentation significative de l'expression génique et protéique de la MCH et de l'OX, et ce dès la première heure après injection. Il est intéressant de noter que l'augmentation de l'expression de la MCH semble plus durable dans le temps que celle de l'OX, qui elle, est transitoire (figure 29).

L'injection de CCL5, IP ou ICV, induit donc l'activation des peptides orexigènes du LHA. La cinétique de gain de poids et d'activation de la MCH et de l'OX suggère un rôle plus important du système à MCH dans les effets de CCL5 sur la prise de poids puisque l'augmentation de son expression est plus stable et durable que celle de l'OX.

2.3.6. La chimiokine CCL5 a un effet excitateur sur les neurones à MCH du LHA

- ***La chimiokine CCL5 induit une dépolarisation des neurones à MCH.***

Compte-tenu de nos résultats précédents, nous avons décidé de nous focaliser sur les neurones à MCH en tant que cibles de l'action de CCL5 dans la prise de poids.

Nous avons réalisé ainsi au laboratoire des expériences de patch-clamp sur tranches de cerveau de souris exprimant la CFP sous le contrôle du promoteur de la MCH (selon le même principe que dans l'article « CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity »). Ces expériences réalisées par le Dr Alice Guyon (IPMC, UMR 7275 CNRS-Université Nice Sophia Antipolis) montrent que l'application de CCL5 sur des tranches de cerveau induit une dépolarisation des neurones à MCH du LHA, et ce de manière dose-dépendante (figure 30).

Par ailleurs, l'application conjointe de tétrodotoxine (TTX, bloqueur de décharge de potentiel d'action) et de bloqueurs des deux types de canaux glutamatergiques, CNQX pour les récepteurs AMPA et APV pour les récepteurs NMDA, inhibe la dépolarisation induite par l'application de 1nM de CCL5. Au contraire, l'application conjointe de TTX et de bicuculline, bloqueur des canaux GABA, n'a pas d'effet sur la dépolarisation des neurones à MCH induite par CCL5. Il apparaît donc que les effets de CCL5 sur les neurones à MCH sont médiés par une libération présynaptique de glutamate (figure 31).

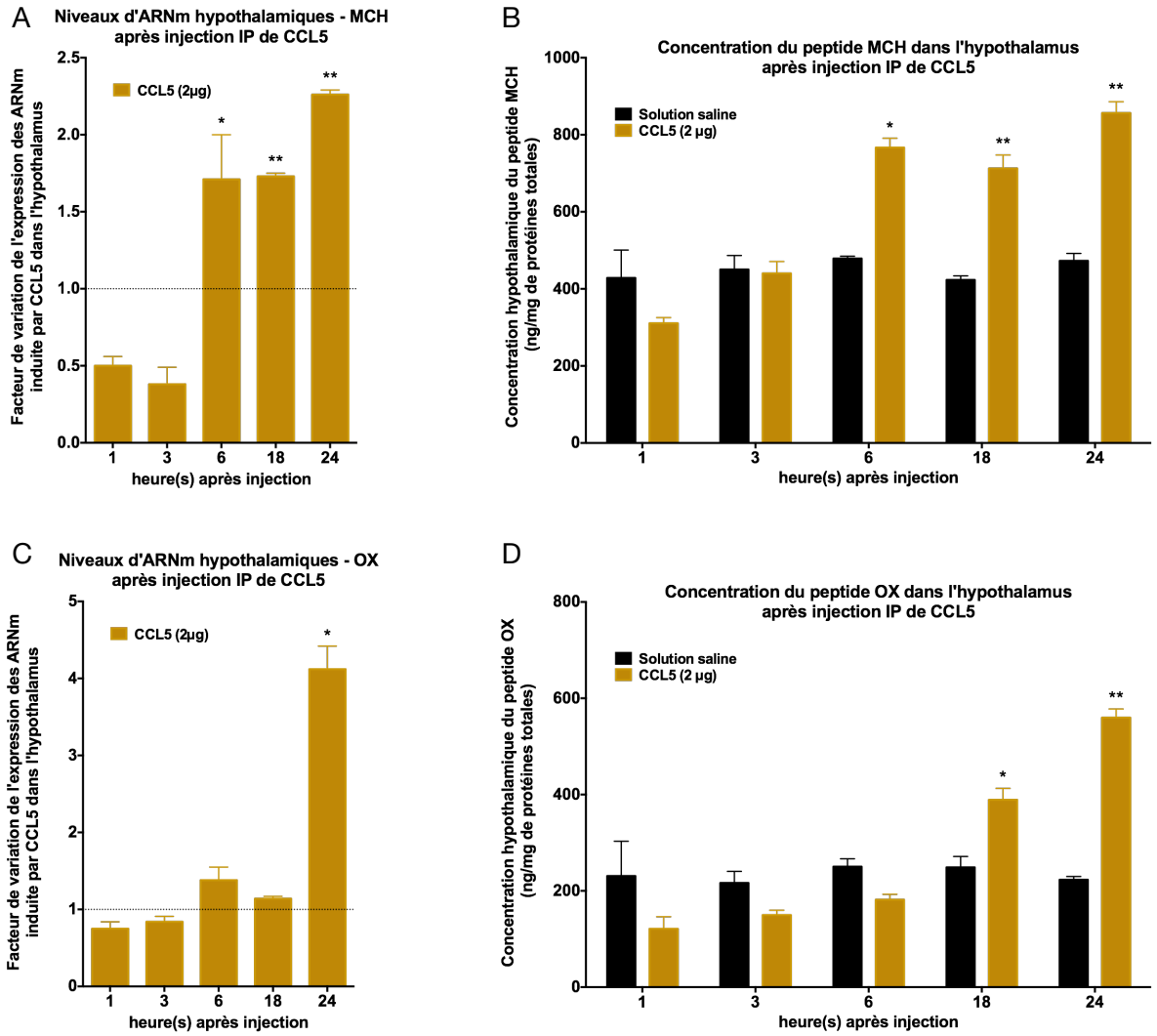


Figure 28. Variation de l'expression génique et protéique des peptides du LHA (MCH et OX) après injection IP de CCL5.
A,C Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les peptides du LHA, MCH (A) et OX (C) dans l'hypothalamus après injection IP de CCL5 (5µg) ou du véhicule seul à différents temps post-injection. Les valeurs des souris injectées CCL5 sont normalisées par rapport la condition à contrôle (solution saline) (n=6 par groupe).
B,D Dosage des peptides MCH (B) et OX (D) dans l'hypothalamus par EIA après injection IP de CCL5 (2 µg) ou du véhicule seul à différents temps post-injection (n=6 par groupe).
*p<0,05, **p<0,01, injection de CCL5 vs injection de véhicule (solution saline). Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

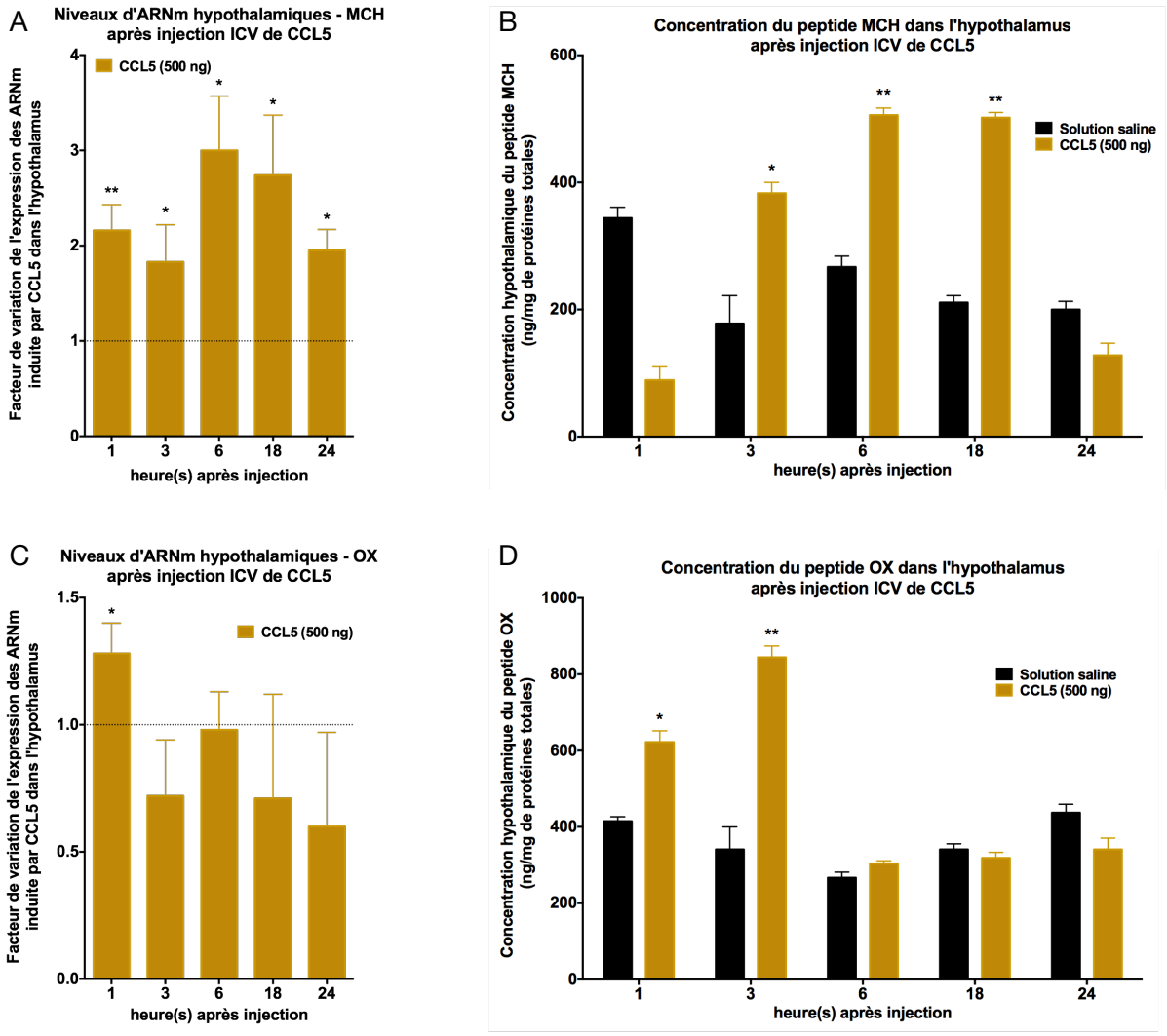


Figure 29. Variation de l'expression génique et protéique des peptides du LHA (MCH et OX) après injection ICV de CCL5.

A,C Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les peptides du LHA, MCH (A) et OX (C) dans l'hypothalamus après injection ICV de CCL5 (500ng) ou du véhicule seul à différents temps post-injection. Les valeurs des souris injectées CCL5 sont normalisées par rapport la condition à contrôle (solution saline) (n=6 par groupe).

B,D Dosage des peptides MCH (B) et OX (D) dans l'hypothalamus par EIA après injection ICV de CCL5 (500ng) ou du véhicule seul à différents temps post-injection (n=6 par groupe).

*p<0,05, **p<0,01, injection de CCL5 vs injection de véhicule (solution saline). Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

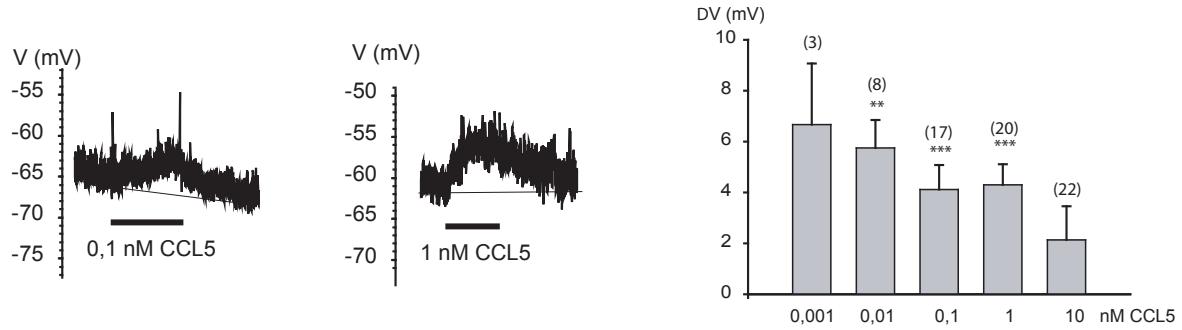


Figure 30. Effet de l'application de CCL5 (1nM) sur l'activité électrique des neurones à MCH du LHA des souris KI MCH-CFP. Enregistrements en current-clamp. Exemples d'enregistrements illustrant la légère dépolarisation induite par CCL5 à diverses concentrations. Histogramme montrant l'amplitude des dépolarisations induites par CCL5 à diverses concentrations.

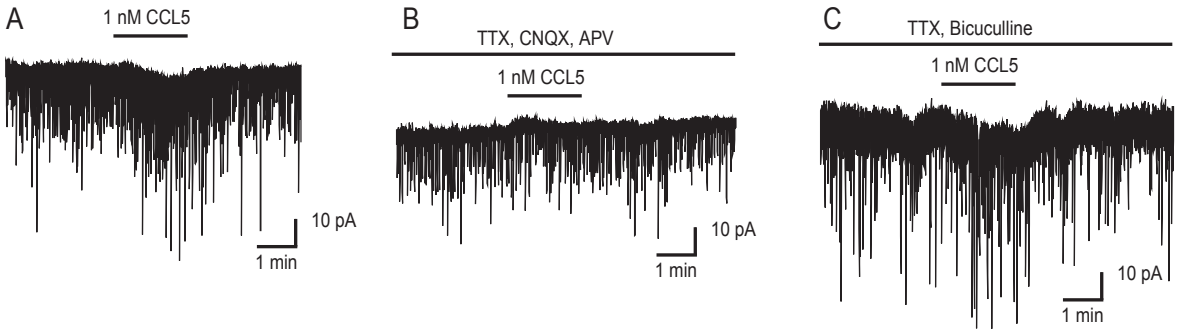


Figure 31. Les effets de CCL5 sur les neurones à MCH sont médiés par la libération présynaptique de glutamate. La dépolarisation du neurone à MCH induite par CCL5 enregistrée dans la condition contrôle (A) est bloquée dans la même cellule par le bloqueur de canaux sodiques TTX (1µM) associé aux antagonistes des récepteurs au glutamate APV (25µM) et CNQX (10µM) (B). L'effet de CCL5 persistait en présence de TTX et de bicuculline (10µM), antagoniste du récepteur GABA-A (C).

- ***La chimiokine CCL5 induit la libération de glutamate par les cellules gliales et les neurones***

Nous avons alors voulu déterminer par quelles cellules était libéré le glutamate impliqué dans la dépolarisation des neurones à MCH. Pour cela, nous avons réalisé une expérience de libération de glutamate par des synaptosomes et gliosomes purifiés d'hypothalamus de souris par gradient de Percoll en collaboration avec le groupe du Dr Anna Pittaluga (Département de Pharmacie, Section de Pharmacologie et Toxicologie, Université de Gênes).

Ces expériences ont montré que CCL5 induit effectivement la libération de glutamate, et ce à la fois par les cellules gliales et les neurones. Il apparaît que cette libération de glutamate est majoritairement réalisée par les cellules gliales (42% de la libération de glutamate réalisée par les gliosomes contre 15% par les synaptosomes) (figure 32).

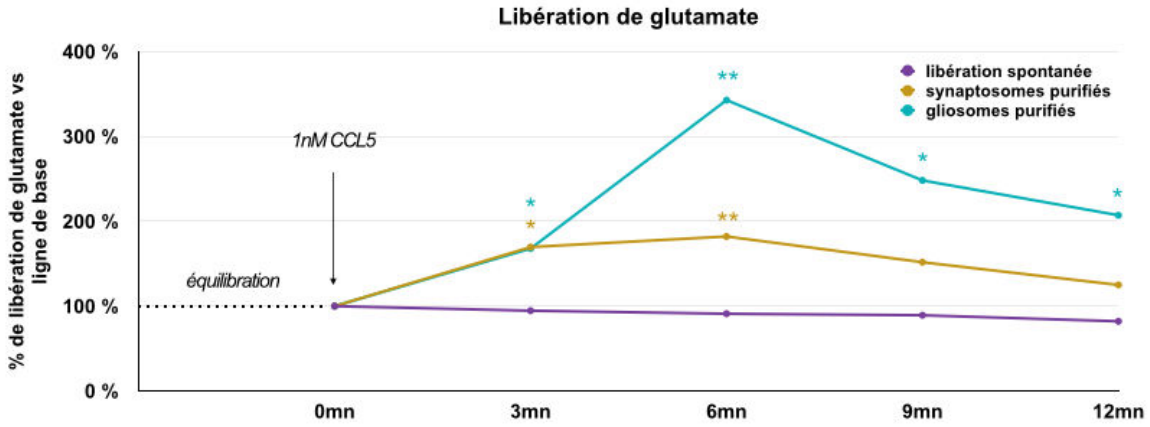


Figure 32. Effet de CCL5 sur la libération de glutamate par les cellules gliales et les neurones purifiés d'hypothalamus. La chimiokine CCL5 (1nM) est capable d'augmenter la libération de glutamate par les synaptosomes (neurones) et par les gliosomes (cellules gliales).

2.4. Conclusion et Discussion

Nos résultats préliminaires suggèrent que la chimiokine CCL5 est capable d'induire une prise de poids. Les effets de la chimiokine sont plus précoces et soutenus lorsqu'elle est injectée centralement, suggérant un effet central de la CCL5. Nous avons aussi déterminé que CCL5 peut activer les neurones du LHA produisant la MCH. Ces actions sur ces neurones pourraient expliquer, du moins partiellement, la prise de poids induite par l'injection de la chimiokine. Il semble que les effets de CCL5 sur les neurones à MCH sont directs et/ou médiés par les cellules gliales, en affectant la libération présynaptique de glutamate. Or, les interactions entre CCL5 et la libération de glutamate ont déjà été décrits (Di Prisco et al., 2012). Si les 3 récepteurs de CCL5, CCR1, CCR3 et CCR5 ont été décrits comme exprimés dans le LHA (BrainStars database (Kasukawa et al., 2011)), les cellules précises les exprimant n'ont pas été déterminées, il serait donc intéressant, voire indispensable de déterminer, par des expériences d'immunohistochimie, quel(s) récepteur(s) de CCL5 sont exprimés sur les différents types cellulaires, afin de mieux distinguer quelles sont les cibles potentielles de CCL5 dans le LHA. Il serait aussi intéressant d'une part de déterminer quel(s) récepteur(s) de CCL5 est/sont impliqués dans les effets de la chimiokine sur la prise de poids et d'autre part, de réitérer ces protocoles d'injection chez des souris déficientes pour chacun des récepteurs ou encore d'utiliser des antagonistes spécifiques de chacun des récepteurs pour tenter de déterminer la participation de chacun.

Par ailleurs, notre quête d'une chimiokine pouvant induire la prise de poids par action sur les réseaux neuropeptidergiques de l'hypothalamus régulant le CA et le poids corporel se justifiait dans la perspective d'identifier un acteur de la pathogenèse de l'obésité. Dans ce contexte, à court-terme, il serait intéressant de déterminer l'effet d'une injection centrale chronique, et non plus aiguë, de CCL5, sur la prise alimentaire et la prise de poids sous

régime standard ou HFD. Par ailleurs, il serait de même intéressant de déterminer si l'injection chronique d'antagonistes des récepteurs de CCL5 empêcherait la prise de poids induite par un HFD. Après détermination des cibles cellulaires potentielles de CCL5 dans le cerveau et notamment dans l'hypothalamus, il serait intéressant, de vérifier l'implication éventuelle de CCL5 dans la mise en place et/ou le développement de l'obésité en utilisant une souris où la signalisation CCL5 serait inhibée conditionnellement et spécifiquement en fonction des récepteurs et des cibles cellulaires, dans un modèle de consommation de HFD. De plus, pour déterminer la proportion de participation, à l'effet de CCL5, des différentes populations neuronales de l'hypothalamus impliquées dans la régulation du CA et du poids, il serait intéressant d'utiliser des souris où les populations neuronales pourraient être éliminées conditionnellement, en utilisant par exemple un système de type DTR (« dyphteria toxin receptor »).

3. La nature des lipides influence-t-elle le développement de l'obésité ?

3.1. Introduction

Comme évoqué précédemment (Introduction, section 3.2.2, paragraphe « Inflammation hypothalamique et obésité »), les AGS, notamment ceux à longue chaîne, sont suggérés comme un déclencheur naturel de l'inflammation métabolique dans l'hypothalamus. Certaines espèces d'acides gras saturés à longue chaîne ont été décrits comme s'accumulant dans l'hypothalamus en réponse à la consommation d'un HFD, probablement car qu'ils sont moins facilement oxydés que les acides gras insaturés (AGI). Cette accumulation serait un déclencheur de l'inflammation hypothalamique, ainsi que de la résistance à l'insuline et à la leptine (Posey et al., 2009). Les AGS peuvent donc agir localement dans le cerveau et stimuler l'inflammation hypothalamique : les injections ICV d'acide stéarique augmente l'expression de cytokines inflammatoires (dont IL-1β, IL-6 et TNF-α) et active les voies JNK et NF-κB dans l'hypothalamus (Calegari et al., 2011). Par ailleurs, il apparaît que l'excès des acides gras saturés est plus obésogène que l'excès d'autres lipides (DeLany et al., 2000). L'impact négatif de l'excès d'AGS sur le maintien de la balance énergétique et du poids semble corrélé avec l'intensification de l'inflammation dans l'hypothalamus. Il est intéressant de noter que les AGS apparaissent comme des inducteurs spécifiques de l'inflammation dans l'hypothalamus : l'inflammation observée dans le MBH après la consommation d'un régime riche en AGS est reproduite avec l'administration par gavage d'AGS au contraire des AG mono-insaturés (AGMI) et AG poly-insaturés (AGPI) ou même des AGS à courte chaîne (Valdearcos et al., 2014). De plus, l'infusion ICV d'AGS peut spécifiquement induire une inflammation hypothalamique (Kleinridders et al., 2009; Milanski et al., 2009; Zhang et al., 2008c). L'inflammation induite par l'administration centrale d'AGS promeut les défauts de signalisation de l'insuline et de la leptine, induit une augmentation de poids et perturbe d'autres paramètres métaboliques (Zhang et al., 2008c). Il a été décrit que la consommation d'un HFD entraîne l'accumulation de lipides issus de la nutrition dans l'hypothalamus de souris. De plus, les profils en AG dans l'hypothalamus reflèteraient assez bien les profils des AG ingérés quand ils sont consommés en excès., ce qui n'est pas le cas pour d'autres régions cérébrales. Ceci souligne la capacité particulière de l'hypothalamus à détecter les changements dans les graisses consommées (Borg et al., 2012). Il serait donc intéressant d'identifier les lipides pouvant déclencher ou moduler l'inflammation métabolique dans l'hypothalamus, par

exemple, cela pourrait-il être le cas des diacylglycérols et des céramides, qui ont été montrés comme pouvant perturber la signalisation de l'insuline en périphérie.

Dans ce contexte, il nous a semblé opportun d'étudier les effets de la substitution de certains lipides, en particulier les AGS. En effet, leur consommation a été reconnue comme plutôt néfaste et délétère notamment en induisant une inflammation dans l'hypothalamus, quand ils seraient ingérés en trop grande quantité, par liaison au TLR4 dont la voie de signalisation serait alors activée. L'activation de la voie TLR4 induit un stress du réticulum endoplasmique, la surexpression de cytokines pro-inflammatoires et enfin, l'apoptose neuronale, le tout contribuant au développement à la résistance à l'insuline et la leptine, et à une expression anormale des neurotransmetteurs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Milanski et al., 2009; Moraes et al., 2009).

L'intérêt de limiter l'inflammation hypothalamique a été montrée à plusieurs reprises (en ciblant génétiquement ou pharmacologiquement diverses protéines impliquées dans la réponse inflammatoire) comme aidant à réduire le dysfonctionnement hypothalamique, à corriger la résistance aux hormones insuline et leptine, et à diminuer le poids corporel (Araujo et al., 2007; De Souza et al., 2005; Howard et al., 2004; Milanski et al., 2009; Zhang et al., 2008a). Bien que ces résultats soient prometteurs pour traiter l'obésité, la pléiotropie des protéines ciblées dans ces études est bien connue et la zone à cibler est une région bien précise du cerveau, rendant plus compliqué et plus incertain la possibilité d'utiliser des molécules pharmacologiques ciblant ces acteurs de l'inflammation. Ainsi, réduire de manière générale et alternative le niveau d'inflammation paraît une approche intéressante, voire indispensable. Or, dans d'autres tissus, il a été montré que les AGI dans leur ensemble ont des effets anti-inflammatoires, incluant l'inhibition des voies de la lipoxygénase et de la cycloxygénase, la diminution de l'adhésion des neutrophiles, la réduction de l'expression de cytokines et l'inhibition de la signalisation du TLR4 (Endres et al., 1989; Lee et al., 1985; Reynolds et al., 2009), notamment en se liant aux récepteurs orphelins GPR40 et surtout GPR120.

Comme nous le mentionnions plus haut, les approches nutritionnelles sont à la base de la quasi totalité des protocoles prophylactiques et thérapeutiques employés dans la lutte contre l'obésité. Ainsi, même si la quantité de lipides ingérés resterait la même, il pourrait y avoir un intérêt thérapeutique à améliorer la qualité des lipides ingérés en augmentant notamment la quantité en acides gras polyinsaturés.

Il existe plusieurs catégories d'AGI: mono- et polyinsaturés.

- **Acides gras monoinsaturés (AGMI):** ils ne comprennent qu'une seule double liaison carbone-carbone dans leur chaîne carbonée. Ils peuvent être soit des oméga-7, soit des

oméga-9. Parmi les acides gras monoinsaturés les plus communs, on peut citer l'oméga-7 acide palmitoléique (C16:1 ω-7) et l'oméga-9 acide oléique (C-18:1 ω-9).

NB. La nomenclature « oméga » indique le nombre de carbones et d'insaturations de l'acide gras en question. Pour un acide gras Cx:y ω-z, Cx indique le nombre d'atomes de carbone, y indique le nombre d'insaturations et ω-z indique la position de la 1^{ére} insaturation à partir de l'extrémité méthyle. On notera que les insaturations apparaissent en général tous les 3 atomes de carbone.

- **Acides gras polyinsaturés (AGPI) :** ils comprennent plusieurs doubles liaisons carbone-carbone dans leur chaîne carbonée. Ils peuvent être soit des oméga-6, soit des oméga-3. Au contraire des acides gras monoinsaturés, ils ne peuvent pas être synthétisés *de novo* par l'organisme : l'ingestion de leurs précurseurs respectifs est nécessaire. On qualifie ces acides gras d'essentiels. Concernant les oméga-3, seul l'acide alpha-linolénique (ALA ; « alpha-linolenic acid » ; C18:3 ω-3) est essentiel puisque les autres peuvent être synthétisés par l'organisme à partir de celui-ci : l'acide eicosapentaénoïque (EPA ; « eicosapentaenoic acid » ; C20:5 ω-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA ; « docosahexaenoic acid » ; C22:6 ω-3). Concernant les oméga-6, seul l'acide linoléique (LA ; « linoleic acid ») est essentiel, afin de pouvoir procéder à la synthèse des autres oméga-6 : l'acide gamma-linolénique, l'acide dihomo-gamma-linolénique et l'acide arachidonique (AA). Ce sont surtout les oméga-3 qui ont été montrés comme ayant des propriétés anti-inflammatoires. En effet, les oméga-6, consommés en excès, pourraient contrecarrer les effets bénéfiques anti-inflammatoires des oméga-3. Concernant les oméga-3 et -6, le ratio est très important. En effet, ces deux types d'acides gras partagent les mêmes enzymes de synthèse, et peuvent donc entrer en compétition (figure 33). En toute logique, il faut donc consommer plus d'oméga-3 que d'oméga-6. Un ratio LA/ALA inférieur à 5 a été recommandé par l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitairede l'alimentation, de l'environnement et du travail), ainsi qu'un apport en EPA et DHA de 250 mg pour chacun afin de garantir la totalité des besoins de l'organisme en DHA.

Des études ont pu montré qu'une substitution partielle des AGS délétères par des AGI (oméga-3 ou oméga-9) est capable d'améliorer la fonction hypothalamique, d'améliorer la sensibilité à l'insuline et à la leptine, de réduire la prise de poids… (Cintra et al., 2012; Oliveira et al., 2015).

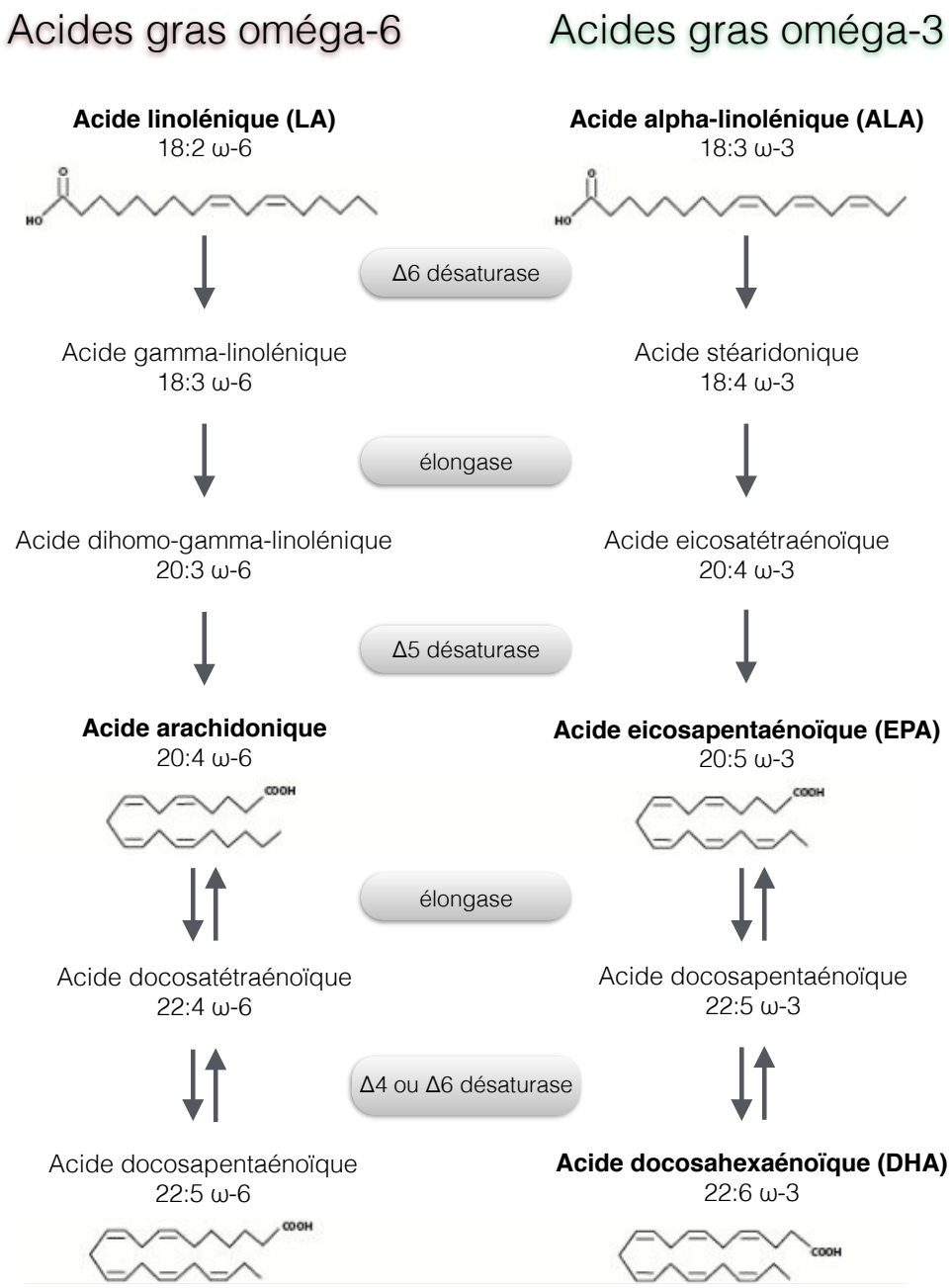


Figure 33. Synthèse des acides gras insaturés oméga-3 et-6.

3.2. Matériels et Méthodes

3.2.1. Animaux et régimes

Nous avons comparé les effets de la consommation de 4 régimes différents : régime standard, HFD Soja/Maïs (utilisés dans la section « Implication de la chimiokine CCL5 dans la prise de poids par action sur les neurones à MCH : un rôle dans la pathogenèse de l'obésité ? »), HFD Colza et HFD Tournesol (SAFE Diets). La composition des régimes est détaillé dans le tableau 3 ci-dessous.

	Régime standard	HFD Soja/Maïs	HFD Colza	HFD Tournesol
Energie (kcal/g)	**2,8**	**4,5**	**4,4**	**4,5**
Protéines (%)	21,4	18,2	23	20,1
Glucides (%)	51,7	46,8	43	46,8
Lipides (%)	**5,1**	**20,0**	**20,0**	**20,0**
Détail de la composition en lipides du régime HFD		6,1% beurre anhydre 6% Crisco (huile hydrogénée) 6% saindoux *1,3% huile de soja* *0,5% huile de maïs* 0,15% cholestérol	*20% huile de colza*	5,1% beurre anhydre 5% Crisco (huile hydrogénée) 5% saindoux *4,77% huile de tournesol* 0,15% cholestérol
Energie apportée par les lipides (%)	**13,6**	**40,3**	**40,5**	**40,3**
Rapport LA (omega-6)/ALA (omega-3)	**8,9**	**8,3**	**2,3**	**18,3**
Fibres, Minéraux, Humidité etc (%)	21,8	15	14	13,1

Tableau 3. Détail de la composition des régimes utilisés : régimes standard, HFD Soja/Maïs, HFD Colza et HFD Tournesol

Comme pour les études de la section « Implication de la chimiokine CCL5 dans la prise de poids par action sur les neurones à MCH : un rôle dans la pathogenèse de l'obésité ? », les souris sont nourries jusqu'à l'âge de 4 semaines avec un régime contrôle, puis sont séparées en plusieurs groupes : un reste sous régime contrôle alors que les autres sont alors nourris avec chacun des régimes HFD pendant une période comprise entre 8 et 16 semaines.

Tout au long de l'expérience, les souris ont un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Le poids des animaux, la prise alimentaire et la prise hydrique sont mesurés tous les deux jours.

3.2.2. Quantification de l'expression génique et/ou protéique de médiateurs inflammatoires et de la leptine en périphérie et/ou dans l'hypothalamus.

Voir le Matériels et Méthodes de la section « Implication de la chimiokine CCL5 dans la prise de poids par action sur les neurones à MCH : un rôle dans la pathogenèse de l'obésité ? ».

3.2.3. Analyses statistiques

Voir le paragraphe « Material and Methods» de l'article « CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity », section « Statistical analysis ».

3.3. Résultats

Afin de déterminer si l'inflammation périphérique et centrale ainsi que la dérégulation des systèmes neuropeptidergiques de l'hypothalamus associées à l'obésité dépendent de la quantité et/ou de la nature des lipides contenus dans les HFD, nous avons développé le même protocole que celui utilisé dans la section « Implication de la chimiokine CCL5 dans la prise de poids par action sur les neurones à MCH : un rôle dans la pathogenèse de l'obésité ? » pour le modèle d'obésité nutritionnelle, avec 2 autres régimes hyperlipidiques, HFD Colza et HFD Tournesol. Ces régimes contiennent la même quantité de lipides (20%) et ceux-ci représentent le même pourcentage de l'énergie totale apportée par le régime (40%).

On notera que seul le régime HFD Colza respecte les recommandations d'un rapport omega-6/omega-3 inférieur à 5. Les régimes contrôle et HFD Soja/Maïs ont un quant à eux un rapport comparable environ égal à 8 alors que le régime HFD Tournesol a quant à lui un rapport très élevé, de 18,3, dû au rapport extrêmement élevé du rapport omega-6/omega-3 (supérieur à 1000) dans la seule huile de tournesol qui entre dans sa composition.

3.3.1. Effet de la nature des lipides sur la prise de poids des souris C57Bl6/J

En comparaison à notre modèle initial d'obésité nutritionnelle, la croissance pondérale des animaux du groupe HFD Colza est ralentie : à la 16ème semaine, les souris HFD Colza ont un poids moyen significativement supérieur à celui des contrôles (33,1 ± 0,6 g contre 30,5 ± 0,4 g ($p<0,01$), soit une augmentation de poids de 9% au lieu de 12% pour les HFD Soja/Maïs au même temps. Les souris du groupe HFD Tournesol ont aussi un poids supérieur à celui des souris contrôles : à la semaine 16, elles pèsent en moyenne 36,4 ± 0,8 g ($p<0,001$). De ce fait, elles ont, au contraire des souris HFD Colza, une croissance pondérale accélérée par rapport au modèle initial avec le régime HFD Soja/Maïs (leur poids est significativement supérieur à celui des contrôles de 19% contre 12% chez les HFD Soja/Maïs) (figure 34).

On notera pour la suite des résultats qu'initialement notre étude comparative ne concernait que les régimes contrôles, HFD Soja/Maïs et HFD Colza, pour lesquels nous avons pu effectuer nos mesures à tous les temps d'intérêt. Au contraire, nous n'avons intégré le régime HDF Tournesol que plus tardivement dans cette étude et nous avons seulement étudié deux temps, à savoir 8 et 16 semaines.

3.3.2. Effet de la nature des lipides sur la leptinémie

Le taux de leptine circulante est augmentée chez les souris des groupes HFD Colza et HFD Tournesol dès la 8ème semaine (figure 34). A la 8ème semaine, alors que le taux de leptine des animaux contrôles est de 9,0 ± 1,0 pg/ml, celui des souris HFD Colza est de 19,0 ± 1,5 pg/ml et celui des souris HFD Tournesol est de 18,7 ± 2,3 pg/ml ($p<0,001$ pour les 2 régimes à ce temps), soit une augmentation par rapport aux contrôles de 2,1 environ pour les 2 régimes en question (figure 35). La consommation des régimes HFD Colza et HFD Tournesol induit aussi une hyperleptinémie. La leptinémie ne serait affectée que marginalement par la nature des lipides à 16 semaines, temps auquel le taux de leptine circulante des souris HFD Soja/Maïs est supérieur à celui induit par les deux autres régimes ($p<0,01$).

Selon la nature des régimes, le régime est plus ou moins obésogène. En effet, si tous les régimes induisent incontestablement une hyperleptinémie, le régime HFD Colza induit une augmentation de la croissance pondérale juste inférieure de celle décrite dans la littérature (9% contre 10%). De manière globale, on peut considérer les trois HFD comme obésogènes, mais nos résultats suggèrent que le développement de l'obésité est affecté par la nature des lipides et est notamment ralenti avec le régime ayant un rapport oméga-6/oméga-3 inférieur à 5.

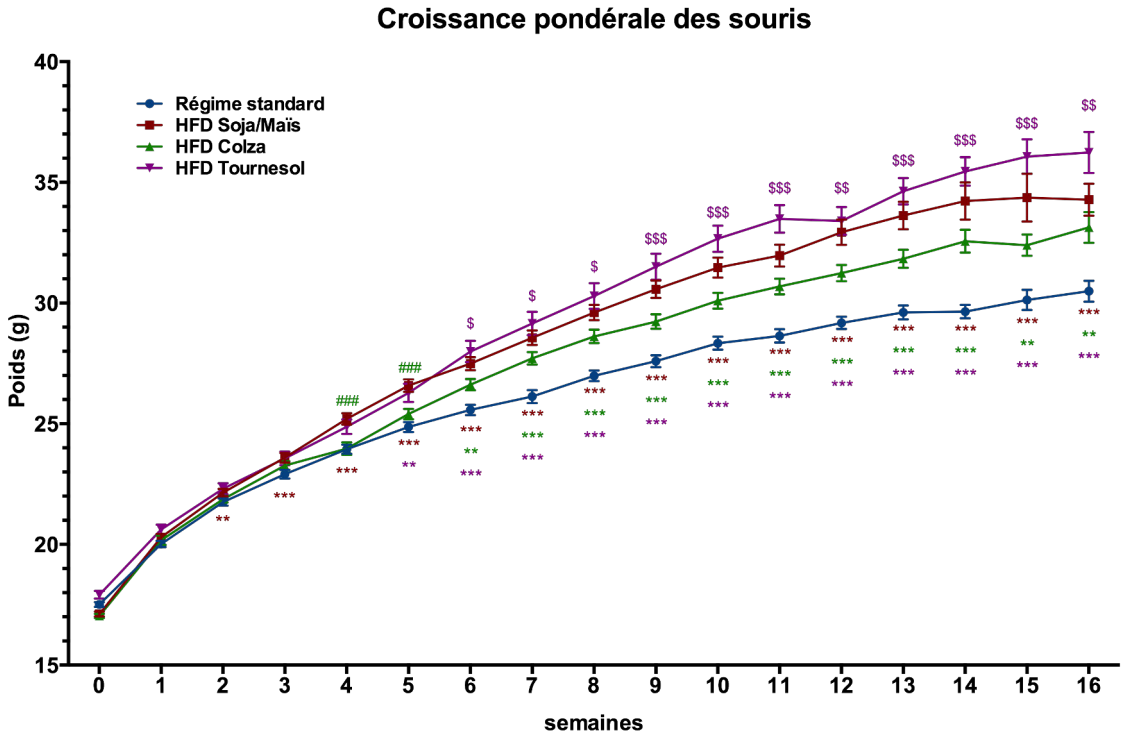


Figure 34. Croissance pondérale des souris au cours du temps en fonction des régimes. Suivi de la prise de poids des souris selon les régimes. Les souris étaient âgées de 4 semaines au début du protocole et étaient pesées tous les 2 jours (3 expériences indépendantes, n=10 par groupe). $, $p<0,05$, ** ou $$ $p<0,01$, *** ou ### ou $$$ $p<0,001$, * Régime standard vs autres régimes à un temps donné, # HFD Soja/Maïs vs HFD Colza ou HFD Tournesol à un temps donné, $ HFD Colza vs HFD Tournesol à un temps donné. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

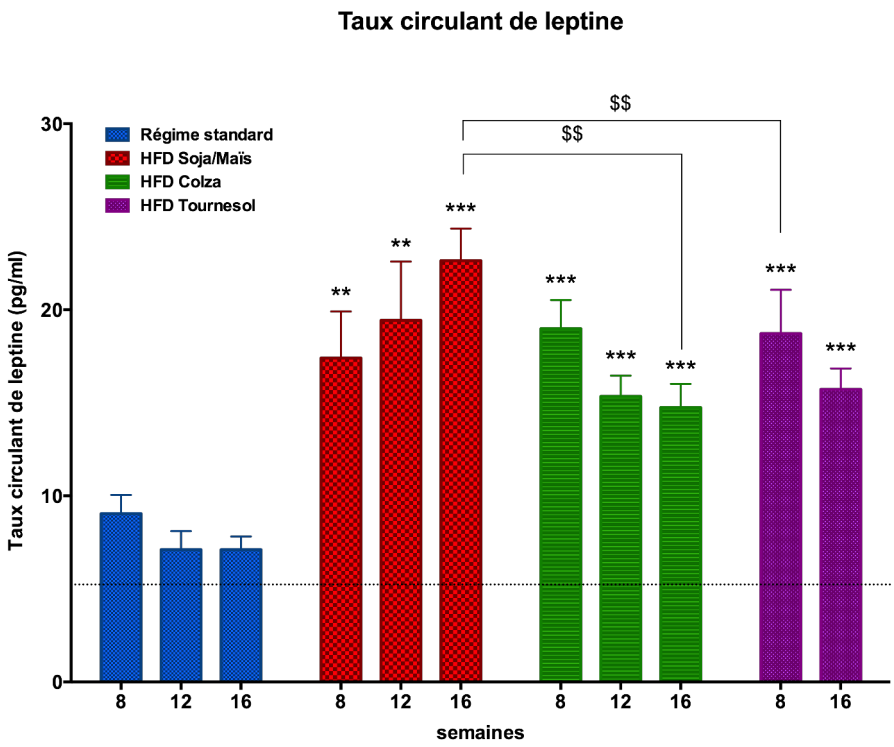


Figure 35. Concentration sérique en leptine des animaux. Dosage de la concentration sérique de la leptine par ELISA chez des souris selon les régimes. (3 expériences indépendantes, n=10 par groupe). ** ou $$ p<0,01, ***p<0,001, * Régime standard vs autres régimes à un temps donné, $ HFD comparés entre eux à un temps donné. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

3.3.3. Effet de la nature des lipides sur l'inflammation

Comme pour la caractérisation de notre modèle initial d'obésité nutritionnelle, nous avons mesuré l'expression des mêmes médiateurs inflammatoires que ceux étudiés alors, ici avec les régimes HFD Colza et HFD Tournesol, aux mêmes temps d'intérêt (figures 36 et 37).

Concernant l'inflammation périphérique, l'expression des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires est aussi augmentée avec la consommation du HFD Colza. La concentration de CCL2 et CCL5 dans le sérum augmentent selon une cinétique et dans des proportions comparables à celles trouvées avec le régime HFD Soja/Maïs, justifiant des différences significatives entre les régimes à un temps donné (figure 37). On notera tout de même que l'augmentation de la concentration de l'IL-6 est décalée dans le temps, à 16 semaines au lieu de 12 semaines pour le régime HFD Soja/Maïs (figure 36).

Concernant l'expression génique des cytokines IL-1β, IL-6 et TNF-α dans l'hypothalamus, nous constatons qu'elle est effectivement augmentée dans le groupe HFD Colza par rapport au groupe contrôle, mais qu'elle est décalée à la 12ème semaine au lieu de la 8ème avec le régime HFD Soja/Maïs. L'expression génique était alors augmentée d'un facteur 4,1, 4,7 et 4,4 pour IL-1β, IL-6 et TNF-α respectivement (figure 36). Concernant les chimiokines, leur expression génique dans l'hypothalamus est aussi décalée, avec une augmentation maximale de leur expression à 12 semaines au lieu de 8 semaines pour le régime HFD

Soja/Maïs (figure 37). Ceci justifie ici encore des différences significatives entre régimes HFD.

Il est intéressant de noter que la consommation du régime HFD Tournesol ne semble pas induire d'augmentation de l'expression des ARNm codant les médiateurs inflammatoires étudiés à nos temps d'observation (figures 36 et 37).

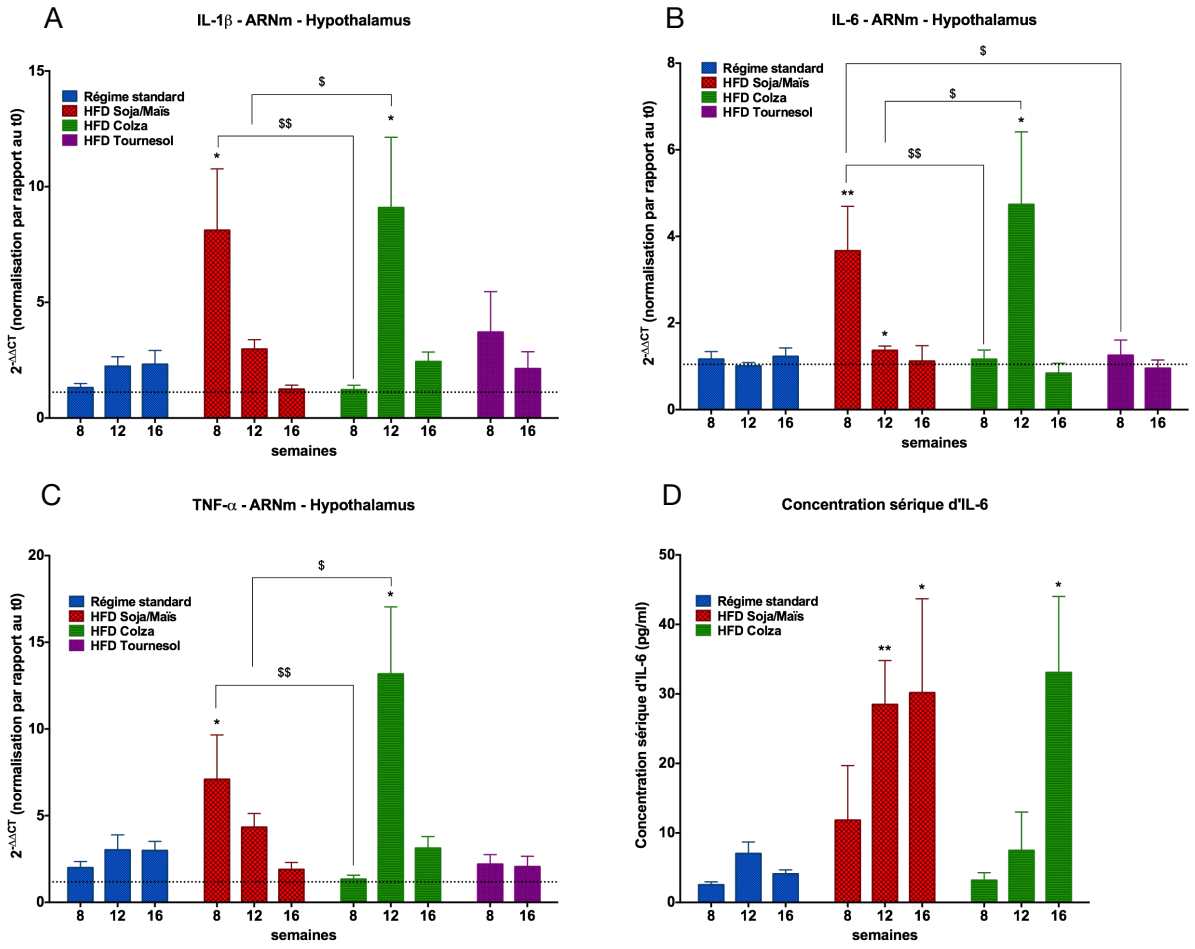


Figure 36. Expression génique dans l'hypothalamus et concentration sérique de cytokines pro-inflammatoires.
A-C Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les cytokines pro-inflammatoires IL-1β (A) IL-6 (B) et TNF-α (C) dans l'hypothalamus de souris. Les valeurs sont normalisées par rapport la condition à t0 (n=10 par groupe).
D Dosage de la concentration sérique de l'IL-6 par FACS Array. (n=10 par groupe).
* ou $ p<0.05, ** ou $$ p<0,01, * Régime standard vs autres régimes à un temps donné, $ HFD comparés entre eux à un temps donné. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

La nature des lipides du régime HFD Colza semble pouvoir retarder le développement de l'inflammation transitoire observée dans l'hypothalamus, mais cela est moins net pour ce qui est de l'inflammation périphérique. Aux temps d'études 8 et 16 semaines, le régime HFD Tournesol n'induit à priori pas d'inflammation. Cependant, compte-tenu de sa capacité à induire une croissance pondérale accrue comparativement aux autres HFD, on pourrait supposer que l'inflammation transitoire hypothalamique induite éventuellement par le HFD Tournesol ait lieu à des temps plus précoces qui nécessiteraient d'être étudiés. Nous ne pouvons cependant pas exclure que celle-ci ait lieu à la 12ème semaine.

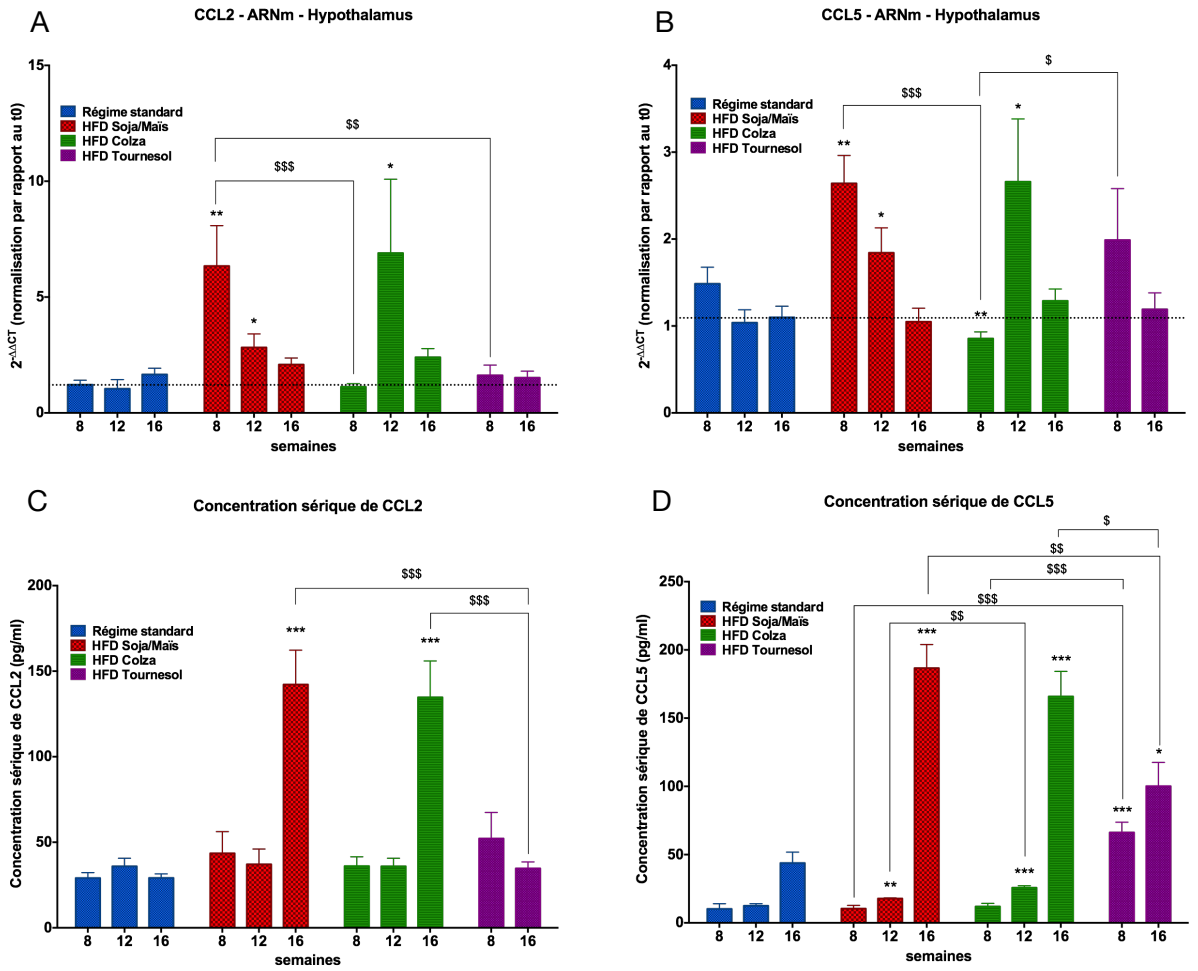


Figure 37. Expression génique dans l'hypothalamus et concentration sérique de chimiokines.
A-B Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les chimiokines CCL2 (A) et CCL5 (B) dans l'hypothalamus de souris. Les valeurs sont normalisées par rapport la condition à t0 (n=10 par groupe).
C-D Dosage de la concentration sérique de CCL2 (C) et CCL5 (D) par FACS Array (n=10 par groupe).
* ou $ p<0.05, ** ou $$ p<0,01, *** ou $$$ p<0,001, * Régime standard vs autres régimes à un temps donné, $ HFD comparés entre eux à un temps donné. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

3.3.4. Effet de la nature des lipides sur la production des peptides de l'ARC et du LHA impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

- ***Concernant les peptides des neurones de premier ordre de l'ARC***

L'expression génique des peptides anorexigènes POMC et CART, au contraire de ce qui était observé avec le régime HFD Soja/Maïs, n'est pas modifiée par la consommation du régime HFD Colza (figure 38). En revanche, alors que l'expression de POMC était significativement supérieure chez le groupe HFD Soja/Maïs aux semaines 8 et 12, elle l'est aussi avec le régime HFD Tournesol à la semaine 8 (figure 38). De plus, l'expression des ARNm codant les peptides orexigènes NPY et AgRP n'est pas significativement augmentée à nos temps d'études par la consommation des régimes HFD Colza et HFD Tournesol, au contraire de ce qui était observé avec le régime HFD Soja/Maïs (figure 38).

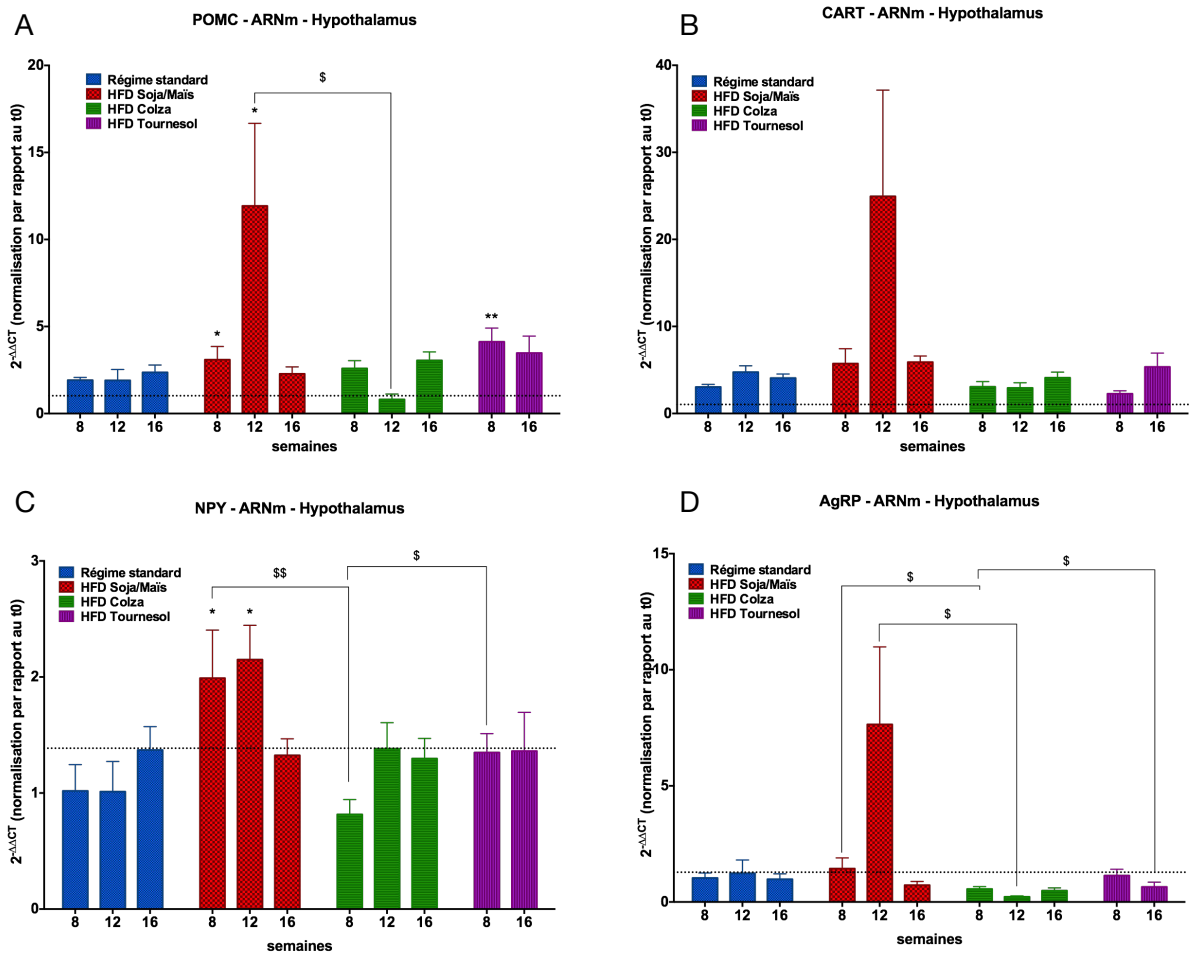


Figure 38. Expression génique des peptides de l'ARC : POMC, CART, NPY et AgRP.
A-B Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les peptides anorexigènes de l'ARC, POMC (A) et CART (B) dans l'hypothalamus de souris.
C-D Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les peptides orexigènes de l'ARC, NPY (C) et AgRP (D) dans l'hypothalamus de souris.
Les valeurs sont normalisées par rapport la condition à t0 (n=10 par groupe). * ou *ou $ p<0.05, ** $$ p<0,01, * Régime standard vs autres régimes à un temps donné, $ HFD comparés entre eux à un temps donné. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

- ***Concernant les peptides des neurones de second ordre du LHA***

Au contraire de ce qu'on a globalement observé pour les neurones de premier ordre, les peptides orexigènes du LHA, MCH et OX, sont tous les deux régulés à la hausse par la consommation de chacun des régimes HFD utilisés (figure 39).

Il est intéressant de noter que de nouveau, la consommation du régime Colza semble retarder les effets induits par un HFD (figure 39). On notera aussi, qu'au contraire des médiateurs pro-inflammatoires mesurés, l'expression des peptides du LHA est augmentée avec le HFD Tournesol (figure 39).

Ces résultats montrent que quelque soit la nature des lipides, il y a augmentation de l'expression des peptides orexigènes du LHA associée à la consommation d'un HFD, ce qui n'est pas le cas des peptides de l'ARC. Il semble d'ailleurs que l'augmentation de

l'expression des peptides orexigènes du LHA suit la cinétique d'apparition de l'inflammation centrale et persiste dans le temps.

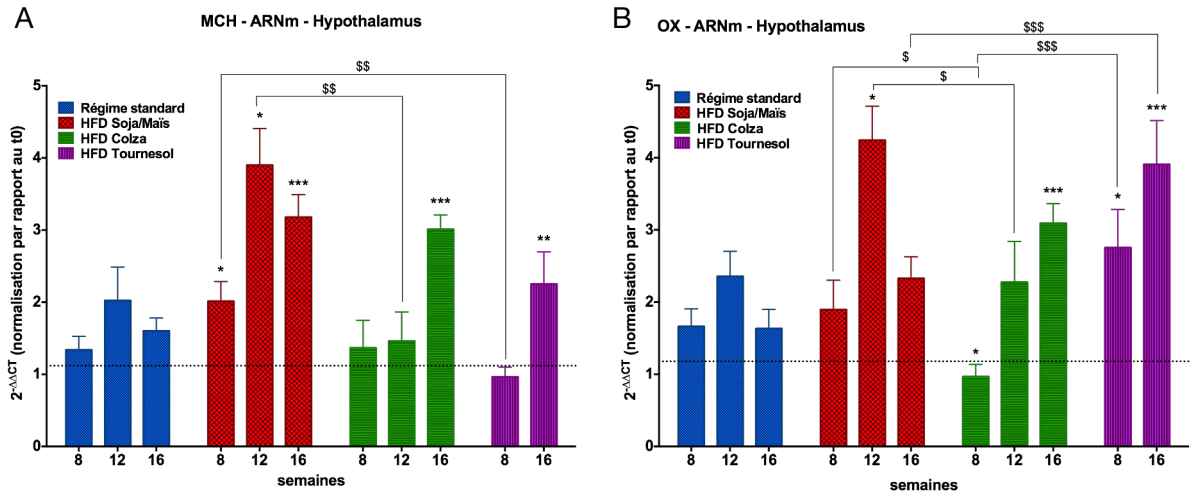


Figure 39. Expression génique des peptides du LHA : MCH et OX.
A-B Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant les peptides du LHA, MCH (A) et OX (B) dans l'hypothalamus de souris. Les valeurs sont normalisées par rapport la condition à t0 (n=10 par groupe). *p<0.05, ***p<0,001, régime standard vs HFD Soja/Maïs. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM. *ou $ p<0.05, ** $$ p<0,01, *** ou $$$ p<0,001, * Régime standard vs autres régimes à un temps donné, $ HFD comparés entre eux à un temps donné. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

3.4. Conclusion et Discussion

Depuis quelques temps circule l'idée selon laquelle les régimes enrichis en oméga-3 pourraient retarder la mise en place de l'obésité (Buckley and Howe, 2010). De plus, des études récentes sur les effets du changement d'un HFD à base de lard, après 8 semaines de régime, pour des régimes à bases d'AGPI, ont montré que cela permet de réduire le poids et d'améliorer le métabolisme (regain de sensibilité à l'insuline,…) et est associée à une diminution de l'inflammation hypothalamique (Cintra et al., 2012; Oliveira et al., 2015).

Nous avons choisi d'étudier l'effet de la nature des lipides sur le développement de l'obésité. Nos résultats montrent que la nature des lipides n'empêche pas le développement du phénotype obèse mais induit des différences, notamment dans la prise de poids où le régime HFD Colza, dont le rapport omega-6/omega-3 est le plus faible, induit une prise de poids plus lente que notre modèle initial, et au contraire, où le régime HFD Tournesol, dont le rapport omega-6/omega-3 est très élevé, accélère la prise de poids.

Par ailleurs, l'hyperleptinémie et l'inflammation périphérique paraissent peu affectées par la nature des lipides. En revanche, l'inflammation hypothalamique elle, est affectée par la nature des lipides, notamment, elle apparaît comme retardée avec le régime HFD Colza qui ralentit la croissance pondérale des animaux par rapport aux autres HFD, ce qui est cohérent avec les études de Cintra et ses collaborateurs en 2012. Comme nous l'avons suggéré précédemment, l'absence d'inflammation hypothalamique à nos temps d'étude avec le régime HFD Tournesol, alors qu'il accélère la croissance pondérale, pourrait peut-

être être expliqué par une inflammation plus précoce, que nous n'aurions donc pas pu détecter. Il est donc primordial de réitérer les expériences à des temps plus courts comme 4, ou 6 semaines de régime. De manière générale, ces résultats suggèrent que l'inflammation hypothalamique contribue effectivement à la cinétique d'apparition du phénotype obèse.

Nous avons vu que la nature des lipides modifie aussi l'expression des peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation du CA. Si tous les régimes augmentent l'expression des peptides du LHA, MCH et OX, cette augmentation est notamment décalée avec le régime HFD Colza. Ceci semble confirmer notamment le lien entre neuroinflammation et augmentation de l'expression des peptides orexigènes du LHA.

Pour autant, l'augmentation de l'expression des ARNm des peptides orexigènes hypothalamiques que nous avons mesurée ne correspond pas nécessairement à une augmentation de la prise alimentaire. En effet, il n'est pas à exclure qu'à consommation calorique égale (comme c'est le cas entre les HFD que nous avons utilisés), l'assimilation et le stockage des nutriments, en particulier des lipides, soient différents. De plus, la MCH et l'OX ont d'autres rôles dans le stress, dans les cycles veille/sommeil, l'activité locomotrice etc qui pourraient affecter la prise de poids.

Par ailleurs, des troubles de sommeil chez les personnes obèses ont été décrits, et du fait de leur rôle dans le sommeil par sécrétion tonique, la surexpression chronique de la MCH et de l'OX pourrait entraîner des dérégulations de la transition veille/sommeil. Ainsi, il serait intéressant d'étudier chez des souris sous différents HFD, l'activité locomotrice, en plus du CA, dans des cages métaboliques.

Au vu des différences observées entre les effets des HFD selon la nature des lipides qu'ils contiennent, il est probable que leurs métabolites ne soient pas de même nature non plus. Il faudrait déterminer les vois de signalisation engagées par les différents régimes, notamment inflammatoires. Comme nous l'avons mentionné auparavant, par exemple, les AGS peuvent engager la voie du TLR4, dont l'activation dans le cerveau semble fondamentale dans le développement de l'obésité (Kleinridders et al., 2009), alors que les AGI de type omega-3 agiraient par la voie des prostaglandines anti-inflammatoires (Simopoulos, 2002).

Nos résultats actuels suggèrent donc que la nature des lipides serait un facteur majeur de la mise en place de l'inflammation hypothalamique, elle-même fondamentale dans le développement du phénotype obèse par action, notamment, sur les réseaux neuropeptidergiques de l'hypothalamus impliqués dans la régulation du CA et du poids corporel. Une attention particulière devra donc être portée aux lipides constituant les HFD dans les différentes études tenant à la DIO.

4. Quelle est la réponse précoce à la consommation d'un régime hyperlipidique dans l'hypothalamus ?

4.1. Introduction

Dans la caractérisation de l'inflammation hypothalamique associée à la surnutrition, il faut prêter aussi prêter attention à la contribution des différents types cellulaires de l'hypothalamus.

L'hypothalamus, et particulièrement le MBH, bénéficient d'une position particulièrement privilégiée pour la détection de signaux émanant de la périphérie donnant des informations sur l'état métabolique d'un individu. En effet, l'hypothalamus contient des OCV, où la BHE est perméable, mais aussi proche du 3V. Cependant, cette position rend aussi l'hypothalamus particulièrement vulnérable au stress engendré par un excès de nutriments.

Si les neurones hypothalamiques semblent être à la fois cible et médiateurs de l'inflammation, par activation de voies inflammatoires intracellulaires, participant ainsi à la pathologie associée à la surnutrition, ce sont les cellules gliales qui sont considérées comme les cellules « immunitaires » du cerveau.

Comme mentionné précédemment dans l'Introduction, section 2.1.4, il a été montré que la microglie est l'acteur principal de l'immunité innée dans le cerveau, et que ses actions sont similaires à celles des macrophages résidents dans les tissus périphériques : phagocytose de débris, de cellules endommagées, de bactérie. La microglie est notamment importante pour monter les réponses défensives du cerveau (Ransohoff and Brown, 2012). La microglie est activée dans de nombreuses maladies neurodégénératives, certainement d'abord dans un but de résolution, mais souvent, son activation, en devenant chronique, peut finir par aggraver la pathologie. Il a été montré de manière intéressante que la microglie exprime des TLR, comme les macrophages en périphérie, ainsi les AGS peuvent l'activer. Chez les animaux et les hommes obèses, on a pu observer dans l'ARC et l'éminence médiane, les changements morphologiques de la microglie caractéristiques de son activation (vers une forme amyboïde) ainsi qu'une augmentation de l'expression de cytokines inflammatoires (Milanski et al., 2009; Thaler et al., 2012; Valdearcos et al., 2014). L'activation de la microglie dans l'hypothalamus a été associée à la consommation de HFD et à l'accumulation consécutive de lipides dans l'hypothalamus, suggérant que la microglie est capable de détecter et de répondre à des niveaux accrus de lipides, notamment les AGS, pour induire une inflammation. La microglie activée engage des voies de signalisation inflammatoires et sécrète des cytokines pro-inflammatoires qui pourraient altérer à leur tour le fonctionnement des neurones dans l'hypothalamus et donc déréguler la régulation du CA (en effet, le

dialogue réciproque entre la microglie et les neurones hypothalamiques a été démontrée). La microglie semble particulièrement impliquée dans l'inflammation induite par les AGS. Reste à déterminer l'origine des cellules microgliales recrutées dans cette « microgliose » : prolifération, migration et différenciation de cellules progénitrices résidentes du SNC ou infiltration de cellules issues de la moelle épinière ou une combinaison des deux phénomènes ?

Un autre type de cellules gliales a attiré l'attention dans ce contexte : les astrocytes. Comme mentionné précédemment (Introduction, section 2.1.4), ces derniers participent à plusieurs fonctions dans le cerveau en conditions normales : l'apport de nutriments, plasticité synaptique, libération de neuromodulateurs (ex. glutamate, ATP, GABA). Selon leur localisation, les astrocytes ont des morphologies différentes et expriment différents récepteurs. Leur fonction dans l'hypothalamus est encore méconnue mais il apparait qu'ils peuvent répondre à certains signaux et pourraient exercer un contrôle sur les neurones hypothalamiques régulant le CA : ils pourraient influencer les connexions synaptiques dans les circuits neuronaux contrôlant le CA (Kim et al., 2014) et contrôler le métabolisme glucidique (Levin et al., 2011) et lipidique (Shen et al., 2009) par les neurones voisins. Par ailleurs, les astrocytes sont capables d'oxyder les AG en produisant des corps cétoniques qui peuvent servir de substrat énergétique pour les neurones. Il est intéressant de noter que la consommation d'un HFD est aussi associée à une astrogliose dans l'hypothalamus, qui pourrait être impliquée dans le développement d'une résistance hypothalamique à la leptine et à l'insuline. Quels sont les déclencheurs de cette astrogliose ? Il a été suggéré, par une étude portant sur des astrocytes primaires en culture, qu'ils répondent, comme la microglie, aux AGS (Gupta et al., 2012), mais compte-tenu de la difficulté technique à obtenir des cultures d'astrocytes sans contamination par d'autres types cellulaires, ces résultats sont à considérer avec recul. Une autre étude a montré que les astrocytes ne seraient pas activés par les AGS et suggère que l'astrogliose est secondaire à la microgliose.

Certaines études ont décrit que la consommation d'un régime hyperlipidique entraîne une gliose, observée lorsque l'obésité était déjà installée, ou même après 24h seulement (Berkseth et al., 2014; Thaler et al., 2012).

Dans ce contexte, nous avons voulu déterminer l'impact sur l'hypothalamus, au niveau inflammatoire, de la consommation d'un HFD sur une période beaucoup plus brève, à l'image d'un repas riche dans notre société occidentale.

4.2. Matériels et Méthodes

4.2.1. Animaux et régimes

Nous avons comparé les effets de la consommation des régimes standard et HFD Soja/Maïs utilisés précédemment pendant des temps très courts (1h et 3h).
Pour réaliser nos études, nous avons privé de nourriture des souris mâles C57Bl6/J âgées de 8 semaines pendant 2h, dès le commencement de la phase obscure du cycle jour/nuit, afin de synchroniser les groupes. A l'issue de cette privation, un groupe reçoit alors de nouveau le régime standard, et l'autre groupe reçoit le HFD Soja/Maïs pendant 1 ou 3h. Tout au long de l'expérience, les animaux ont un accès *ad libitum* à l'eau.

4.2.2. Quantification de l'expression génique dans l'hypothalamus

Voir le Matériels et Méthodes de la section « Implication de la chimiokine CCL5 dans la prise de poids par action sur les neurones à MCH : un rôle dans la pathogenèse de l'obésité ? ».
Les séquences des amorces utilisées pour l'analyse de l'expression génique de la GFAP (« glial fibrillary acidic protein » ; marqueur astrocytaire) et de l'Iba1 (« ionized calcium-binding adaptor molecule 1 » ; marqueur microglial) par qPCR sont les suivantes :

Gène	séquence 5'-3'	concentration
mGFAP-F	TCGAGATCGCCACCTACAG	
mGFAP-R	GTCTGTACAGGAATGGTGATGC	500 nM
mIba1-F	GGATTTGCAGGGAGGAAAA	
mIba1-R	TGGGATCATCGAGGAATTG	500 nM

4.2.3. Etude de la plasticité astrocytaire et microgliale par immunohistochimie

Après la fin de la période de 1 ou 3h de consommation de nourriture, les souris sont anesthésiées par injection de pentobarbital (dilué au 1/5 dans du NaCl 0,9% ; 10ml/kg). Les souris sont alors perfusées (intracardiaque) pendant 5 min avec du PBS 1X froid, puis pendant 15 à 20 min avec du paraformaldéhyde (PFA) 4% froid (débit : 1-2ml/min). Les cerveaux sont alors prélevés et post-fixés dans du PFA 4% frais sur la nuit. Le lendemain, les cerveaux sont placés dans PBS-sucrose 20% stérilisé. Quand les cerveaux sont saturés en PBS-sucrose 20%, ils sont congelés à l'isopentane refroidi (-40°C) puis conservés à -

20°C. On réalise alors des coupes de 20µM d'épaisseur à l'aide d'un cryostat (Leica). Les coupes sont co-marquées avec un anticorps anti-GFAP (1 :500, Sigma) et un anticorps anti-Iba1 (1 :2000, Biocare Medical). Les anticorps secondaires utilisés sont couplés à un flurochrome : Alexa Fluor 647 et Alexa Fluor 488 respectivement. Les images sont acquises grâce à un microscope confocal (Leica SP5) en réalisant des sections dans l'axe Z (pas = 2,5 µM).

Les analyses de quantification sont réalisées grâce au logiciel ImageJ (NIH). Brièvement, l'intensité maximale des deux marquages sur l'ensemble des sections réalisées dans le Z est calculée puis les marquages GFAP et Iba1 sont analysés dans les deux ARC et dans l'EM par mesure du pourcentage de l'aire étant marqué et de la densité intégrée de fluorescence (« integrated density »), après élimination du bruit de fond.

4.2.4. Analyses statistiques

Voir le paragraphe « Material and Methods» de l'article « CCL2 mediates central inflammation-induced weight-loss through inhibition of MCH neuronal activity », section « Statistical analysis ».

4.3. Résultats

4.3.1. Réponse inflammatoire précoce dans l'hypothalamus induite par un régime hyperlipidique

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression génique de la GFAP, marqueur astrocytaire, et de l'Iba1 dans l'hypothalamus, après consommation du régime HFD Soja/Maïs pendant 1h ou 3h.

Nous avons pu observer ainsi qu'après une heure de consommation de régime hyperlipidique, l'expression génique de GFAP dans l'hypothalamus est significativement augmentée d'un facteur 1,8 ($p<00,1$) (figure 40). Par contre, à 3h, cette augmentation avait disparu. En ce qui concerne Iba1, nous n'avons jamais observée de variation significative de son expression génique dans l'hypothalamus (figure 40).

Nous avons donc par la suite réalisé des marquages immunohistochimiques au niveau du MBH, des protéines GFAP et Iba1 pour étudier si une plasticité gliale pouvait être observée suite à la consommation d'un régime hyperlipidique, dans l'ARC ou l'éminence médiane (EM) (figure 41).

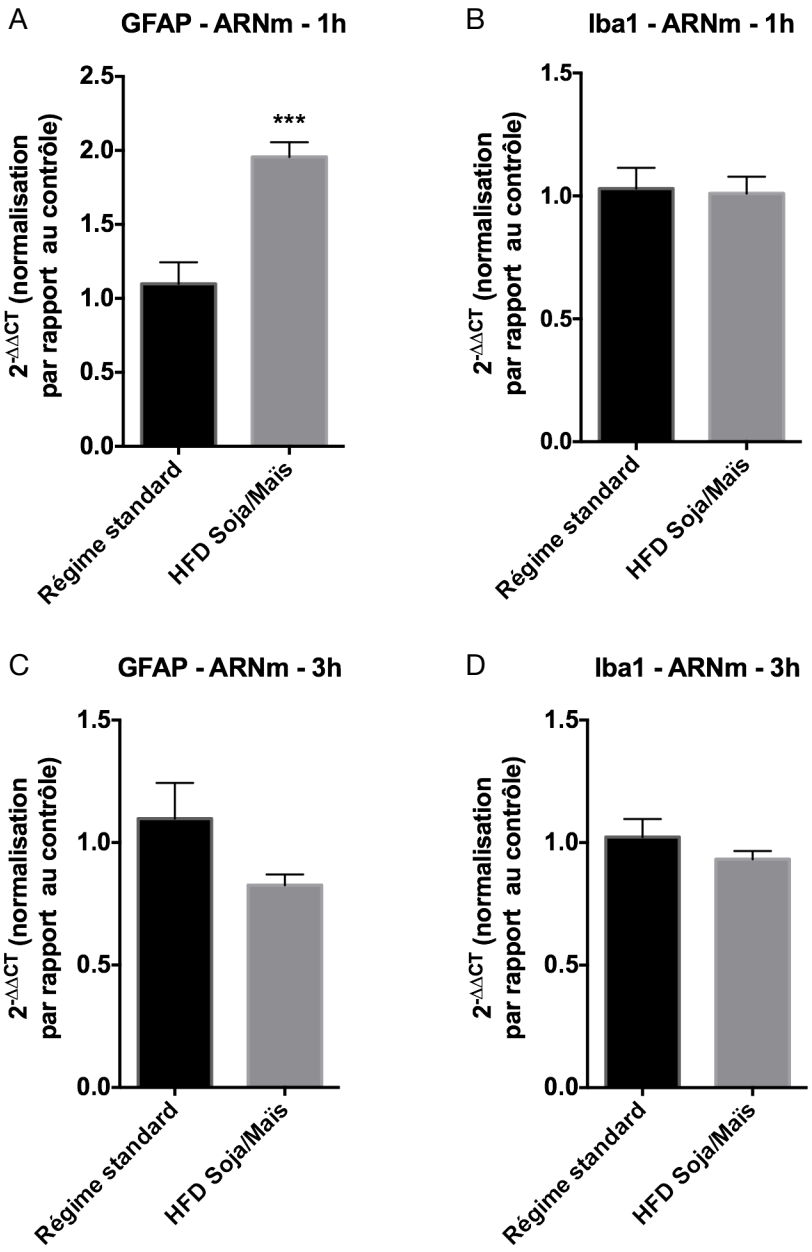


Figure 40. Expression génique dans l'hypothalamus des marqueurs astrocytaire (GFAP) et microglial (Iba1) après consommation du HFD Soja/Maïs.
A-B Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant GFAP (A) et Iba1 (B) dans l'hypothalamus de souris ayant accès 1h au régime standard ou au HFD Soja/Maïs après privation de nourriture. (n=10 par groupe).
C-D Analyse par qPCR en temps réel des gènes codant GFAP (C) et Iba1 (D) dans l'hypothalamus de souris ayant accès 3h au régime standard ou au HFD Soja/Maïs après privation de nourriture. (n=10 par groupe).
*** p<0,001, régime standard vs HFD Soja/Maïs. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

Après une heure de consommation du HFD, nous n'avons pas constaté de différence significative pour GFAP, contrairement à ce qu'auraient pu laisser entendre les résultats de qPCR, ni au niveau de l'ARC, ni au niveau de l'EM (figures 41, 42 et 44). Par contre, après une heure de HFD, une tendance à l'activation des cellules microgliales est constatée (figures 41, 42 et 44), ce qui n'était pas observé en qPCR, ce qui pourrait être notamment expliqué si l'augmentation de l'expression génique d'Iba 1 est plus précoce, ou encore parce que mesurant dans l'hypothalamus entier, nous pourrions ne pas détecter une

variation localisée dans le seul MBH, ou encore parce que l'activation microgliale est davantage caractérisée par un changement de morphologie que par une augmentation du nombre de cellules gliales à proprement parler ou de l'expression génique de leurs marqueurs (Kettenmann et al., 2011). Après 3h de consommation de HFD, il y a augmentation du marquage Iba1, dans l'ARC et dans l'EM, qui est significative ($p<0,05$ pour les paramètres mesurés dans l'ARC ; $p<0,001$ pour les paramètres mesurés dans l'EM) (figures 43 et 45), traduisant une activation microgliale accrue.

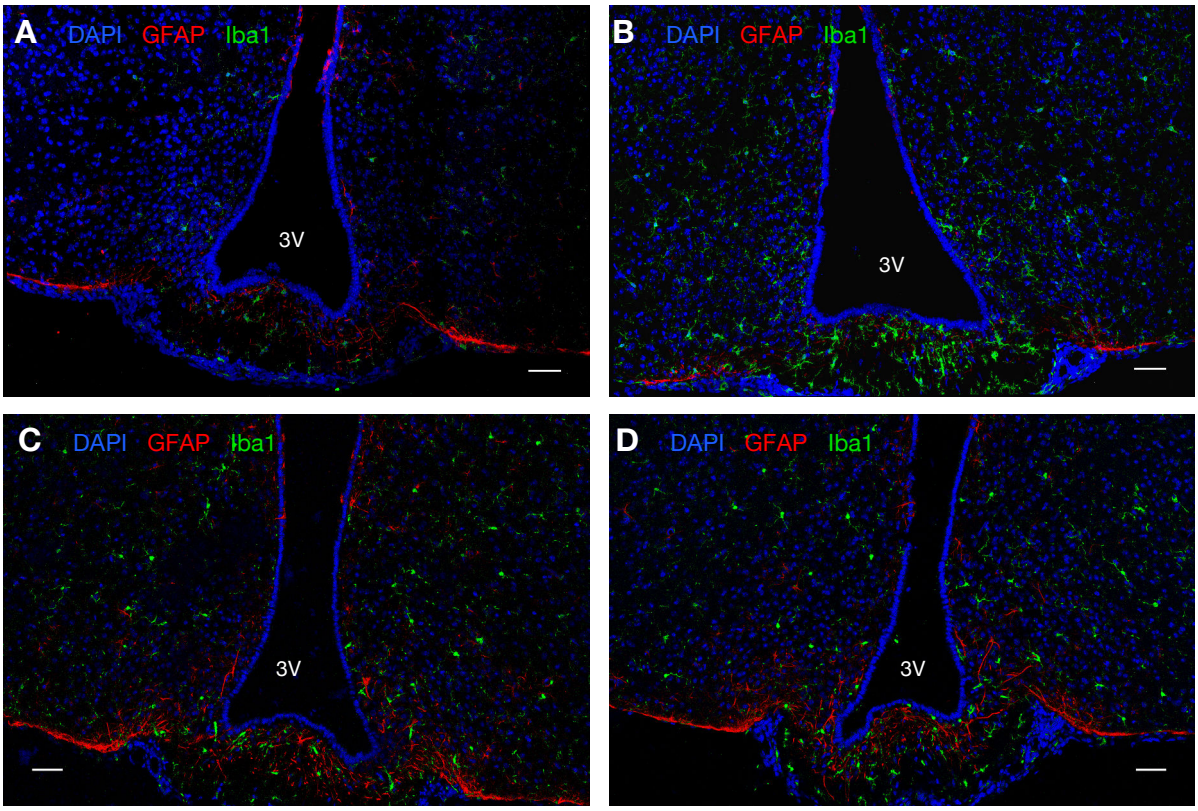


Figure 41. Photos représentatives des marquages GFAP et Iba1 dans le MBH après consommation du HFD Soja/Maïs pendant 1h (A-B) ou 3h (C-D).
A-B Photos représentatives des marquages GFAP et Iba1 dans le MBH après consommation du régime standard (A) ou HFD Soja/Maïs (B) pendant 1h.
C-D Photos représentatives des marquages GFAP et Iba1 dans le MBH après consommation du régime standard (A) ou HFD Soja/Maïs (B) pendant 3h.
Barres d'échelle : 50 µm
3V, 3ème ventricule.

Après 3h, comme c'était le cas après 1h, les paramètres quantitatifs que nous avions étudiés jusqu'alors n'ont pas permis de distinguer une réponse des astrocytes spécifique induite par le HFD. Cependant, nous avions remarqué une modification morphologique des prolongements astrocytaires marqués par la GFAP dans le groupe nourris avec un HFD après 3h, à savoir un épaississement et un allongement significatifs des prolongements astrocytaires, caractéristiques des astrocytes « réactifs » (Sofroniew, 2005; Wilhelmsson et al., 2006) (figure 46). En effet, les prolongements sont 1,6 fois plus épais ($p<0,001$) et 1,5

fois plus allongés (p<0,001) chez les animaux du groupe HFD que chez les animaux contrôles.

Il apparaît donc que la consommation d'un régime hyperlipidique entraîne une réaction de nature inflammatoire de manière très précoce dans l'hypothalamus, et plus précisément au niveau du MBH, qui est caractérisé par sa susceptibilité particulière à détecter les signaux nutritionnels en premier lieu et initier les réponses physiologiques.

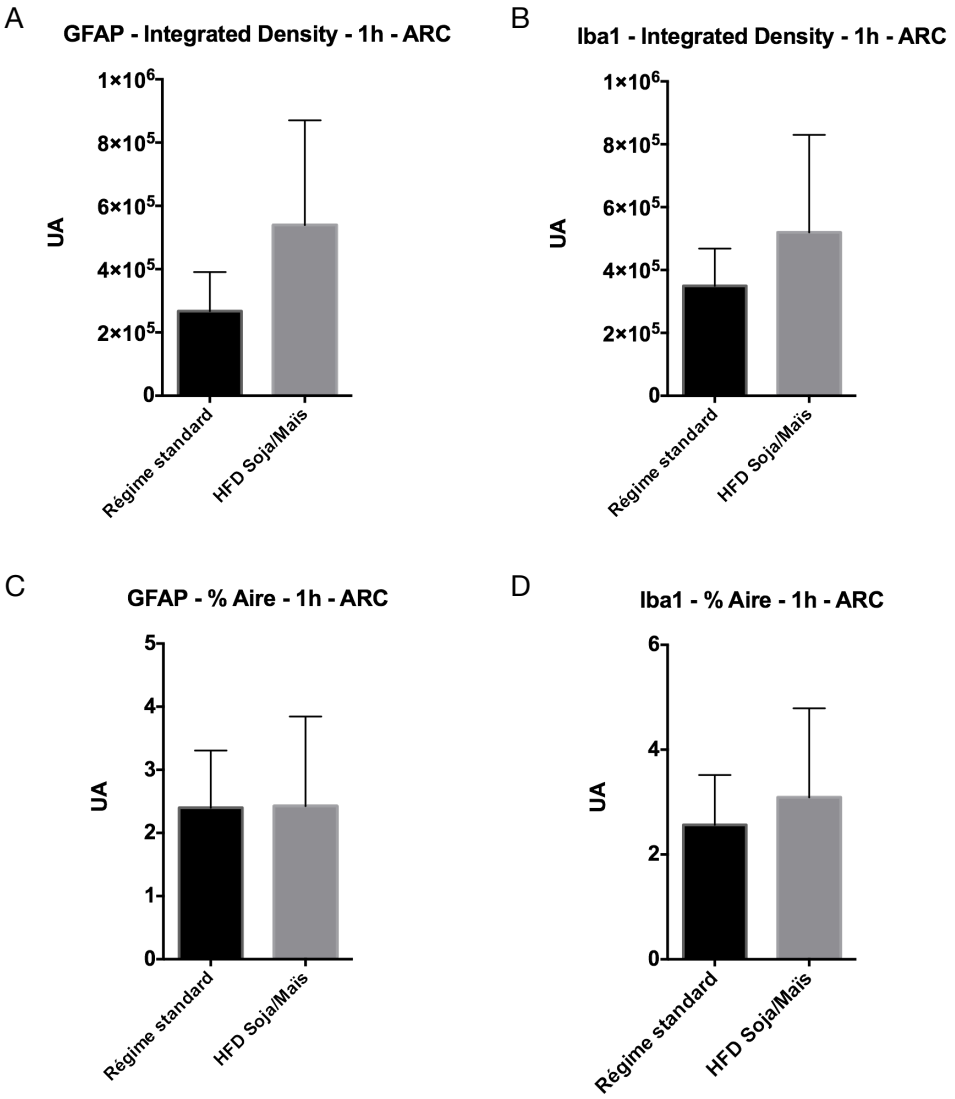


Figure 42. Analyse des marquages GFAP et Iba1 dans l'ARC après consommation du HFD Soja/Maïs pendant 1h
A-B Quantification de l'Integrated Density (densité intégrée de fluorescence) pour les marquages GFAP (A) et Iba1 (B) au niveau de l'ARC après 1h (n=9 pour le régime standard et n=6 pour le groupe HFD Soja/Maïs).
C-D Quantification du % d'aire marquée pour les marquages GFAP (C) et Iba1 (D) au niveau de l'ARC après 3h (n=9 pour le régime standard et n=6 pour le groupe HFD Soja/Maïs).
Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

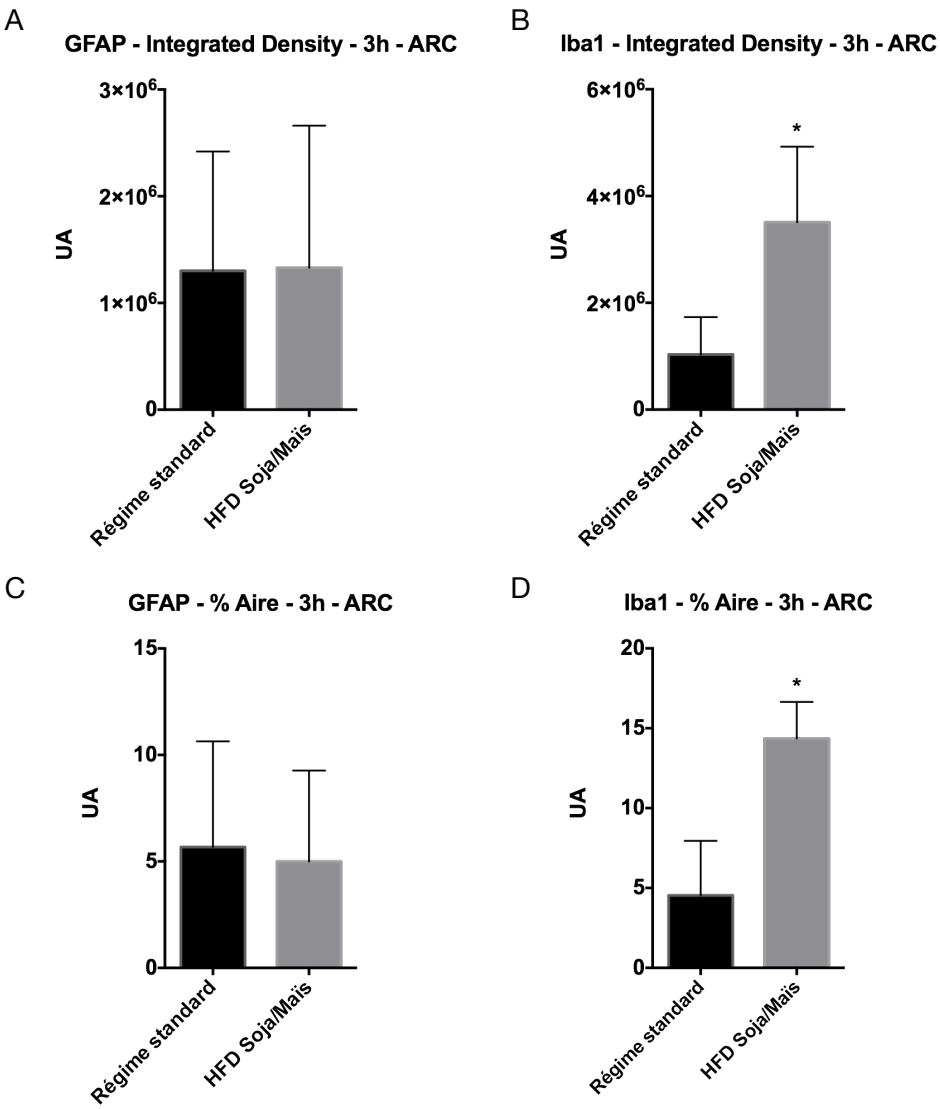


Figure 43. Analyse des marquages GFAP et Iba1 dans l'ARC après consommation du HFD Soja/Maïs pendant 3h
A-B Quantification de l'Integrated Density (densité intégrée de fluorescence) pour les marquages GFAP (A) et Iba1 (B) au niveau de l'ARC après 3h (n=9 pour le régime standard et n=6 pour le groupe HFD Soja/Maïs).
C-D Quantification du % d'aire marquée pour les marquages GFAP (C) et Iba1 (D) au niveau de l'ARC après 3h (n=9 pour le régime standard et n=6 pour le groupe HFD Soja/Maïs).
* $p<0,05$, régime standard vs HFD Soja/Maïs. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

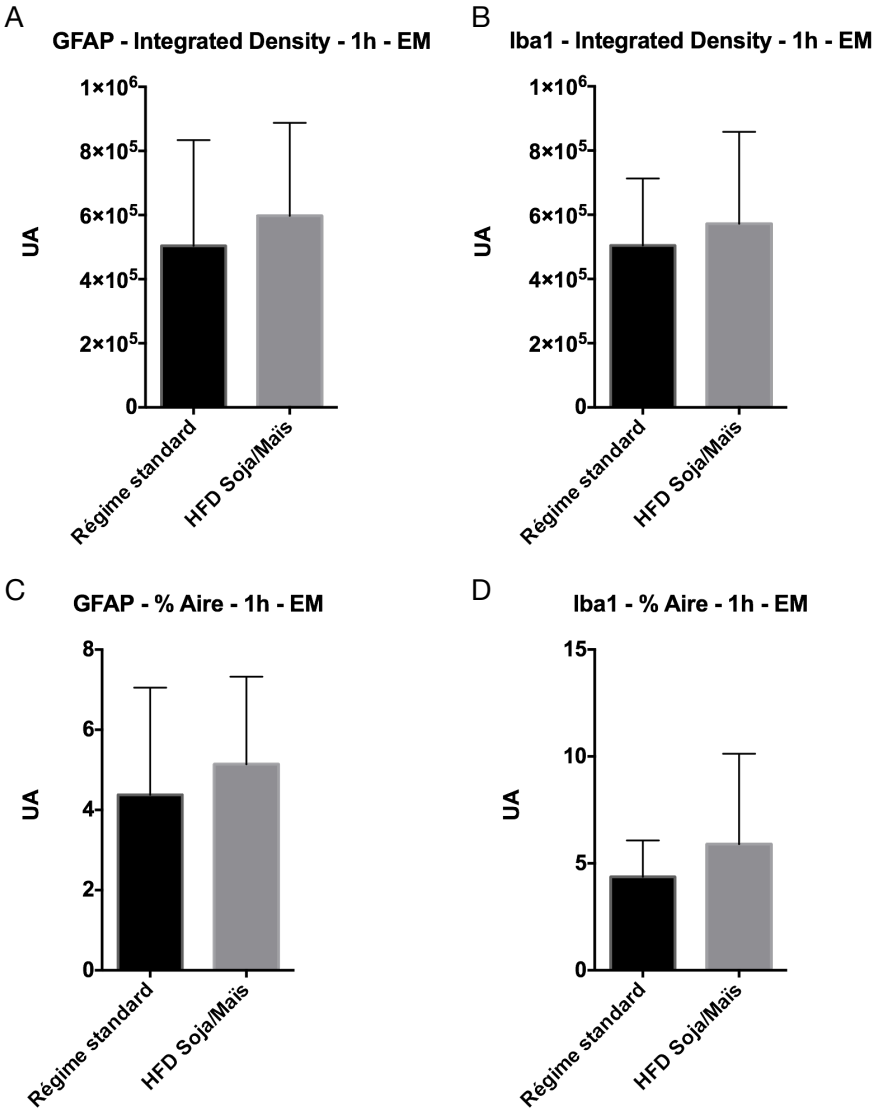


Figure 44. Analyse des marquages GFAP et Iba1 dans l'EM après consommation du HFD Soja/Maïs pendant 1h
A-B Quantification de l'Integrated Density (densité intégrée de fluorescence) pour les marquages GFAP (A) et Iba1 (B) au niveau de l'EM après 1h (n=9 pour le régime standard et n=6 pour le groupe HFD Soja/Maïs).
C-D Quantification du % d'aire marquée pour les marquages GFAP (C) et Iba1 (D) au niveau de l'EM après 1h (n=9 pour le régime standard et n=6 pour le groupe HFD Soja/Maïs).
Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

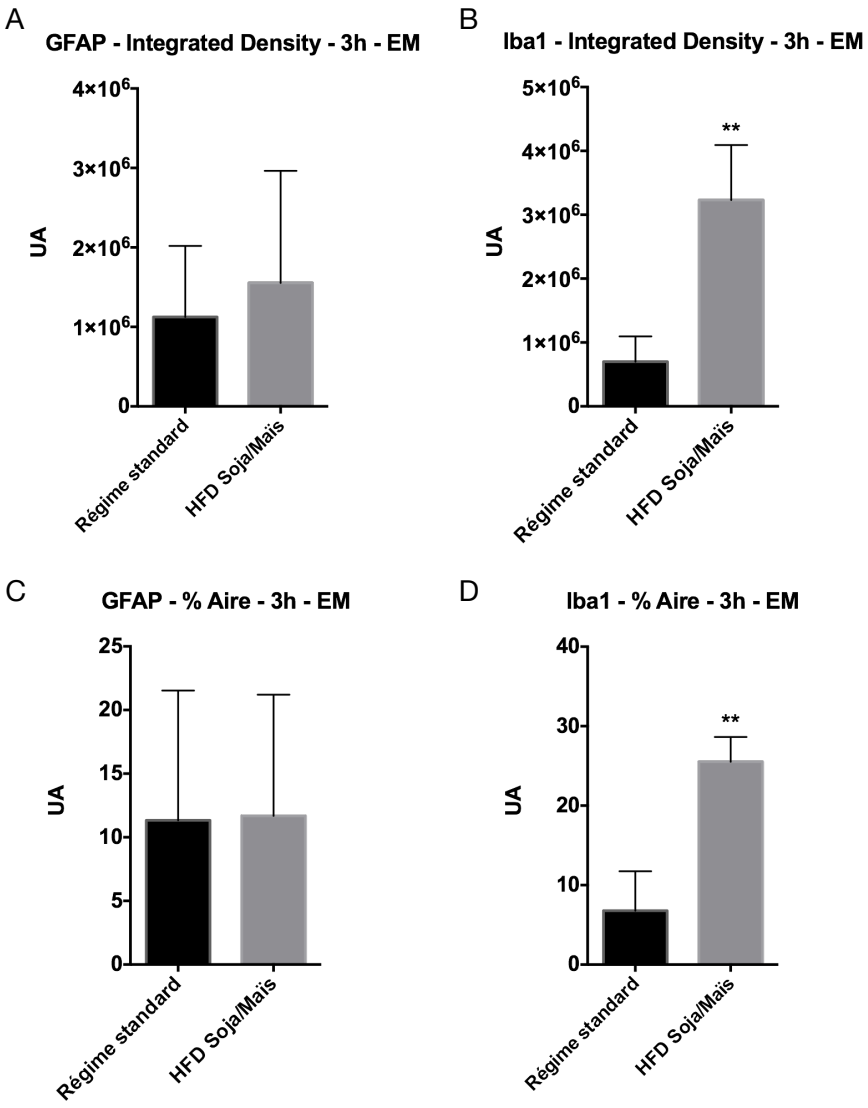


Figure 45. Analyse des marquages GFAP et Iba1 dans l'EM après consommation du HFD Soja/Maïs pendant 3h
A-B Quantification de l'Integrated Density (densité intégrée de fluorescence) pour les marquages GFAP (A) et Iba1 (B) au niveau de l'EM après 3h (n=9 pour le régime standard et n=6 pour le groupe HFD Soja/Maïs).
C-D Quantification du % d'aire marquée pour les marquages GFAP (C) et Iba1 (D) au niveau de l'EM après 3h (n=9 pour le régime standard et n=6 pour le groupe HFD Soja/Maïs).
** $p<0,01$, régime standard vs HFD Soja/Maïs. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.

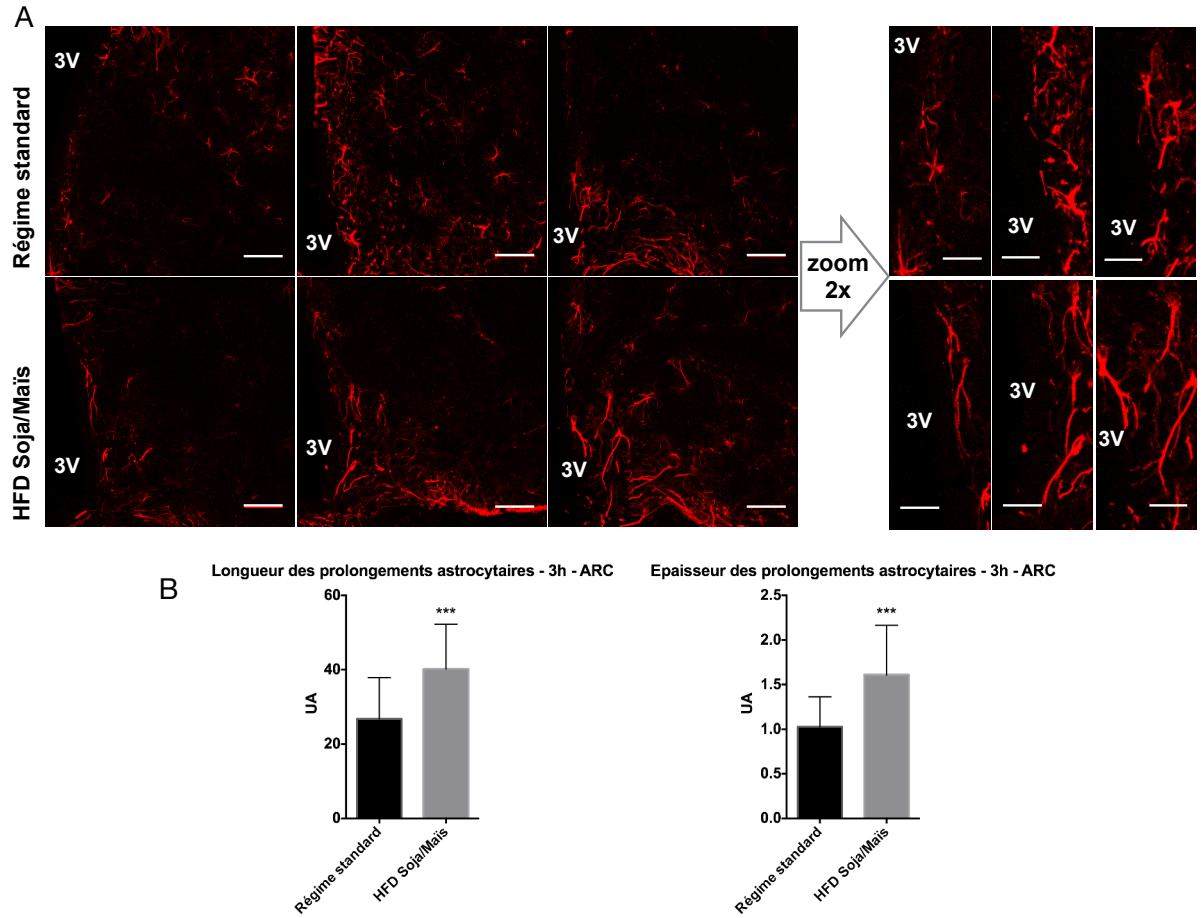


Figure 46. Etude de la morphologie des prolongements astrocytaires après 3h de consommation du HFD Soja/Maïs.
A Immunoréactivité de la GFAP dans l'ARC de souris ayant accès 3h au régime standard ou au HFD Soja/Maïs après privation de nourriture. Les prolongements astrocytaires paraissent plus allongés et plus épais dans le groupe HFD Soja/Maïs que dans le groupe contrôle. Barres d'échelle : 50 µm (panneaux gauches) ou 25 µm (zoom 2x, panneaux droits).
B Etude des caractéristiques morphologiques des prolongements astrocytaires (longueur et épaisseur) dans l'ARC de souris ayant accès 3h au régime standard ou au HFD Soja/Maïs après privation de nourriture (10 prolongements mesurés dans 15x2 ARC pour chaque groupe).
*** p<0,001, régime standard vs HFD Soja/Maïs. Données exprimées en tant que moyennes ± SEM.
3V, 3ème ventricule

4.4. Conclusion et Discussion

Nos résultats suggèrent que la consommation d'un HFD déclenche très rapidement une réponse inflammatoire de type gliose dans le MBH, ce qui a été observé à des temps plus tardifs par d'autres équipes (Berkseth et al., 2014; Thaler et al., 2012). Nous avons observé en effet une augmentation de l'intensité du marquage Iba1 spécifique de la microglie, ainsi qu'un allongement et un épaississement des prolongements astrocytaires. Il serait intéressant de déterminer les cibles potentielles de ces prolongements et nous sommes actuellement en train de mettre au point les co-marquages GFAP-POMC et GFAP-laminine (composant majeur de la lame basale, en faisant un marqueur de vaisseaux sanguins) comme premiers candidats putatifs.

Si l'activation microgliale se traduit davantage par un changement de morphologie vers une forme plus amyboïde, l'augmentation de signal Iba1 a été déjà décrite dans les cas d'activation microgliale. Cependant, afin d'affiner nos analyses, nous sommes en train de

développer une « macro » permettant l'étude de la morphologie des cellules microgliales, à l'image de celle développée par Kozlowski et ses collaborateurs (Kozlowski and Weimer, 2012) qui reconnaît les cellules microgliales et analyse notamment l'étalement des prolongements de la microglie qui est réduit avec son activation (figure 47).

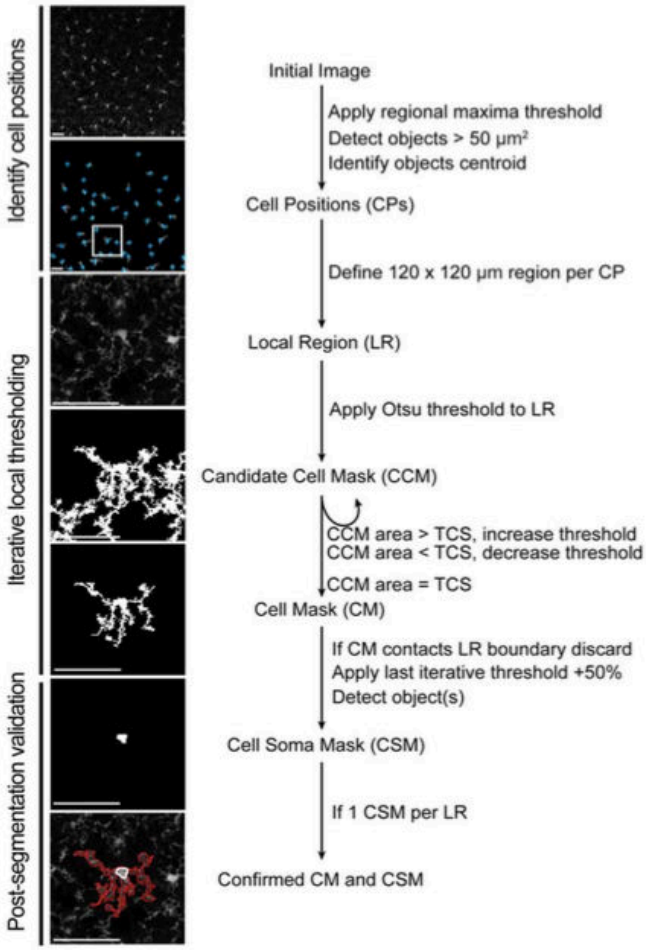


Figure 47. Stratégie de traitement d'image pour déterminer la forme d'une cellule microgliale (d'après Kozlowski et al., 2012). Les positions des cellules (CP, « cell positions », croix bleues) au sein d'une projection dans le Z (intensité maximale) sont identifiées à l'aide d'un algorithme identifiant les maxima locaux. Au sein d'une région locale de 120 x 120 µm (LR, « local region », carré blanc), centrée par CP, des masques de cellules (CM, « cell masks ») sont segmentés à travers un algorithme itératif de seuil local. Pour chaque CM, un masque de soma cellulaire (CSM, « cell soma mask ») est défini comme un objet dont les valeurs en pixels sont supérieures au dernier seuillage + 50% et dont l'aire est supérieure à 16,7µm². Un CM (contour rouge) et un CSM (contour blanc) sont considérés comme des représentations correctes d'une cellule si le CM ne touche pas les limites de la LR et s'il n'y a qu'un seul CSM. Les barres d'échelle représentent 50 µm.

Nos résultats illustrent potentiellement une réponse physiologique adaptative de l'organisme à une consommation excessive de lipides, supportant l'idée selon laquelle l'excès de certains nutriments est en effet à l'origine de l'inflammation hypothalamique. Afin d'approfondir cette hypothèse, nous envisageons de répéter ces expériences avec un régime contenant davantage de lipides, pour étudier si la réponse observée serait plus forte ou plus précoce éventuellement. Par ailleurs, compte-tenu de nos résultats sur l'impact de la nature des lipides sur l'inflammation hypothalamique à long-terme et sur le développement de l'obésité, nous envisageons de même à répéter ces expériences avec le régime HFD Colza par exemple.

CONCLUSION GÉNÉRALE

CC BY NC

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'implication de l'inflammation hypothalamique dans les dérégulations du poids corporel.

Les études menées au cours de ma thèse ont ainsi permis :

- d'identifier la voie de signalisation chimiokinergique CCL2/CCR2 comme intermédiaire de la perte de poids dans un modèle de neuroinflammation chez la souris induit par injection de LPS. Nos résultats suggèrent que la voie CCL2/CCR2 exercerait ses effets directement sur les neurones à MCH dans le LHA en inhibant leur activité et en bloquant la sécrétion du peptide orexigène MCH (figure 48). Cependant, l'attraction de monocytes et leur participation dans la perte de poids, et éventuellement une diminution de prise alimentaire, n'est pas à exclure.

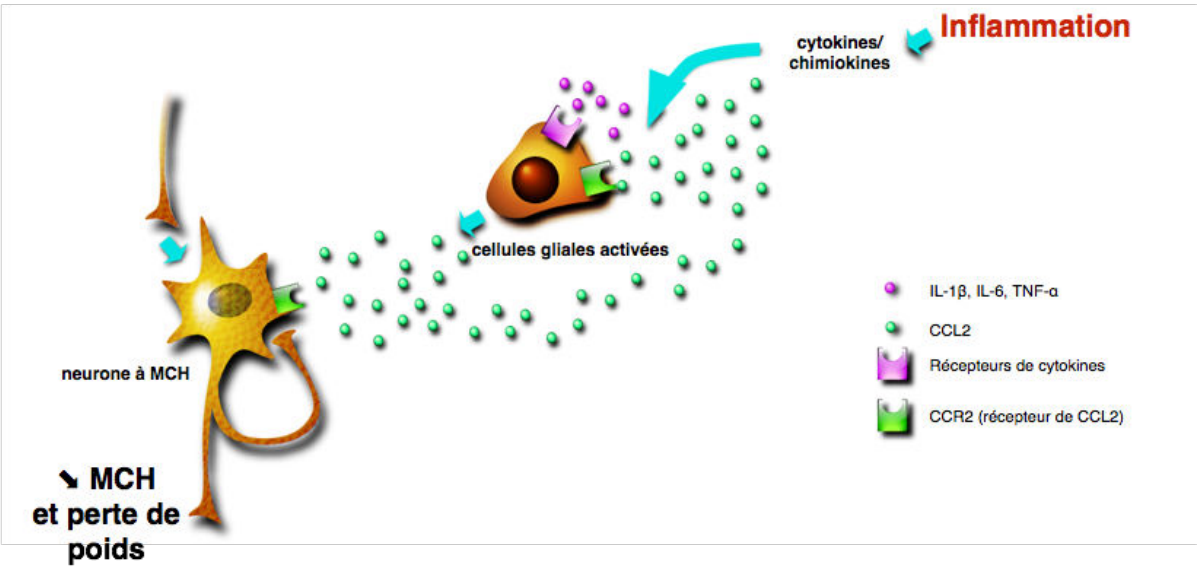


Figure 48. Mode d'action putatif de la voie de signalisation CCL2/CCR2 sur les neurones à MCH dans un modèle de perte de poids induite par une injection centrale de LPS. L'inflammation hypothalamique est caractérisée par la surexpression de médiateurs inflammatoires comme les cytokines et les chimiokines. Celles-ci peuvent se lier à leurs récepteurs exprimés par les cellules gliales. Ces dernières, alors activées, peuvent produire encore davantage de cytokines et chimiokines dont CCL2. Nos résultats suggèrent que CCL2 pourrait agir directement que les neurones à MCH dans le LHA par liaison à son récepteur exprimé par ces neurones. Ceci induirait la diminution de l'activité des neurones à MCH et la sécrétion de ce neuropeptide, ce qui est accompagné par une perte de poids.

- d'identifier la chimiokine CCL5 comme jouant un rôle dans la prise de poids, une caractéristique de l'obésité, en agissant notamment sur les neurones à MCH dans le LHA. En effet, dans un modèle d'injection centrale et aiguë de CCL5, nous avons pu observer une prise de poids des souris, ainsi que l'augmentation de l'expression protéique et génique du peptide orexigène MCH. CCL5 induirait la sécrétion de glutamate, majoritairement par les cellules gliales, mais aussi par les neurones, ce qui pourrait expliquer la dépolarisation des neurones à MCH induite par l'application de CCL5 (figure 49). Cependant, l'action exacte de CCL5 sur les neurones à MCH reste à clarifier.

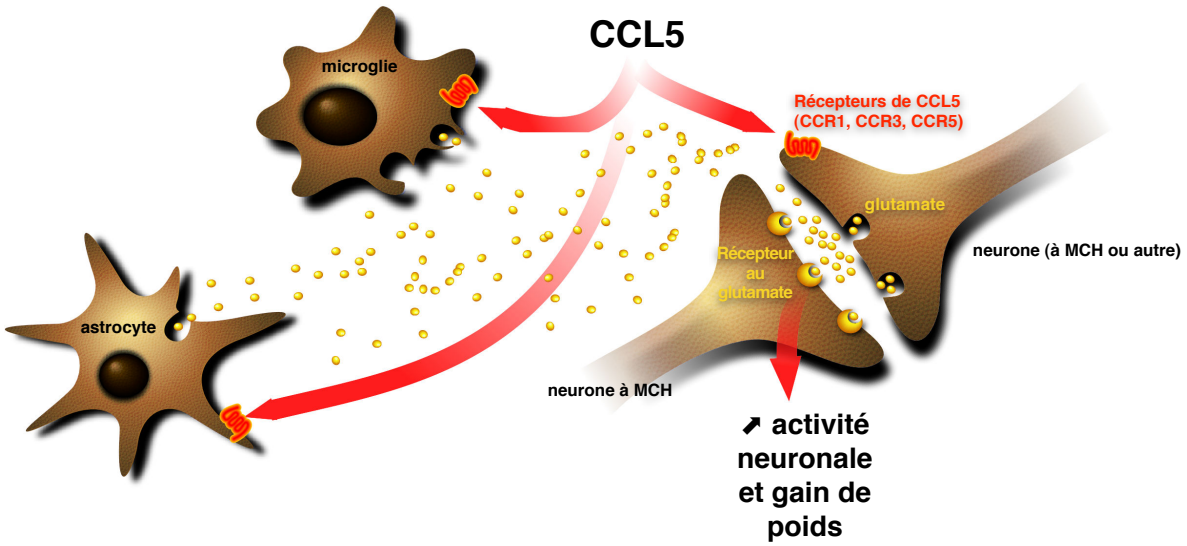


Figure 49. Mode d'action putatif de la chimiokine CCL5 dans la prise de poids par action sur les neurones à MCH. La chimiokine CCL5 surexprimée lors d'une inflammation hypothalamique pourrait d'une part, en se liant à ses récepteurs exprimés par les cellules gliales, induire une sécrétion de glutamate. Celle-ci stimulerait alors l'activité des neurones à MCH. D'autre part CCL5 pourrait se lier sur des récepteurs exprimés par des neurones, à MCH ou autres, qui eux aussi libèreraient du glutamate pour favoriser l'activité des neurones à MCH et induire à terme un gain de poids.

- de déterminer que la nature des lipides ingérés en excès peut influencer le développement d'une obésité nutritionnelle (dans le temps et dans l'intensité). Notamment, diminuer le rapport AGPI oméga-6/oméga-3 permettrait de ralentir le développement de l'obésité.
- d'identifier des réponses précoces dans le MBH à la consommation d'un régime hyperlipidique. En effet, après quelques heures seulement, apparaît dans le MBH un « remodelage » glial s'apparentant à une gliose, une réaction de type inflammatoire.

Ainsi, nos résultats ont montré que l'inflammation hypothalamique, en fonction de son intensité, peut être associée à la fois à une perte de poids involontaire mais aussi à une prise de poids excessive induite par la consommation d'un régime hyperlipidique.

Concernant ce dernier point, la réciproque semble aussi vraie, puisque la consommation d'un régime hyperlipidique impacte rapidement l'hypothalamus. De ce fait, le « remodelage » glial précoce que nous avons observé soulève la question suivante : dans le cadre de la consommation ponctuelle de régimes apportant certains nutriments en excès, comme ici les lipides, l'inflammation hypothalamique ne représente-t-elle pas une réponse naturelle de « défense » transitoire ?

Cependant, si cette consommation excessive était maintenue, ces adaptations cellulaires sous-tendues à l'inflammation hypothalamique seraient à l'origine du développement de

l'obésité (Wisse et Schwartz, 2009). Nos résultats soutiennent ce courant de pensée actuel (figure 50).

En effet, si la consommation d'un régime hyperlipidique déclenche précocement une réponse de type inflammatoire dans l'hypothalamus, il est tentant de proposer qu'une consommation prolongée, voire chronique, de lipides en excès entraîne elle, dans une forme de continuité, une réponse inflammatoire « complète » avec production locale accrue de médiateurs inflammatoires notamment. Parmi les médiateurs inflammatoires surexprimés, la chimiokine CCL5 serait capable de favoriser l'activité des neurones produisant le peptide orexigène MCH, participant ainsi à la prise de poids caractéristique de l'obésité, possiblement par augmentation de la prise alimentaire, un des paramètres qu'il reste à étudier (figure 50).

Par ailleurs, les résultats obtenus au cours de ma thèse soulignent l'importance de la nature des lipides ingérés en excès dans l'apparition et le développement de l'obésité. Notamment, nous avons voulu tester l'influence du rapport AGPI oméga-6/oméga-3 sur l'apparition de l'obésité compte-tenu des propriétés anti-inflammatoires démontrées auparavant pour les AGPI de type oméga-3. Ces résultats ont montré que le rapport oméga-6/oméga-3 contenu dans un régime hyperlipidique influence le moment d'apparition des premiers signes d'obésité (croissance pondérale, inflammation, surexpression de peptides orexigènes…) : la diminution de ce rapport (c'est-à-dire favoriser les oméga-3 par rapport aux oméga-6) permettrait de ralentir l'apparition de l'obésité et vice-versa (figure 50).

Ainsi, l'inflammation hypothalamique, réponse précoce, quasi immédiate, à l'ingestion de lipides, pourrait devenir chronique et pathologique en cas de consommation prolongée de lipides de manière excessive : en effet, il y a alors une production accrue, même si modérée (inflammation de bas-grade), de médiateurs inflammatoires dans l'hypothalamus, dont la chimiokine CCL5. Or, cela est concomitant avec des variations inadaptées d'expression de peptides orexigènes tels que l'OX et la MCH et nos résultats suggèrent par exemple un rôle de CCL5 plus ou moins direct induisant la suractivation du système orexigène à MCH dans le LHA qui pourrait expliquer au moins partiellement la prise de poids que CCL5 induit chez la souris après injection. De manière intéressante, le type de lipides ingérés en excès module la fenêtre temporelle d'apparition de l'inflammation hypothalamique (et périphérique) ainsi que la prise de poids. Par ailleurs, plus tardivement encore, quand l'obésité est installée, il est envisageable que les médiateurs inflammatoires produits en périphérie, caractéristiques de l'obésité, puissent aussi atteindre l'hypothalamus, pour

participer à la dérégulation des circuits neuropeptidergiques régulant le comportement alimentaire et le poids corporel.

Dans le contexte de perte de poids induit par une inflammation hypothalamique de haut-grade (ici induite par une infection bactérienne), nous avons pu identifier la voie de signalisation CCL2/CCR2 comme un acteur majeur de cette perte de poids, par inhibition directe de l'activité des neurones à MCH du LHA qui expriment le CCR2 (figure 50).

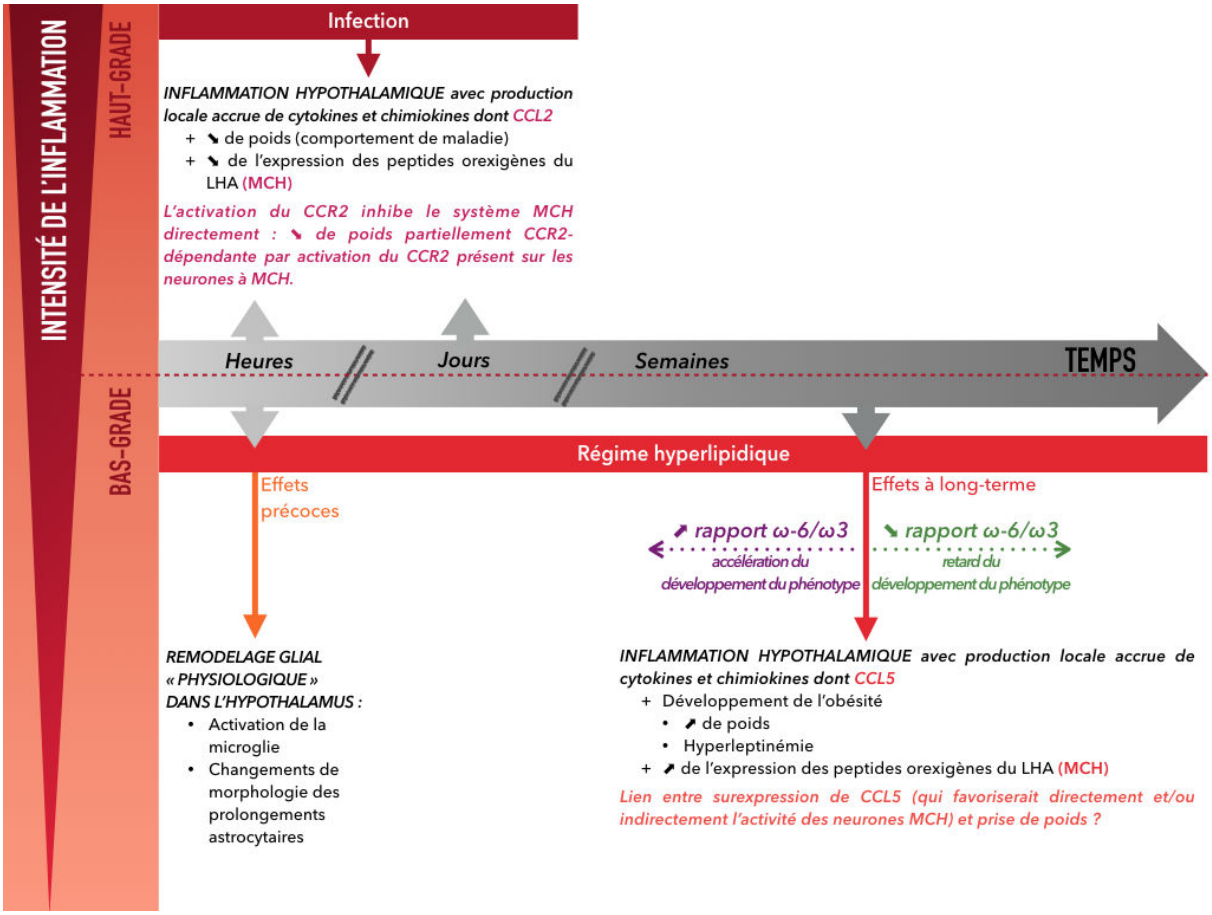


Figure 50. Schéma récapitulatif : Liens entre inflammation hypothalamique, nutriments et dérégulations de poids. *En haut :* lors d'une inflammation hypothalamique de haut-grade induite par le LPS, il y a production locale accrue de cytokines et chimiokines dont la chimiokine CCL2 de manière aiguë (de quelques heures à quelques jours) qui est associée à une perte de poids (une manifestation du comportement de maladie associé à une infection de forte intensité). Nous avons montré que cette perte de poids est partiellement dépendante de la voie de signalisation CCL2/CCR2, par inhibition directe des neurones du LHA produisant le peptide orexigénique MCH. *En bas :* La consommation d'un régime hyperlipidique induit dès quelques heures, dans le MBH, une réponse de type inflammatoire, rappelant une gliose, avec activation probable de la microglie, ainsi que des changements morphologique des prolongements astrocytaires (épaississement et allongement). Lorsque cette consommation excessive de lipides est prolongée dans le temps (plusieurs semaines), il y a inflammation hypothalamique chronique de bas-grade qui est associée au développement de l'obésité ainsi qu'à une surexpression de neuropeptides orexgènes comme la MCH. Par ailleurs, nous avons montré que la chimiokine CCL5, dont l'expression est augmentée par une consommation excessive et prolongée de lipides, pourrait participer à la prise de poids induite par l'inflammation hypothalamique en activant le système MCH du LHA.

Il ressort de ces résultats que les chimiokines, médiateurs inflammatoires décrits tout d'abord pour leurs propriétés chimioattractrices de cellules immunitaires en conditions

inflammatoires, mais qui ont depuis été montrées comme constitutivement exprimées dans le cerveau, et ce même en conditions physiologiques, puissent déréguler l'activité de certains neurones hypothalamiques, et donc l'homéostasie énergétique, lorsqu'elles sont surexprimées lors d'une inflammation. Cependant, nos résultats associés à ceux de la littérature, suggèrent que les chimiokines CCL2 et CCL5 pourraient moduler le système MCH dans l'hypothalamus aussi en conditions physiologiques et participer ainsi à la régulation du comportement alimentaire, à l'image de la chimiokine CXCL12 agissant sur les neurones à AVP et participant de ce fait à la régulation du métabolisme hydrique (Callewaere et al., 2006).

Pour conclure, les résultats obtenus au cours de ma thèse sont une nouvelle démonstration de l'importance de l'effet de l'inflammation sur le fonctionnement des systèmes neuropeptidergiques hypothalamiques qui régulent comportement alimentaire et maintien du poids corporel. Cependant, nos résultats sont la première démonstration de l'influence de chimiokines sur le poids, par modulation de neurones hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique mais aussi d'une réaction de type inflammatoire très précoce, en réponse à une ingestion excessive de lipides, comme à l'échelle d'un repas.

L'implication de chimiokines dans la régulation physiologique de l'homéostasie énergétique, notamment du poids corporel, ainsi que la susceptibilité à l'inflammation de l'hypothalamus, aire cérébrale clé de cette régulation, en particulier par une simple consommation excessive de certains nutriments, pourrait expliquer la difficulté à maintenir son poids sur la durée, et encore davantage à lutter contre l'obésité une fois installée.

De ce fait, nos résultats mettent en lumière de nouveaux éléments, qui peuvent préciser le lien entre inflammation hypothalamique et dérégulations du poids corporel, et qui permettront peut-être à terme de développer de nouvelles thérapies pharmacologiques plus efficaces et plus appropriées que celles proposées jusqu'à aujourd'hui en ciblant les chimiokines cérébrales. De plus, dans le contexte de l'obésité, nos résultats confirment l'importance du type de nutriments ingérés, et soulignent une nouvelle fois le potentiel de certains lipides à préserver l'organisme du développement de certaines pathologies, a fortiori celles d'origine nutritionnelle.

PERSPECTIVES

CC BY NC

Les dérégulations de la balance énergétique, et surtout du poids peuvent paraître un problème marginal, notamment l'obésité qui est souvent perçue comme un problème issu d'un manque de volonté des sujets obèses à adopter un mode de vie plus sain, à la fois au niveau de l'alimentation et au niveau de leur activité physique. L'obésité, un mal de la société de consommation actuelle, où l'Homme est simplement victime de sa gourmandise et de son incapacité à résister devant l'opulence ? Il est certain que le modèle ultra-consumériste que la société occidentale a adopté, et qui se propage peu à peu dans des pays dits « en voie de développement », fait partie du « problème ». Le changement de mode de vie vers la consommation quasi compulsive, puisqu'aisée, d'aliments transformés industriellement où les teneurs en glucides et lipides sont souvent inutilement élevées, ajoutée à une sédentarisation des individus, entraîne forcément des déséquilibres vers une balance énergétique positive. Or, l'Homme a-t-il eu l'opportunité d'évoluer et de réduire sa propension à stocker au maximum l'énergie en prévision de période de famine et/ou de disette ? (Teaford and Ungar, 2000)

Si l'idée que maigrir n'est qu'une question de volonté perdure dans l'esprit collectif, la communauté scientifique a su démontrer notamment que certaines mutations génétiques, certes rares, touchant par exemple le gène de la leptine ou de son récepteur (Montague et al., 1997 ; Clément et al., 1998 ; DiBaise et al., 2012) peuvent induire chez l'Homme une obésité se développant précocement. De fait, même si, ou plutôt, parce qu'elles impactent le circuit de récompense dopaminergique mésolimbique, ces mutations compliquent la notion de volonté dans ce contexte.

Par ailleurs, les thérapies pharmacologiques proposées jusqu'alors pour lutter contre l'obésité nutritionnelle notamment, se sont montrées inefficaces et/ou ayant des effets secondaires néfastes. A l'heure actuelle, seule la chirurgie bariatrique semble, pouvoir être une « thérapie » efficace. Cependant, il s'agit d'un traitement lourd et définitif (sauf pour l'anneau gastrique) et qui n'est réservé qu'à une portion restreinte des sujets obèses, qui atteignent le seuil normalement redouté de l'obésité morbide. Cependant, ces dispositions légales peuvent entraîner des sujets, atteints d'une obésité plus modérée, à gagner davantage de poids afin de remplir les critères nécessaires à ces opérations de la « dernière chance ». En effet, n'oublions pas de rappeler qu'évidemment, l'obésité n'est pas un problème « esthétique » mais bien un réel problème de santé aux terribles complications médicales et qui peut mener à un mort précoce.

Que faire ? Continuer d'étudier les mécanismes de mise en place, de développement, de maintien d'obésité et comment elle entraîne de telles complications médicales. Evidemment, de nombreuses études se sont intéressées à l'obésité et nos connaissances sont déjà larges. Nous savons par exemple l'importance de la déficience de la signalisation de la leptine dans le développement de l'obésité, ou encore le lien entre inflammation et obésité. Cependant, historiquement, ce lien entre réponses inflammatoires et métaboliques dans l'obésité a surtout été étudié en périphérie. En effet, si nous connaissions l'importance de régulation centrale de l'homéostasie énergétique et du comportement alimentaire, et si, il y a une dizaine d'années, de Souza et ses collaborateurs ont démontré un lien entre obésité nutritionnelle, inflammation hypothalamique et la participation de cette dernière dans la résistance à l'insuline, ce n'est que relativement récemment qu'il a été montré que bloquer l'inflammation centrale inhibe le développement de l'obésité ainsi que nombre de ces conséquences métaboliques, notamment au niveau de la résistance à la leptine et du métabolisme glucidique. La neuroinflammation, notamment au niveau de l'hypothalamus, serait ainsi centrale dans la mise en place et le développement de l'obésité. Si ce fait est plus ou moins reconnu aujourd'hui, les acteurs et mécanismes liant consommation excessive de certains nutriments (en particulier les lipides), neuroinflammation et développement de l'obésité, restent à éclaircir davantage encore.

Dans ce contexte, nos résultats identifient de manière intéressante, et pour la première fois, un médiateur inflammatoire, la chimiokine CCL5, comme un possible intermédiaire entre inflammation et dérégulation des systèmes neuropeptidergiques hypothalamiques régulant l'homéostasie énergétique aboutissant à une prise de poids et au développement de l'obésité. Il reste maintenant à en préciser les mécanismes exacts. Par exemple, il est intéressant de noter que la chimiokine CCL5, d'après les connaissances actuelles, peut se lier à trois récepteurs différents. Or, nous n'avons pas déterminé quel(s) récepteur(s) étai(en)t impliqué(s) dans les effets que cette chimiokine exerce sur les neurones à MCH.

Compte-tenu des découvertes liant inflammation hypothalamique et obésité faites au cours des dix dernières années, une idée pour lutter contre l'obésité nous vient de manière sûrement trop simpliste : inhiber la réponse inflammatoire dans l'hypothalamus. Par exemple, pourrions-nous proposer la voie de signalisation de CCL5 dans l'hypothalamus comme cible thérapeutique potentielle dans la lutte contre l'obésité ? De par la redondance du système chimiokinergique, et globalement, l'immense complexité des voies engagées dans le contrôle central de l'homéostasie énergétique mais aussi dans sa dérégulation, il est difficilement envisageable que cibler seulement la voie CCL5 serait suffisant. Par ailleurs,

inhiber généralement la voie CCL5 de manière chronique poserait probablement problème notamment de par les autres rôles dans le cerveau et à la périphérie joués par les chimiokines. Cependant, ces restrictions et doutes s'appliquent tout autant à d'autres des acteurs qui ont été identifiés ou qui le seront à l'avenir : peut-on se permettre d'inhiber les voies de l'inflammation aussi de manière chronique ? Si oui, quels acteurs inflammatoires pourrait-on se permettre de cibler ? Cibler un seul des acteurs suffirait-il ? Pour de nombreuses raisons techniques et tout simplement « biologiques », la réponse n'est pas encore trouvée. Cependant, cibler plusieurs acteurs à la fois, et ce de manière très spécifique en terme de temps et d'espace, constituerait une approche intéressante. Il reste donc à étudier, approfondir nos conséquences et tester.

Dans le contexte presque totalement opposé, liant inflammation hypothalamique de haut-grade et perte de poids, nous avons identifié un rôle pour les ligands du récepteur CCR2, dont la chimiokine CCL2, par inhibition directe de l'activité des neurones à MCH. Ici, d'un point de vue temporel, l'inhibition de la voie CCR2 pour lutter contre une perte de poids involontaire excessive consécutive à une pathologie primaire est envisageable.

Si l'on revient au problème de l'obésité, il est aussi évident, que si la surconsommation de certains nutriments est responsable de l'inflammation hypothalamique elle-même à l'origine du développement de l'obésité, il reste indispensable et comme solution la plus efficace à l'heure actuelle, et oserais-je dire la plus saine, de changer de mode de vie pour un mode de vie justement plus sain. De ce point de vue, et comme nous connaissons la difficulté à changer ses habitudes alimentaires, notamment une fois que la valeur de récompense de certains aliments a été trop bien apprise, il est intéressant de savoir par exemple que certains lipides permettent, par rapport à d'autres, de lutter contre l'obésité. Notamment, il a été montré que changer de régime hyperlipidique pour un régime hyperlipidique favorisant les oméga-3 permet de réduire un phénotype d'obésité installée, et nos résultats montrent aussi que favoriser les oméga-3 retarde l'apparition de l'obésité chez la souris. Ceci laisse entrevoir un espoir, pour les obèses adultes mais aussi pour les enfants qui pourraient devenir obèses, l'obésité infantile étant un problème croissant. En effet, sans radicalement changer les modes de cuisson et les assaisonnements en termes de quantités, donc avec une transition « douce », jouer sur la nature des nutriments ingérés pourrait aider dans la lutte contre l'obésité.

Ainsi, il me paraît essentiel de débloquer des fonds publics pour la recherche fondamentale afin d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes liant régime, inflammation

hypothalamique et obésité afin d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour, à terme, pouvoir élaborer des médicaments les plus adaptés et les plus ciblés possibles (surtout connaissant la difficulté à « guérir » de l'obésité une fois qu'elle est installée), ainsi que de véhiculer avec plus de pédagogie, des messages insistant sur l'importance d'une alimentation à plus forte valeur qualitative.

ANNEXES

CC BY NC

1. Publications dans revues à comité de lecture

1.1. Articles collaboratifs

Au cours de ma thèse, j'ai participé à plusieurs projets dont deux avec l'équipe de recherche co-dirigée par le Dr Philippe Gual et le Dr Albert Tran (Equipe 8 « Complications hépatiques de l'obésité », Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Inserm U1065, Nice) qui ont fait l'objet de publications :

- le premier, « Effects of sleeve gastrectomy in high-fat diet-induced obese mice: respective role of reduced caloric intake, white adipose tissue inflammation and changes in adipose tissue and ectopic fat depots », par Schneck et al., publié en 2014 dans Surgical endoscopy (Schneck et al., 2014) ;
- et le second, « ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death », par Lebeaupin et al., publié en 2015 dans Cell Death and Disease (Lebeaupin et al., 2015).

1.1.1. « Effects of sleeve gastrectomy in high-fat diet-induced obese mice: respective role of reduced caloric intake, white adipose tissue inflammation and changes in adipose tissue and ectopic fat depots » (Schneck et al., 2014)

Cette étude visait à déterminer, dans un modèle murin d'obésité nutritionnelle, les effets d'un type particulier de chirurgie bariatrique visant à traiter des formes morbides d'obésité, la gastrectomie longitudinale ou « sleeve » gastrectomie (GL), qui consiste à l'ablation des deux tiers gauches de l'estomac.

En effet, la SG est une des chirurgies bariatriques les plus pratiquées mais les mécanismes sous-jacents à la perte de poids et aux améliorations métaboliques qui lui sont associées n'ont pas encore été totalement expliquées.

De ce fait, plusieurs paramètres ont été examinés chez des souris rendues obèses par la consommation d'un HFD après SG : le poids, les dépôts de TA, la tolérance au glucose et la stéatose hépatique.

Après chirurgie, la prise alimentaire des souris du groupe SG est transitoirement réduite par rapport aux groupes contrôles « sham » avec accès *ad libitum* à la nourriture et l'eau (SALF) et « sham pair-fed » (SPF) ayant accès seulement à la même quantité de nourriture et d'eau que le groupe SG. Cette différence disparaît 2 semaines après chirurgie, ce qui est cohérent avec l'absence de différence significative des niveaux d'expression génique des peptides hypothalamiques NPY, AgRP et POMC. Cependant, à ce temps, le poids des souris continue d'être significativement inférieur à celui des souris contrôles, et les niveaux

sériques de ghréline acylée, à jeun, des souris SG étaient significativement diminués chez les souris SG par rapport aux souris PFS 3 semaines après l'opération.

Par ailleurs, bien qu'elles soient toujours nourries avec un HFD, les souris du groupe SG ont aussi une amélioration de leur tolérance au glucose et une diminution de la stéatose hépatique. De plus, les souris SG montrent une diminution du poids du pancréas et du poids du TA blanc et au contraire une augmentation du poids du TA brun, par rapport au poids de l'animal. De plus, davantage de cellules T régulatrices anti-inflammatoires et moins de cellules T activées pro-inflammatoires infiltrent le TA épididymal des souris SG par rapport aux contrôles. Pour la plupart de ces paramètres étudiés, les souris PFS montraient un phénotype intermédiaire entre groupes SG et SALF.

En conclusion, il apparaît que les effets de la SG ne puissent pas tous être expliqués par la seule restriction calorique, et qu'ils doivent donc engager d'autres processus. Il est possible que la diminution de l'inflammation dans le TA blanc, le développement du TA brun et la régression du TA blanc soient des mécanismes potentiellement impliqués dans les effets de la SG non-associés à la diminution de la prise alimentaire.

Surg Endosc (2014) 28:592–602
DOI 10.1007/s00464-013-3211-1

Effects of sleeve gastrectomy in high fat diet-induced obese mice: respective role of reduced caloric intake, white adipose tissue inflammation and changes in adipose tissue and ectopic fat depots

Anne-Sophie Schneck · Antonio Iannelli · Stéphanie Patouraux · Déborah Rousseau · Stéphanie Bonnafous · Beatrice Bailly-Maitre · Ophélia Le Thuc · Carole Rovere · Patricia Panaia-Ferrari · Rodolphe Anty · Albert Tran · Philippe Gual · Jean Gugenheim

Received: 10 June 2013 / Accepted: 30 August 2013 / Published online: 3 October 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract
Background Sleeve gastrectomy (SG) has become a popular bariatric procedure. The mechanisms responsible for weight loss and improvement of metabolic disturbances have still not been completely elucidated. We investigated the effect of SG on body weight, adipose tissue depots, glucose tolerance, and liver steatosis independent of reduced caloric intake in high-fat-diet-induced obese mice.
Methods C57BI/6 J mice fed a high fat diet (45 %) for 33 weeks were divided into three groups: sleeve gastrectomy (SG, 13 mice), sham-operated ad libitum fed (SALF, 13 mice) and sham-operated pair fed (PFS, 13 mice). The animals were humanely killed 23 days after surgery.
Results In SG mice, food intake was reduced transiently, but weight loss was significant and persistent compared to controls (SG vs. PFS, $P < 0.05$; PFS vs. SALF, $P < 0.05$). SG mice showed improved glucose tolerance and lower levels of liver steatosis compared with controls (area under the curve, SG vs. PFS, $P < 0.01$; PFS vs. SALF, $P < 0.05$) (liver steatosis, SG vs. PFS, $P < 0.05$; PFS vs. SALF, $P < 0.01$). This was associated with a decrease in the ratios of the weight of pancreas, epididymal and inguinal adipose tissues to body weight, and an increase in the ratio of brown adipose tissue weight to body weight. Epididymal adipose tissue was also infiltrated by fewer activated T cells and by more anti-inflammatory regulatory T cells. Serum levels of fasting acyl ghrelin were still significantly decreased 3 weeks after surgery in SG mice compared to PFS mice ($P < 0.05$).
Conclusions Reduced white adipose tissue inflammation, modification of adipose tissue development (brown vs. white adipose tissue), and ectopic fat are potential

Anne-Sophie Schneck and Antonio Iannelli have contributed equally to this article.

A.-S. Schneck (✉) · A. Iannelli · R. Anty · A. Tran · P. Gual · J. Gugenheim
Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital de l'Archet, Pôle Digestif, Nice, France
e-mail: escargot2@yahoo.com

A. Iannelli
e-mail: antonio_iannelli@hotmail.com

A.-S. Schneck · A. Iannelli · S. Patouraux · D. Rousseau · S. Bonnafous · B. Bailly-Maitre · O. Le Thuc · C. Rovere · R. Anty · A. Tran · P. Gual · J. Gugenheim
Faculté de Médecine, Université de Nice Sophia Antipolis, Nice, France

A.-S. Schneck · A. Iannelli · S. Patouraux · D. Rousseau · S. Bonnafous · B. Bailly-Maitre · R. Anty · A. Tran · P. Gual · J. Gugenheim
Equipe 8 « Complications hépatiques de l'obésité», INSERM, U1065, Nice, France

S. Patouraux · P. Panaia-Ferrari
Département de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Hôpital de l'Archet, Nice, France

O. Le Thuc · C. Rovere
Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, UMR6097, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Valbonne, France

mechanisms that may account for the reduced caloric intake independent effects of SG.

Keywords Bariatric surgery · Glucose tolerance · Morbid obesity · Sleeve gastrectomy · Weight loss

Sleeve gastrectomy (SG), first reported as the restrictive part of the biliopancreatic diversion with duodenal switch [1], rapidly gained wide consensus in the bariatric surgical community because of its straightforward surgical technique. It preserves the pylorus and lacks intestinal bypass, which makes the upper digestive tract accessible to endoscopic exploration [2]. Furthermore, the weight loss obtained with SG has been shown to be comparable to that reported for Roux-en-Y gastric bypass, not only in the short term but also beyond 5 years [3]. This has made SG a legitimate stand-alone bariatric procedure [3].

SG consists of vertical gastrectomy over an intraluminal calibration bougie that reduces by about 80 % the capacity of the stomach and results in a dramatic reduction in food intake. However, it has been shown that SG is associated with a decrease in the circulating levels of fasting ghrelin, the orexigenic hormone mainly secreted by the gastric fundus mucosa [4], and postprandial intestinal peptides such as glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY), which influence appetite and food intake [5]. The reported short-term results for SG and Roux-en-Y gastric bypass suggest a comparable effect on type 2 diabetes [6, 7]. Furthermore, although the metabolic effects of SG can be at least partly explained by a reduction in the fat mass occurring after surgery, other mechanisms may be responsible for improvement in glucose tolerance, such as a decrease in the low-grade systemic inflammatory state linked to obesity [8]. Taken together, these results indicate that the mechanisms leading to the loss of weight and metabolic changes that follow SG cannot be explained solely by the reduced caloric intake induced by a reduction in the gastric capacity.

We tested the hypothesis that reduced caloric intake alone is not sufficient to account for the effects of SG on body weight, glucose tolerance, and liver steatosis in high fat diet (HFD)-induced obese mice. We also investigated the role of inflammation of adipose tissue on metabolic disturbances linked to obesity.

Materials and methods

Animals and study design

Two-month-old male C57BL/6 J mice (Janvier) acclimated to our animal facilities under a 12/12-h light/dark cycle at a temperature of 21 ± 2 °C were fed ad libitum a HFD (45 kcal % fat, 35 kcal % carbohydrate, 20 kcal % protein) (D12451; Research Diets) and a fructose sweetened beverage (3 %) for 32 weeks. At 40 weeks of age, mice underwent the surgical procedures as described below. All experiments were performed according to the institutional guidelines for the care and use of laboratory animals under a license issued by the local ethical committee. Mice were assigned to one of three groups. Group 1 ($n = 13$) consisted of sham-operated, ad libitum-fed mice (SALF). In this group, mice had a laparotomy only with ad libitum access to food and water after surgery. Group 2 ($n = 13$) consisted of mice that had the SG. These mice also had ad libitum access to food and water after surgery. The group 3 mice ($n = 13$) were sham-operated pair-fed (PFS) mice. These mice had a laparotomy only with access to the same amount of food as their counterparts in group 2. Before surgery, mice were deprived of food for 8 h. Mice were fed the same HFD after surgery for the duration of the study.

Operative technique

Anesthesia was induced and maintained throughout the procedure with intraperitoneal injection of ketamine (150 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg). Preoperatively, 20 mg/kg ceftriaxone (Sandoz) was administered, and 6 mg/ml paracetamol (Macopharma) was added to the drinking water after surgery. Mice were placed on a heating pad to avoid hypothermia, and the abdomen was disinfected before a 2-cm midline laparotomy was performed. The model for SG in mice has been previously validated in other studies [9, 10]. Our model is a modified version of what has previously been reported. The mouse stomach contains two well-defined areas, a nonglandular forestomach and a glandular stomach that is connected to the duodenum. Ghrelin is produced in the distal glandular stomach. The forestomach was resected first, and the glandular stomach was then closed with a 6-0 polypropylene (Prolene; Ethicon Inc.) running suture. To complete the SG to the glandular stomach, a metallic clip (Premium Surgiclip II; Covidien Surgical) was placed on the glandular stomach parallel to the lesser curvature (midway between the lesser and greater curvature), and a vertical gastrectomy was performed along the clip that was used to guide a 6-0 polypropylene running suture. The abdominal wall was closed with Monocryl 4-0 (Ethicon Inc.) (continuous suturing). The skin was closed with Monocryl 3-0 (Ethicon Inc.) (intracutaneous continuous suturing). In the sham-treated groups (SALF and PFS), the stomach was mobilized, and the time of surgery was then extended for the same duration required to perform the SG to mimic surgery-related stress and trauma. After surgery, animals

were housed individually and subcutaneous fluids (1 ml of NaCl 0.9 %; Laboratoire Aguettant) were administered for the first postoperative day. Animals were given free access to a fructose-sweetened beverage 6 h after surgery and a HFD the day after surgery. Two days after surgery, the animals were housed five per cage.

Food intake and body weight measurement

Food intake was monitored every day for each cage from 1 week before surgery and then throughout the study period. PFS mice were given the same amount of food as the SG mice. SALF mice were given free access to food and water. For body weight measurement, mice were weighted individually daily at 6 a.m. from 1 week before surgery and throughout the study period. All animals were humanely killed 23 days after surgery. Each animal underwent necropsy immediately after death, and the epididymal (EAT), brown (BAT), and inguinal adipose tissues (IAT) were collected, weighed (in the case of EAT a sample was further processed as indicated below), and snap frozen at −80 °C. The liver and pancreas were also collected. A sample was sent for histology, and the remaining tissue was snap frozen at −80 °C.

Histopathological assessment of steatosis

Liver samples were fixed in 4 % neutral-buffered formaldehyde solution and embedded in paraffin for pathological evaluation after hematoxylin and eosin staining. Results are expressed as percentages and represent the mean number of hepatocytes with macrovesicular steatosis. Histological examination was performed in a blinded fashion by the same pathologist.

Intraperitoneal glucose tolerance test (IGTT)

Mice were fasted for 8 h with free access to water. Conscious mice received an intraperitoneal injection of a glucose solution (1 g/kg body weight; 250 mg/ml) and blood glucose levels were determined before (baseline) and every 30 min for 180 min using a glucometer optium (Xceed; Abbott).

Serum transaminases, fasting ghrelin

Serum fasting ghrelin concentrations were assessed using a rat/mouse ghrelin (active) ELISA (Millipore Corporation) according to the manufacturer's protocol. Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) serum concentrations were measured with an Olympus AU5400 (Olympus France) automatic analyzer.

Preparation of the stromal vascular fraction of adipose tissue

White epididymal adipose tissue pads were removed and the stromal vascular fraction was immediately purified as previously described [11]. Briefly, adipose tissue pads were cut into small pieces and rinsed in a buffer containing 120 mM NaCl, 4 mM KH_2 PO_4, 1 mM $MgSO_4$, 750 μM $CaCl_2$, 10 mM $NaHCO_3$ and 30 mM HEPES pH 7.4. Explants were incubated at 37 °C for 30 min in 15 ml of the above buffer supplemented with 1 % BSA, 280 mM glucose and 15 mg of type 1 collagenase (Worthington Biochemical Corporation). Adipocytes were then collected by filtration and floatation. The stromal vascular fraction was collected by centrifugation for 5 min at 750 g.

Antibodies and flow cytometric analysis

Hamster antibodies against mouse CD3 (clone 145-2C11) and rat antibodies against mouse CD44 (clone IM7) and FoxP3 (clone FJK-16s) were purchased from Becton–Dickinson or eBioscience. For intracellular staining, the FoxP3 staining buffer set (eBioscience) was used according to the manufacturer's instructions. Flow cytometry was performed on a FACS-Canto and analyzed using FACS-Diva version 6.0 software (BD-Bioscience).

RNA isolation and quantitative real-time PCR

Hypothalami were dissected and stored at −80 °C. Total mRNA was isolated according the Chowynski method using a Fast Prep apparatus (Q-Biogene). Two micrograms of total RNA were denatured at 65 °C for 10 min and incubated for 1 h at 42 °C in presence of 2.5 mM dNTP, 100 U Superscript II (Invitrogen) using 0.5 μg oligo(dT) primer in a total volume of 20 μl, followed by inactivation for 15 min at 70 °C. A negative control lacking RT was also performed in each assay (NRT). Real time PCR was performed from reverse transcribed cDNA samples for relative amounts of mRNA levels for the genes of interest. Quantitative real time PCR was performed in a Light Cycler 480 apparatus (Roche Diagnostics) using qPCRTMMastermix Plus for SYBR Green I reagent (Eurogentec) as described by the manufacturer. Primers were designed using Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems). mPOMC-F: AGTGCCAGGACCTCACCA; mPOMC-R: CAGCGAGAGGTCGAGTTTG; mNPY-F: CCGCTCTGCGACACTACAT; mNPY-R: TGTCTCAG GGCTGGATCTCT; mAgRP-F: CCCAGAGTTCCCA GGTCTAAGTCT; mAgRP-R: CACCTCCGCCAAAGCT TCT. mGAPDH-F: GAACATCATCCCTGCATCC; mGA PDH-R: CCAGTGAGCTTCCCGTTCA. Five microliters of the RT or NRT mixture was added to 1× Sybr Green

PCR buffer containing 5 mM $MgCl_2$, dNTPs including dUTP, uracyl-*N* glycosylase, SYBR Green I, and Hot Goldstar DNA polymerase in a total volume of 25 µl. PCR cycling was performed at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min for a total of 40 cycles. Real-time PCR was performed to amplify mouse POMC, NPY, AgRP, and GAPDH mRNA. For each assay, the PCR was performed in duplicate to determine the relative quantities of target genes and GAPDH amplicons.

Statistical analysis

The Kruskal–Wallis test was used for the comparison of more than two study groups. If the Kruskal–Wallis test was significant, then a Mann–Whitney *U* test was used for comparison between groups for statistical significance. All values are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed by NCSS 2007 software. $P < 0.05$ was considered to be significant.

Results

Body weight, food intake, ghrelin serum level, and expression of melanocortin system neuropeptides

Five animals died immediately after surgery within 6 h. The death was attributed to anesthesia because no anomaly was found at necropsy.

No differences between the three groups of mice with respect to body weight (SALF 48.4 ± 2.5 g vs. SG 46.7 ± 2.3 g vs. PFS 48.4 ± 4.9 g, $P = 0.335$) and daily food intake (SALF 2.2 ± 0.12 g vs. SG 2.6 ± 0.1 g vs. PFS 2.4 ± 0.15 g, $P = 0.15$) were observed before surgery. SG mice showed a significant weight loss compared to SALF mice, as expected (SG 36.9 ± 3.9 g vs. SALF 48.1 ± 4.2 g, $P < 0.05$), but also compared to PFS mice (SG 36.9 ± 3.9 g vs. PFS 41.3 ± 4.9 g, $P < 0.05$) (Fig. 1A, B). On average, SG mice consumed spontaneously significantly less chow per day for the first 2 weeks than SALF mice and reached the control mice on the third week (Fig. 1C, D). In agreement with this, both the gene expression of the neuropeptide Y (NPY) and Agouti-related peptide (AgRP) in the hypothalamus arcuate nucleus, which increase feeding and decrease energy expenditure, were not different in SG mice compared to control mice ($P = 0.799$ and $P = 0.799$, respectively). Likewise, the gene expression of the pro-opiomelanocortin (POMC) gene, which decreases appetite and increases energy expenditure, was not different among the three groups (Fig. 1E) at the end of the experiment ($P = 0.551$).

However, the serum levels of fasting acyl ghrelin were still significantly decreased 3 weeks after surgery in SG mice compared to PFS mice (SG 101.5 ± 13.7 pg/ml vs. PFS 298.1 ± 68.8 pg/ml, $P < 0.042$). Taken together, these data indicate that the loss of weight that follows SG cannot be explained exclusively by the reduced caloric intake of SG.

Glucose tolerance

We then evaluated the impact of SG on glucose tolerance. Although the three groups of mice were intolerant to glucose before surgery (Fig. 2A), SG mice and PFS mice showed significantly better glucose tolerance on day 15 compared with the baseline glucose time course as shown by the IGTT, with lower 60-, 90-, and 120-min peak levels (Fig. 2A, B) ($P < 0.05$) and a lower mean area under the curve (AUC) (SG 5925 ± 1083.7 mg/dl [min] vs. PFS 11903.1 ± 818.8 mg/dl [min] vs. SALF 13140 ± 1668.3 mg/dl [min]; SG vs. PFS, $P < 0.01$; SG vs. SALF, $P < 0.01$) (Fig. 2C). As expected, glucose tolerance did not improve in SALF mice (mean AUC, $P = 0.895$). SG mice showed a significantly lower mean AUC after IGTT ($P < 0.01$) and lower 60-, 90-, and 120-min peak levels ($P < 0.05$) compared to PFS mice (Fig. 2A–C), indicating that food restriction was not sufficient to account for the improvement in glucose tolerance observed in SG mice.

Weight of the pancreas and body fat

Fat accumulation in the pancreas and expansion of adipose tissue, inflammation play an important role in alterations to glucose homeostasis. Interestingly, the mean pancreas/body weight ratio was significantly lower in SG mice compared to control groups (SG 0.27 ± 0.06 vs. PFS 0.44 ± 0.03, $P = 0.0482$; SG 0.27 ± 0.06 % vs. SALF 0.44 ± 0.02 %, $P = 0.055$) (Fig. 3A). Further, SG mice showed significantly lower EAT and IAT/body weight ratios compared with SALF ($P = 0.0004$ and $P = 0.0001$, respectively), and PFS mice ($P = 0.001$ and $P = 0.003$, respectively). In contrast, the BAT/body weight ratio was increased in SG mice (1.3 %) compared to PFS (1 %) and SALF mice (0.9 %). Although this difference was not statistically significant for SG versus PFS mice ($P = 0.39$), the SG mice had a significantly higher BAT/body weight ratio compared SALF mice ($P = 0.049$) (Fig. 3B). As adipose tissue inflammation, mainly as a result of T cell infiltration, has been shown to play a pivotal role in mechanisms leading to insulin resistance and liver steatosis [12–14], we investigated the number of T cells responsible for the regulation of the inflammatory response in EAT. Although the $CD3^+$ T cells were equally represented in the EAT of the three groups of mice, the number of activated T

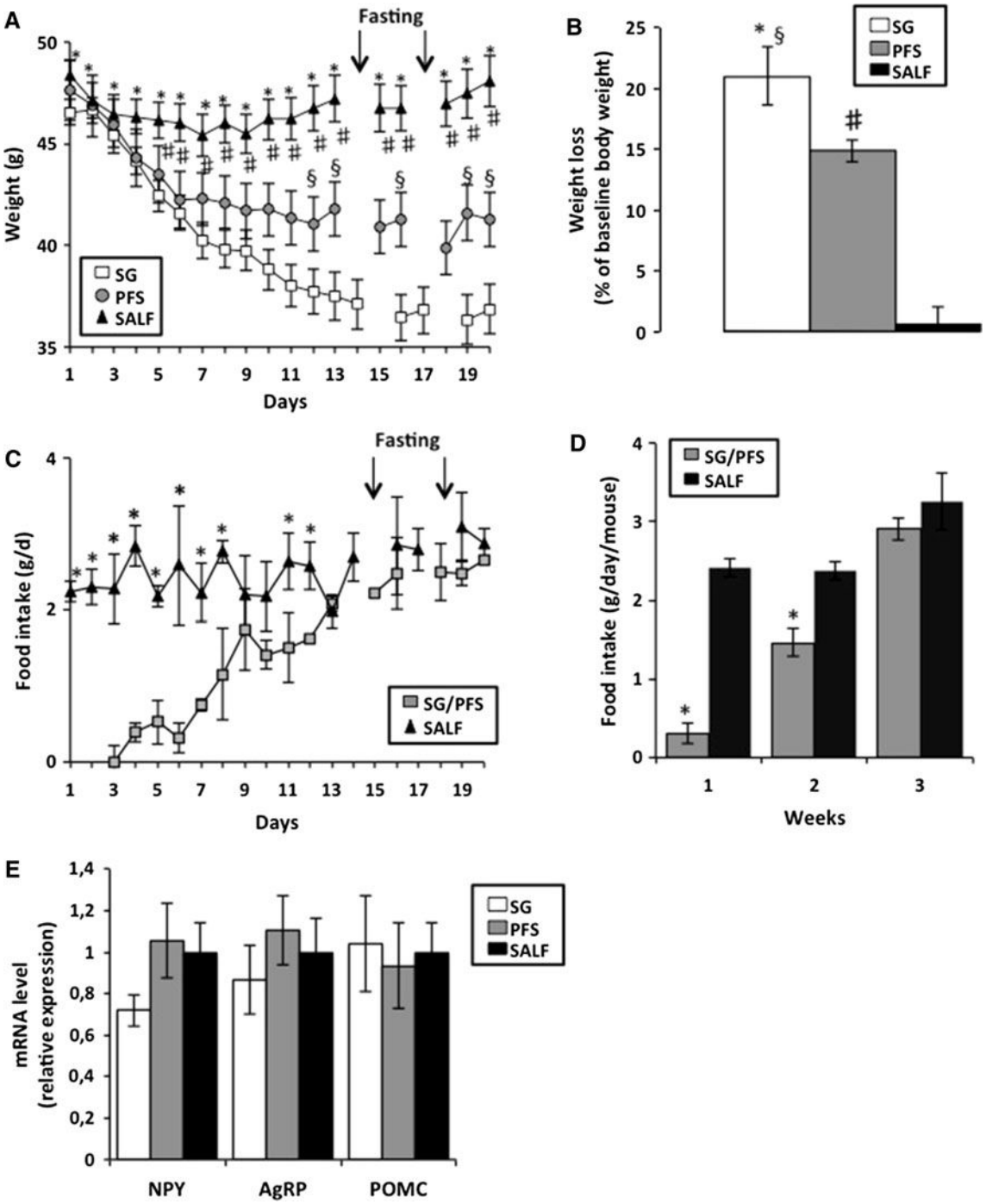


Fig. 1 Effect of sleeve gastrectomy on body weight, food intake, and the expression of melanocortin system neuropeptides. Evolution of the body weight **A**, weight loss (percentage of body weight ratio at baseline) **B**, daily food intake (mean weight (g)/mouse) **C**, and average food intake (mean weight (g)/mouse/week) **D** were evaluated in SG (10 animals), PFS (13 animals) and SALF (11 animals) mice. **E** Expression of neuropeptide Y (NPY), Agouti-related peptide (AgRP) and pro-opiomelanocortin (POMC), in the hypothalamus arcuate nucleus in SG (10 mice), PFS (13 mice) and SALF mice (11 mice) at 23 days after the surgery. The gene expression of the peptide was normalized to the mRNA levels of GAPDH. Results are expressed relative to the expression level of the SALF group and expressed as mean ± SEM. *PFS* pair-fed sham-operated, *SALF* sham-operated ad libitum fed, *SG* sleeve gastrectomy. Mann–Whitney *U* test $^{*}P < 0.05$ between SG and SALF mice, $^{\#}P < 0.05$ between PFS and SALF mice, $^{\S}P < 0.05$ between SG and PFS

cells, as evaluated by the CD44/FOXP3 ratio, was decreased, and the number of anti-inflammatory regulatory T (Treg) cells, as evaluated by the intracytoplasmic expression of FOXP3, was increased in the EAT of SG mice compared to PFS and SALF mice (Fig. 3C). These data indicate that SG mice not only had less EAT

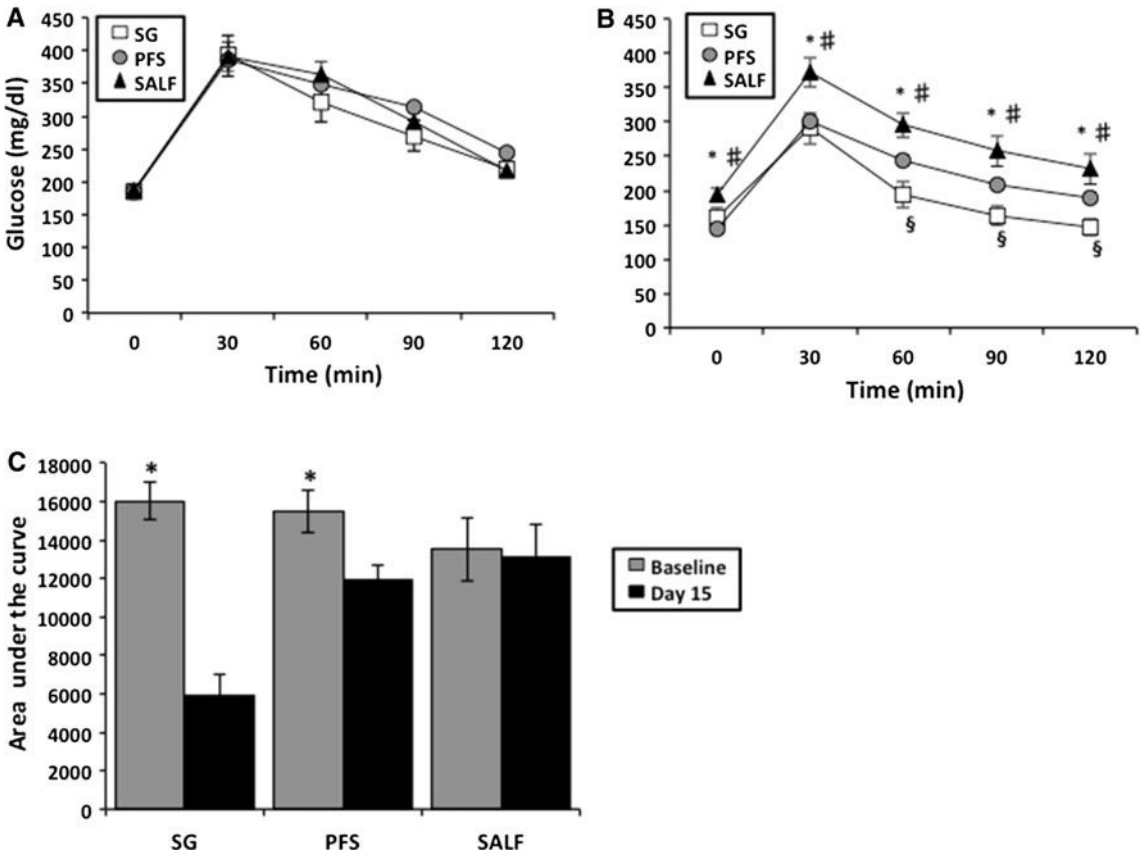


Fig. 2 Effects of sleeve gastrectomy on glucose tolerance. Intraperitoneal glucose tolerance test (IGTT) at baseline **A** and on day 15 after surgery **B.** Mean area under the curve (AUC) of the glucose tolerance test **C** in SG (10 animals), PFS (13 animals), and SALF (11 animals) mice. *PFS* pair-fed sham-operated, *SALF* sham-operated ad libitum fed, *SG* sleeve gastrectomy. Data are shown as mean ± SEM. Mann–Whitney *U* test $^{*}P < 0.05$ between SG and SALF mice. $^{\#}P < 0.05$ between PFS and SALF mice. $^{\S}P < 0.05$ between SG and PFS

quantitatively, but also that the T-cell balance was in favor of a decreased inflammatory response.

Liver steatosis and serum transaminases

Because fat tissue plays an important role in the genesis of insulin resistance and liver complications, we then evaluated the effect of SG on liver complications. As an indicator of liver damage, the variation in the transaminases level versus baseline values were first evaluated. The ALT and AST levels, as percentage of baseline values, decreased more significantly in SG mice compared to SALF mice ($P = 0.002$ and $P = 0.0015$, respectively) and PFS mice ($P = 0.046$ and $P = 0.019$, respectively) (Fig. 4A, B). Further, SG mice showed significantly less steatosis compared with SALF (6.7 % ± 1.7 vs. 30.9 % ± 5.2, $P = 0.001$) and PFS mice (6.7 % ± 1.68 vs. 16.6 % ± 3.9, $P = 0.04$) (Fig. 4C–F). Although reduced caloric intake was already associated with less liver disease (PFS mice), SG was related to normalization of the transaminases levels and a strong improvement in hepatic steatosis.

Discussion

We demonstrated that the additional loss of weight, the improvement in glucose tolerance, and the decrease in liver steatosis observed after SG in HFD-induced obese mouse cannot be explained exclusively by reduced caloric intake.

We found a loss of weight in the SG mice that remained significant throughout the duration of the study even though the mice were kept on a HFD after surgery. Interestingly, SG mice showed a significant lower food intake for the first 2 weeks after surgery, which became comparable to SALF on the third week, indicating that SG mice spontaneously increased their daily intake of food. Although this might be explained by the spontaneous dilation of the stomach, as observed sometime in humans, we did not find any significant dilation of the gastric tube at the time of the animal's death (data not shown).

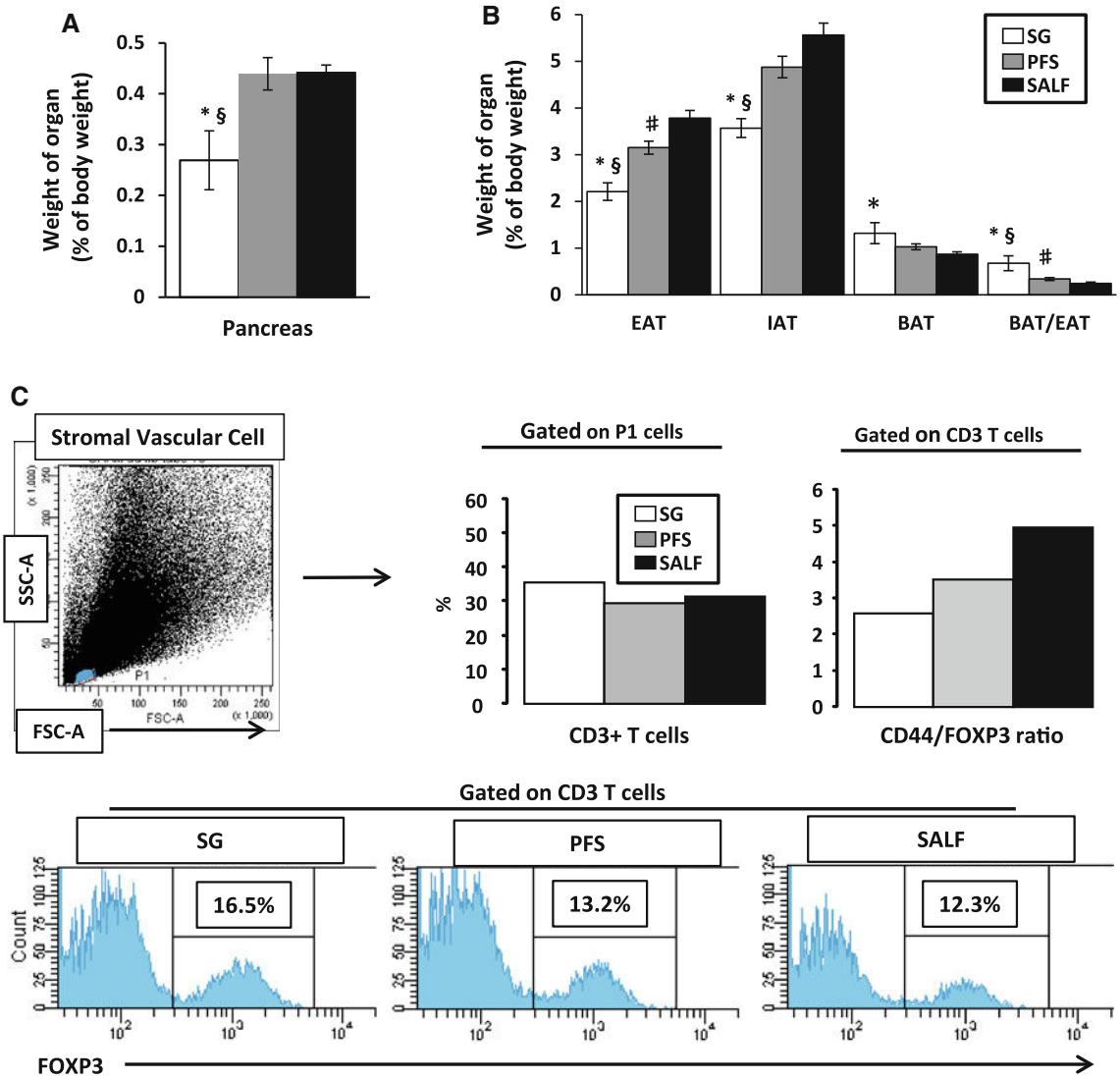


Fig. 3 Effects of sleeve gastrectomy on body fat composition and characterization of $CD3^+$ T cells in epididymal adipose tissue. Ratio of the weight of the pancreas to body weight **A**. Ratio of the weight of the epididymal adipose tissue (EAT), inguinal adipose tissue (IAT), and brown adipose tissue (BAT) to the body weight **B**. Weights were evaluated at the time of death of SG (10 animals), PFS (13 animals), and SALF (11 animals) mice. **C** Characterization of the $CD3^+$ T cells in adipose tissue from SG, PFS, and SALF mice. Epididymal fat pads were isolated, and the stromal vascular fraction (SVF) was stained for CD3, CD44, or FOXP3. Cells were gated on the nongranular and small-size populations (P1) and then on the $CD3^+$ population. (*Top*) For the FOXP3 marker, cells were stained with an anti-FOXP3 antibody. (*Bottom*) *SSC-A* side-scatter area, *SVF* stromal vascular fraction. *PFS* pair-fed sham-operated, *SALF* sham-operated ad libitum fed, *SG* sleeve gastrectomy. Data are shown as mean ± SEM. Mann–Whitney *U* test. $^*P < 0.05$ between SG and SALF mice. $^{\#}P < 0.05$ between PFS and SALF mice. $^{\S}P < 0.05$ between SG and PFS

Nevertheless, the initial decrease in dietary intake could be explained by the restrictive effects of postoperative edema and tissue inflammation at the gastric suture line in the SG group, which usually decreases within a few days of surgery. Stefater et al. also found temporary anorexia in the obese rat after SG followed by a progressive increase in food intake, which reached sham-treated ad libitum–fed controls by day 16 while weight loss was persistent. The authors reported that SG rats adapt their meal pattern, eating smaller but more frequent meals [15]. In HFD-fed obese mice, Yin et al. found a significant loss of weight after SG, which was maintained at 8 weeks in spite of the persistence of the HFD after surgery. Unfortunately, the food intake and the sham-treated pair-fed group were not evaluated [9]. Indeed, our data indicate that reduced caloric intake accounted for a loss of weight of 15 % of the baseline body weight (PFS), while the SG mice showed an additional loss of 6 % of body weight, which could not be explained by the reduced intake of food. Further, the regulation of the food intake by the central nervous system

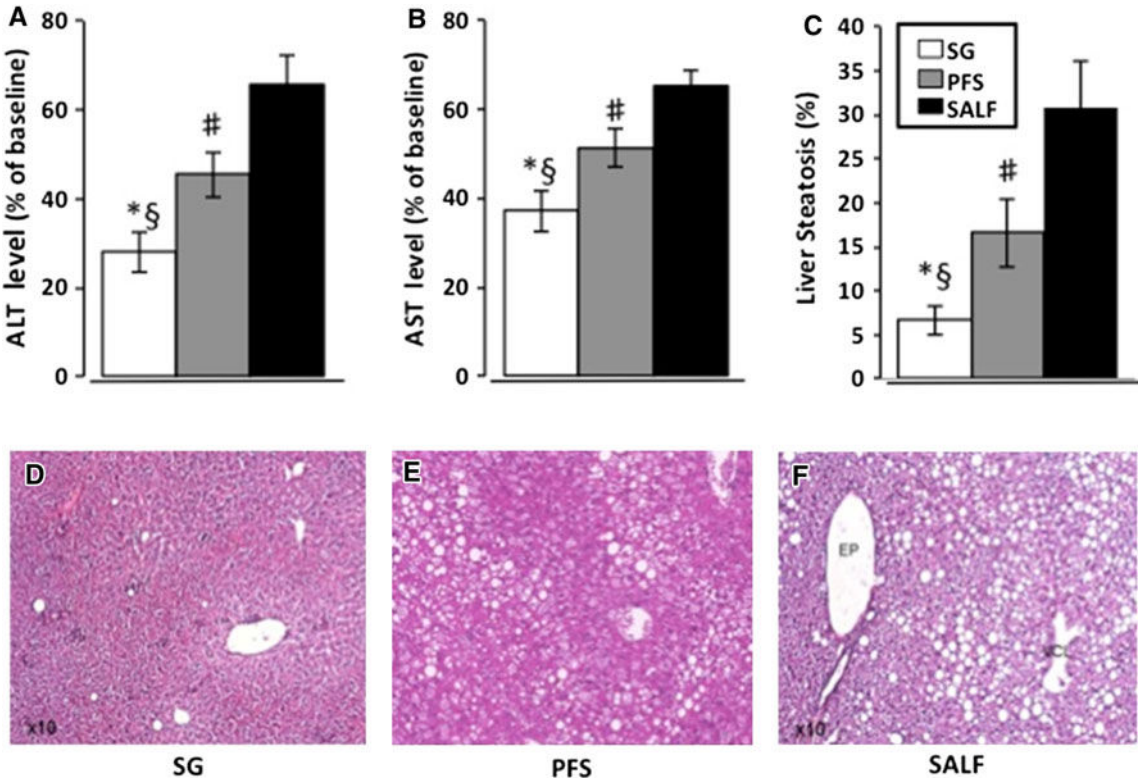


Fig. 4 Effect of sleeve gastrectomy on the serum transaminases level and on hepatic steatosis. Serum levels (percentage of baseline) of alanine aminotransferase (ALT) **A**, aspartate aminotransferase (AST) **B** (day 20 after surgery), and liver steatosis **C** (day 23 after surgery) were evaluated in SG (10 animals), PFS (13 animals), and SALF (11 animals) mice. Typical pictures of hematoxylin and eosin–stained liver sections from SG **D**, PFS **E**, and SALF **F** mice are shown. *PFS* pair-fed sham-operated, *SALF* sham-operated ad libitum fed, *SG* sleeve gastrectomy. **A**–**C** Data are shown as mean ± SEM. Mann–Whitney *U* test. $^{*}P < 0.05$ between SG and SALF mice. $^{\#}P < 0.05$ between PFS and SALF mice. $^{\S}P < 0.05$ between SG and PFS

was not modified 3 weeks after surgery. Some neurons in the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) coexpress NPY and AgRP, which stimulate food intake and weight gain, while another population of neurons express pro-opiomelanocortin (POMC), which promotes weight loss [16]. Evaluation of the gene expression of NPY, AgRP and POMC in our mice displayed no significant difference between SG and control mice (PFS and SALF). This nonsignificant difference in levels may not have influenced food intake, but the trend was for lower levels of NPY and AgRP in the SG group, which may have an effect on energy expenditure [17, 18]. Although we measured ARC peptide expression on postoperative day 23, when the food intake was similar between SG and control mice, Stefater et al. found the same results in obese rats undergoing SG, not only on postoperative day 122, but also immediately after surgery (days 9 and 35), when animals were still experiencing a transient anorexic state [15]. Thus, these results could indicate that ARC peptides are not responsible for the maintenance of weight loss after SG.

Interestingly, Bueter et al. [19] provided evidence that gastric bypass was associated with increased energy expenditure in obese rats. As gastric bypass increases postprandial plasma levels of PYY and GLP1 [20], the authors speculated that this might be responsible for the increased energy expenditure through interference with central neuroendocrine signaling in the hypothalamic arcuate nucleus [19]. Because the difference in body weight in our study remained significant in spite of comparable food intake, we investigated the development of BAT as a potential mechanism responsible for the persistence of weight loss. Although white adipose tissue is the main storage site of excess energy, primarily in the form of triglycerides, BAT can disperse energy as heat [21]. Interestingly, we found that SG mice had a significant decrease in white adipose tissue, including IAT and EAT, but that the BAT/body weight ratio tended to increase, although this difference was not statistically significant between SG versus PFS mice. However, the BAT/EAT ratio progressively increased with PFS and then SG compared to SALF mice (SALF: 0.246 ± 0.025 vs. SPF: 0.339 ± 0.033 vs. SG: 0.676 ± 0.157; SG vs. PFS, $P = 0.025$; SG vs. SALF, $P = 0.0018$; PFS vs. SALF, $P = 0.025$). These data suggest that a modification in the specific fat depot (brown vs.

white adipose tissue) may participate in the persistence of weight loss in SG mice in spite of the increased food intake.

Visceral white adipose tissue is responsible for the low-grade inflammatory state of obese subjects through the secretion of soluble mediators of inflammation [22]. There is also evidence that soluble mediators of inflammation are implicated in mechanisms leading to insulin resistance by interfering with the disruption of insulin signaling through serine phosphorylation of the insulin receptor substrate [23–25]. Furthermore, it has been shown that T cells play a pivotal role in regulating the inflammatory response in the adipose tissue [12–14, 26]. We thus investigated the number of T cells in the EAT, which is the equivalent of human visceral adipose tissue in rodents. Although the absolute number of $CD3^+$ T cells was not different for SG and control mice, the former had an increased number of $FOXP3^+$ T cells, which are implicated in anti-inflammatory signals blocking adipose tissue inflammation, and a decreased number of pro-inflammatory activated T cells, as evaluated by the CD44/FOXP3 ratio. SG thus was associated with a T-cell balance in EAT that was indicative of a decrease in the inflammatory response. This observation was in accordance with our previous reports on the decrease in adipose tissue and systemic inflammation associated with gastric bypass in patients [11, 27–29]. Thus, the reduced amount of EAT coupled with a reduced inflammatory response, and the potential concomitant reduction in the levels of circulating cytokines observed in SG mice are consistent with a casual role in SG-induced improvement of glucose tolerance.

Insulin resistance is the common denominator of the metabolic disturbances associated with obesity, which include the accumulation of triglycerides in the liver that leads to hepatic steatosis. Indeed, the improvement in glucose tolerance we observed in SG mice compared to control mice was associated with a decrease in liver steatosis in SG mice, which was superior to that observed in the control groups (PFS mice). As expected, the decrease in liver steatosis was associated with a significant decrease in the level of serum transaminases.

We also investigated the role of ghrelin, the potent orexigenic hormone secreted primarily by the gastric mucosa, which has been considered as a main actor responsible for the effects of SG, not only on the balance in energy expenditure but also on the metabolic disturbances linked to obesity [30]. In our study, SG mice showed reduced circulation levels of acyl ghrelin, the active form of ghrelin, compared with control mice. Chambers et al. [31] recently demonstrated in ghrelin-deficient mice that the effect of SG on weight loss, food intake, and glucose tolerance was independent of ghrelin signaling. However, developmental compensations in ghrelin-deficient mice may lead to underestimate the role of ghrelin reduction to the effects of SG. Indeed, Longo et al. [30] showed that chronic pharmacological blockade of the ghrelin receptor was associated with a striking improvement in hepatic insulin sensitivity, insulin secretion, decreased hepatic steatosis, and better liver function. The reduced circulating levels of ghrelin we found in SG mice may thus influence the mechanisms responsible for the dramatic reduction in liver steatosis that we observed in SG mice compared with control mice.

There is evidence in the literature of the inhibitory effect of fatty acids on insulin secretion in vitro and in vivo [32–34] and the association between pancreatic fat content and type two diabetes [35], with a sharp increase in both the total pancreatic fat and islet triacylglycerol content before the onset of spontaneous diabetes in rodents [36, 37]. Furthermore, Pinnick et al. [38] demonstrated that mice fed a HFD for 15 weeks had a higher triacyglycerol content compared to control mice fed a normal diet. As mice in the present study were fed a HFD for 32 weeks before surgery, we investigated the effect of SG on the pancreas/body weight ratio and found that SG mice showed a ratio significantly lower in spite of a greater weight loss compared with both control groups. We speculate that a possible decrease in pancreatic fat after SG may contribute to the strong improvement in glucose tolerance observed in SG mice that could not be explained exclusively by the reduced caloric intake in our study.

We acknowledge that there are some limitations of the present study. We did not investigate the energy expenditure (body temperature, basal metabolic rate), locomotor activity, gut function (lipid absorption, gut permeability, endotoxinemia), and gut hormones (GLP-1, PYY, CCK), which have important metabolic effects after SG and might account for the difference in weight loss between SG and PFS mice.

Others have previously demonstrated the effect of SG and reduced caloric intake on glucose, lipid metabolism, and blood pressure in rat model [39, 40]. We have also evaluated the effect of the SG in a HFD mice model. Indeed, mice were fed the same HFD before but also after surgery, leading to the evaluation the role of SG even without modification of the diet. We report a modification in the specific fat depot (brown vs. white adipose tissue) in response to SG that may participate in the persistence of weight loss in SG mice in spite of the increased food intake. Further, the beneficial effect of SG correlated with less activated T cells and by more anti-inflammatory regulatory T cells in epididymal adipose tissue. Altogether, these responses mediated by SG prevent the ectopic fat accumulation in both liver and pancreas even in HFD. This effect cannot be explained exclusively by reduced caloric intake. In our study, SG proved more effective than simple reduced caloric intake in reducing body weight, in restoring

glucose tolerance, and in decreasing liver steatosis in HFD-induced obese mice. Modification of adipose tissue development (brown vs. white adipose tissue) and ectopic fat (pancreatic steatosis) could also be involved. Thus, SG is not a purely restrictive procedure but has several metabolic effects such as decreased ghrelin levels and increased insulin, PYY, and GLP-1 levels, unlike other purely restrictive procedures as such gastric banding and vertical banded gastroplasty [7].

Acknowledgments This work was supported by grants from INSERM (France), the University of Nice, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire of Nice), and charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF)/ Schering-Plough to PG, EFSD/Lilly European Diabetes Research Programme to PG and la Fondation pour la Recherche Médicale to Jean-Louis Nahon). We thank Dr. Jean-Louis Nahon for scientific discussions, Dr. M. C. Brahimi-Horn for editorial work, and the members of the INSERM U1065 animal facility.

Disclosures Stéphanie Patouraux was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale. Philippe Gual is a recipient of an Interface Grant from the Centre Hospitalier Universitaire of Nice. Anne-Sophie Schneck, Antonio Iannelli, Déborah Rousseau, Stéphanie Bonnafous, Beatrice Bailly-Maitre, Ophélia Le Thuc, Carole Rovere, Patricia Panaia-Ferrari, Rodolphe Anty, Albert Tran, and Jean Gugenheim have no conflicts of interest or financial ties to disclose.

References

1. Ren CJ, Patterson E, Gagner M (2000) Early results of laparoscopic biliopancreatic diversion with duodenal switch: a case series of 40 consecutive patients. Obes Surg 10:514–523
2. Iannelli A, Dainese R, Piche T, Facchiano E, Gugenheim J (2008) Laparoscopic sleeve gastrectomy for morbid obesity. World J Gastroenterol 14:821–827
3. Braghetto I, Csendes A, Lanzarini E, Papapietro K, Carcamo C, Molina JC (2012) Is laparoscopic sleeve gastrectomy an acceptable primary bariatric procedure in obese patients? Early and 5-year postoperative results. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech 22:479–486
4. Basso N, Capoccia D, Rizzello M, Abbatini F, Mariani P, Maglio C, Coccia F, Borgonuovo G, De Luca ML, Asprino R, Alessandri G, Casella G, Leonetti F (2011) First-phase insulin secretion, insulin sensitivity, ghrelin, GLP-1, and PYY changes 72 h after sleeve gastrectomy in obese diabetic patients: the gastric hypothesis. Surg Endosc 25:3540–3550
5. Peterli R, Wölnerhanssen B, Peters T, Devaux N, Kern B, Christoffel-Courtin C, Drewe J, von Flüe M, Beglinger C (2009) Improvement in glucose metabolism after bariatric surgery: comparison of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy: a prospective randomized trial. Ann Surg 250:234–241
6. Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, Brethauer SA, Kirwan JP, Pothier CE, Thomas S, Abood B, Nissen SE, Bhatt DL (2012) Bariatric surgery versus intensive medical therapy in obese patients with diabetes. N Engl J Med 366:1567–1576
7. Peterli R, Steinert RE, Woelnerhanssen B, Peters T, Christoffel-Courtin C, Gass M, Kern B, von Fluee M, Beglinger C (2012) Metabolic and hormonal changes after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: a randomized, prospective trial. Obes Surg 22:740–748
8. Iannelli A, Anty R, Schneck AS, Tran A, Gugenheim J (2011) Inflammation, insulin resistance, lipid disturbances, anthropometrics, and metabolic syndrome in morbidly obese patients: a case control study comparing laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass and laparoscopic sleeve gastrectomy. Surgery 149:364–370
9. Yin DP, Gao Q, Ma LL, Yan W, Williams PE, McGuinness OP, Wasserman DH, Abumrad NN (2011) Assessment of different bariatric surgeries in the treatment of obesity and insulin resistance in mice. Ann Surg 254:73–82
10. Schlager A, Khalaileh A, Mintz Y, Abu Gazala M, Globerman A, Ilani N, Rivkind AI, Salpeter S, Dor Y, Zamir G (2011) A mouse model for sleeve gastrectomy: applications for diabetes research. Microsurgery 31:66–71
11. Bertola A, Deveaux V, Bonnafous S, Rousseau D, Anty R, Wakkach A, Dahman M, Tordjman J, Clément K, McQuaid SE, Frayn KN, Huet PM, Gugenheim J, Lotersztajn S, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Gual P (2009) Elevated expression of osteopontin may be related to adipose tissue macrophage accumulation and liver steatosis in morbid obesity. Diabetes 58:125–133
12. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki NagaiR (2009) $CD8^+$ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. Nat Med 15:914–920
13. Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tzui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM (2009) Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. Nat Med 15:921–929
14. Feuerer M, Herrero L, Cipolletta D, Naaz A, Wong J, Nayer A, Lee J, Goldfine AB, Benoist C, Shoelson S, Mathis D (2009) Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. Nat Med 15:930–939
15. Stefater MA, Pérez-Tilve D, Chambers AP, Wilson-Perez HE, Sandoval DA, Berger J, Toure M, Tschöp M, Woods SC, Seeley RJ (2010) Sleeve gastrectomy induces loss of weight and fat mass in obese rats, but does not affect leptin sensitivity. Gastroenterology 138:2426–2436
16. Spiegelman BM, Flier JS (2001) Obesity and the regulation of energy balance. Cell 104:531–543
17. Schwartz MW, Porte D Jr (2005) Diabetes, obesity, and the brain. Science 307:375–379
18. Zengin A, Nguyen AD, Wong IP, Zhang L, Enriquez RF, Eisman JA, Herzog H, Baldock PA, Sainsbury A (2013) Neuropeptide Y mediates the short-term hypometabolic effect of estrogen deficiency in mice. Int J Obes (Lond) 37:390–398
19. Bueter M, Löwenstein C, Olbers T, Wang M, Cluny NL, Bloom SR, Sharkey KA, Lutz TA, le Roux CW (2010) Gastric bypass increases energy expenditure in rats. Gastroenterology 138:1845–1853
20. Borg CM, Le Roux CW, Ghatei MA, Bloom SR, Patel AG, Aylwin SJ (2006) Progressive rise in gut hormone levels after Roux-en-Y gastric bypass suggests gut adaptation and explains altered satiety. Br J Surg 93:210–215
21. Enerbäck S (2010) Brown adipose tissue in humans. Int J Obes (Lond) 34(Suppl 1):S43–S46
22. Hajer GR, Van Haeften TW, Visseren FLJ (2008) Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. Eur Heart J 29:2959–2971
23. Iannelli A, Schneck AS, Gugenheim J (2011) Comment on: serial changes in inflammatory biomarkers after Roux-en-Y gastric bypass surgery. Surg Obes Relat Dis 7:625–627
24. Rotter V, Nagaev I, Smith U (2003) Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and

tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. J Biol Chem 278:45777–45784
25. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. Nature 420:333–336
26. Tran A, Gual P (2013) Non-alcoholic steatohepatitis in morbidly obese patients. Clin Res Hepatol Gastroenterol 37:17–29
27. Dalmas E, Rouault C, Abdennour M, Rovere C, Rizkalla S, Bar-Hen A, Nahon JL, Bouillot JL, Guerre-Millo M, Clément K, Poitou C (2011) Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. Am J Clin Nutr 94:450–458
28. Anty R, Dahman M, Iannelli A, Gual P, Staccini-Myx A, Amor IB, Luciani N, Saint-Paul MC, Huet PM, Sadoul JL, Srai SK, Unwin R, Gugenheim J, Le Marchand-Brustel Y, Tran A, Bekri S (2008) Bariatric surgery can correct iron depletion in morbidly obese women: a link with chronic inflammation. Obes Surg 18:709–714
29. Iannelli A, Anty R, Piche T, Dahman M, Gual P, Tran A, Gugenheim J (2009) Impact of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass on metabolic syndrome, inflammation, and insulin resistance in super versus morbidly obese women. Obes Surg 19:577–582
30. Longo KA, Govek EK, Nolan A, McDonagh T, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Morgan K, Hixon J, Zhou C, Kelder B, Kopchick JJ, Saunders JO, Navia MA, Curtis R, DiStefano PS, Geddes BJ (2011) Pharmacologic inhibition of ghrelin receptor signaling is insulin sparing and promotes insulin sensitivity. J Pharmacol Exp Ther 339:115–124
31. Chambers AP, Kirchner H, Wilson-Perez HE, Willency JA, Hale JE, Gaylinn BD, Thorner MO, Pfluger PT, Gutierrez JA, Tschöp MH, Sandoval DA, Seeley RJ (2013) The effects of vertical sleeve gastrectomy in rodents are ghrelin independent. Gastroenterology 144:50–52
32. Igoillo-Esteve M, Marselli L, Cunha DA, Ladrière L, Ortis F, Grieco FA, Dotta F, Weir GC, Marchetti P, Eizirik DL, Cnop M (2010) Palmitate induces a pro-inflammatory response in human pancreatic islets that mimics CCL2 expression by beta cells in type 2 diabetes. Diabetologia 53:1395–1405
33. Cnop M (2008) Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of type 2 diabetes. Biochem Soc Trans 36:348–352
34. Noushmehr H, D'Amico E, Farilla L, Hui H, Wawrowsky KA, Mlynarski W, Doria A, Abumrad NA, Perfetti R (2005) Fatty acid translocase (FAT/CD36) is localized on insulin-containing granules in human pancreatic beta-cells and mediates fatty acid effects on insulin secretion. Diabetes 54:472–481
35. Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, Bontemps S, van Waesberghe JH, Schindhelm RK, Mari A, Heine RJ, Diamant M (2007) Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. Diabetes Care 30:2916–2921
36. Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH (1994) Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte–beta-cell relationships. Proc Natl Acad Sci USA 91:10878–10882
37. Lee Y, Lingvay I, Szczepaniak LS, Ravazzola M, Orci L, Unger RH (2010) Pancreatic steatosis: harbinger of type 2 diabetes in obese rodents. Int J Obes (Lond) 34:396–400
38. Pinnick KE, Collins SC, Londos C, Gauquier D, Clark A, Fielding BA (2008) Pancreatic ectopic fat is characterized by adipocyte infiltration and altered lipid composition. Obesity (Silver Spring) 16:522–530
39. Rodríguez A, Becerril S, Valentí V, Moncada R, Mendez-Gimenez M, Ramirez B, Lancha A, Marin M, Burrell MA, Catalan V, Gomez-Ambrosi J, Frühbeck G (2012) Short-term effects of sleeve gastrectomy and caloric restriction on blood pressure in diet-induced obese rats. Obes Surg 22:1481–1490
40. Cummings BP, Bettaieb A, Graham JL, Stanhope KL, Kowala M, Hai FG, Chouinard ML, Havel PJ (2012) Vertical sleeve gastrectomy improves glucose and lipid metabolism and delays diabetes onset in UCD-T2DM rats. Endocrinology 153:3620–3632

1.1.2. « ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death » (Lebeaupin et al., 2015)

L'incidence des maladies chroniques du foie augmente constamment, en liaison avec la pandémie d'obésité à laquelle le monde actuel fait face. Dans ce contexte, les causes et les mécanismes des dommages hépatiques médiés par l'inflammation dans les stéatoses hépatiques non-alcooliques sont peu connus.

Le but de cette étude était d'étudier le lien potentiel entre stress du RE, l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la signalisation de mort cellulaire des hépatocytes dans l'étiologie des maladies hépatiques chroniques.

La stéatose est une pathologie courante chez les patients obèses et 25% de ceux-ci développent une forme plus sévère de maladie hépatique, la stéatohépatite, un facteur de risque dans le développement d'un hépatocarcinome. Or, en cas de stéatohépatite, les niveaux circulants de LPS sont élevés. L'hypothèse de travail ici est que l'inflammation induite notamment par le LPS pourrait induire un stress du RE, et induire l'activation de l'inflammasome[3] et la mort des hépatocytes associés à la progression d'une stéatohépatite. Pour cela, des souris obèses génétiquement (souris *ob/ob*) ont reçu l'injection de LPS ou de tunicamycine (un inducteur de stress du RE) dans le foie et différents paramètres ont été étudiés. L'administration de LPS ou de tunicamycine induit en effet chez ces souris l'activation de l'inflammasome NLRP3, initiant alors la mort des hépatocytes par pyroptose[4] et par apoptose. L'utilisation d'un bloqueur du stress du RE, le TUDCA (« tauroursodeoxycholic acid »), bloque les effets du challenge hépatique au LPS. Au cours des cette étude, un rôle central pour CHOP (« C/EPB homologous protein »), une protéine régulant la libération de Ca^{2+} depuis le RE durant un stress du RE et qui amplifie ainsi la réponse de l'inflammasome NLRP3, a été identifié dans l'induction de la mort des hépatocytes. Par ailleurs, l'analyse de biopsies de foies humains atteints de stéatohépatites a montré une corrélation entre l'activation et la surexpression de marqueurs du stress du RE et de l'inflammasome avec les lésions hépatiques. Ainsi, cette étude démontre que le stress du RE induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le foie qui médie la mort pyroptotique des hépatocytes, contribuant alors comme un mécanisme nouveau dans les lésions hépatiques médiées par l'inflammation dans les maladies chroniques du foie.

---

[3] Inflammasome : il s'agit d'un grand complexe multiprotéique intracellulaire jouant un rôle central dans l'immunité innée. Il en existe de plusieurs sortes selon les protéines qui le composent (ex. l'inflammasome NLRP3). De manière générale, les inflammasomes détectent et répondent à un large panel de PAMP (« pathogen-associated molecular patterns ») et DAMP (« damage-associated molecular patterns »).

[4] Pyroptose : forme de mort cellulaire dépendante de l'activité des caspases 1 et/ou 11, qui est associée à la production de facteurs pyrogéniques tels que l'IL-1β et l'IL-18

OPEN

Citation: Cell Death and Disease (2015) 6, e1879; doi:10.1038/cddis.2015.248
© 2015 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/15
www.nature.com/cddis

ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death

C Lebeaupin[1,2], E Proics[1,2], CHD de Bieville[1,2], D Rousseau[1,2], S Bonnafous[1,2,3], S Patouraux[1,2,4], G Adam[1,2], VJ Lavallard[1,2], C Rovere[5], O Le Thuc[5], MC Saint-Paul[1,2,3], R Anty[1,2,3], AS Schneck[1,2,3], A Iannelli[1,2,3], J Gugenheim[1,2,3], A Tran[1,2,3], P Gual[1,2] and B Bailly-Maitre*[,1,2]

The incidence of chronic liver disease is constantly increasing, owing to the obesity epidemic. However, the causes and mechanisms of inflammation-mediated liver damage remain poorly understood. Endoplasmic reticulum (ER) stress is an initiator of cell death and inflammatory mechanisms. Although obesity induces ER stress, the interplay between hepatic ER stress, NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death signaling has not yet been explored during the etiology of chronic liver diseases. Steatosis is a common disorder affecting obese patients; moreover, 25% of these patients develop steatohepatitis with an inherent risk for progression to hepatocarcinoma. Increased plasma LPS levels have been detected in the serum of patients with steatohepatitis. We hypothesized that, as a consequence of increased plasma LPS, ER stress could be induced and lead to NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death associated with steatohepatitis progression. In livers from obese mice, administration of LPS or tunicamycin results in IRE1α and PERK activation, leading to the overexpression of CHOP. This, in turn, activates the NLRP3 inflammasome, subsequently initiating hepatocyte pyroptosis (caspase-1, -11, interleukin-1β secretion) and apoptosis (caspase-3, BH3-only proteins). In contrast, the LPS challenge is blocked by the ER stress inhibitor TUDCA, resulting in: CHOP downregulation, reduced caspase-1, caspase-11, caspase-3 activities, lowered interleukin-1β secretion and rescue from cell death. The central role of CHOP in mediating the activation of proinflammatory caspases and cell death was characterized by performing knockdown experiments in primary mouse hepatocytes. Finally, the analysis of human steatohepatitis liver biopsies showed a correlation between the upregulation of inflammasome and ER stress markers, as well as liver injury. We demonstrate here that ER stress leads to hepatic NLRP3 inflammasome pyroptotic death, thus contributing as a novel mechanism of inflammation-mediated liver injury in chronic liver diseases. Inhibition of ER-dependent inflammasome activation and cell death pathways may represent a potential therapeutic approach in chronic liver diseases.
Cell Death and Disease (2015) **6,** e1879; doi:10.1038/cddis.2015.248; published online 10 September 2015

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) has become the most common form of chronic liver disease, currently affecting 20–30% of the general population and 75–100% of obese individuals.[1] The spectrum of NAFLD is wide ranging: from hepatic steatosis to nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocellular carcinoma. Hepatic steatosis is characterized by triglyceride accumulation in hepatocytes and follows a benign non-progressive clinical course. Nonalcoholic steatohepatitis (NASH), a progressive form, is defined as a combination of lipid accumulation, hepatocyte death, inflammation and fibrosis. As the probability of developing advanced fibrosis and hepatocellular carcinoma[2] is significantly greater in patients with steatohepatitis than in those with simple steatosis, it is important to elucidate the mechanism underlying the progression from steatosis to steatohepatitis.

The endoplasmic reticulum (ER) stress response has been linked to obesity, type 2 diabetes and liver cancer.[3,4] Under stress conditions, the ER initiates the unfolded protein response (UPR) to restore homeostasis. The UPR involves three transmembrane sensors: inositol-requiring enzyme 1 (IRE1α), PKR-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor (ATF6).[5] Each pathway culminates in the transcriptional regulation of gene expression, which first seeks to reestablish ER homeostasis. Failure of the UPR to decrease ER stress leads to apoptosis, notably via CHOP, a pro-apoptotic transcription factor whose expression is highly induced by ER stress.[6]

Increased activation of the ER stress response has been reported in obese mice and humans.[3,4,7,8] Obesity results in liver ER stress, which promotes insulin resistance and hepatosteatosis through the IRE1α branch.[3] Moreover, PERK

[1]INSERM, U1065, Equipe 8 « Complications hépatiques de l'obésité », Bâtiment Universitaire ARCHIMED, Nice, France; [2]Université de Nice Sophia Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France; [3]Centre Hospitalier Universitaire Nice, Hôpital l'Archet, Département Digestif, Nice, France; [4]Centre Hospitalier Universitaire Nice, Hôpital l'Archet, Département Biologie, Nice, France and [5]Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS, UMR7275, Valbonne, France
*Corresponding author: B Bailly-Maitre, INSERM, U1065, Team 8 "Hepatic complications in obesity", Bâtiment Universitaire ARCHIMED, 151 route Saint Antoine de Ginestière, BP 2 3194, 06204 Nice, France. Tel: +33 (0)4 89 06 42 38; Fax: +33 (0)4 89 06 42 21; E-mail: beatrice.bailly-maitre@unice.fr
Abbreviations: NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; NASH, nonalcoholic steatohepatitis; ER stress, endoplasmic reticulum stress; UPR, unfolded protein response; IRE1α, inositol-requiring enzyme 1; PERK, PKR-like ER kinase; ATF6, activating transcription factor 6; CHOP, C/EBP homologous protein; GRP78, glucose-regulated protein 78; XBP-1, X-box binding protein 1; NLRP3, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; TLR-4, toll-like receptor-4; HFD, high-fat diet; MCD, methionine- and choline-deficient diet; TUDCA, tauroursodeoxycholic acid; AST and ALT, aspartate and alanine aminotransferases; ATF4, activating transcription factor 4; eIF2, eukaryotic initiation factor 2; TUNI, tunicamycin
Received 11.5.2015; revised 17.7.2015; accepted 21.7.2015; Edited by G Raschella'

and IRE1α can regulate lipid stores in the liver, enforcing the hepatic metabolic disorders associated with obesity.[9,10] It is well established that apoptosis and inflammation are increased in patients with NASH, correlating with histological severity. Because the ER stress response is a critical mediator of inflammation, apoptosis and insulin resistance, it could have a central role in the progression from steatosis to NASH. However, the evidence for activation of hepatic ER stress in patients with NASH needs to be clarified. Gonzalez-Rodriguez *et al.*[11] observed that NASH patients displayed more elevated ER stress markers, namely CHOP and GRP78, reinforcing the notion that enhanced ER stress within liver cells may be relevant in the progression from steatosis to NASH.[12–14]

In addition, while studies indicated a contribution of NF-κB in the inflammatory responses triggered as a consequence of hepatic ER stress associated with NASH,[15] the potential interplay between ER stress and inflammasome engagement has yet to be explored in NASH progression. The NLRP3 inflammasome is a multi-protein complex which instigates the inflammatory response and contributes to insulin resistance. The NLRP3 inflammasome senses obesity-associated danger signals, namely endotoxin (LPS),[16] hyperglycemia and free fatty acids (FFAs), and mediates caspase-1-dependent maturation of the proinflammatory cytokines interleukin-1β (IL-1β) and IL-18.[17] Importantly, increased plasma LPS levels have been detected in mice models of NAFLD[18] and in humans with NASH.[19–21] Studies have suggested that the NLRP3 inflammasome may have a deleterious role in steatosis and NASH pathogenesis. Indeed, a deficiency in *caspase-1*, *Nlrp3* or *ASC* in mice results in protection from high-fat diet (HFD)-induced steatosis and insulin resistance.[16,22,23] Similarly, a deficiency in *IL-1β*, *IL-1 Receptor* or *TLR4*[24] protects mice from methionine- and choline-deficient (MCD) diet-induced steatohepatitis. Moreover, the NLRP3 inflammasome also triggers pyroptosis, a form of programmed cell death. Pyroptosis is defined as a caspase-1 or caspase-11-dependent cell death subroutine that is associated with the generation of pyrogenic mediators such as IL-1β and IL-18.[25,26] Therefore, the NLRP3 inflammasome could be a major cause of cell death and inflammation in NASH progression.

A 'two hit' mechanism has been proposed to drive NASH pathogenesis.[27] The first hit is associated with steatosis and sensitizes the liver to additional proinflammatory insults (second hit), such as LPS, which aggravate liver injury and contribute to the development of NASH.[28,29] We hypothesized that, as a consequence of increased plasma LPS, ER stress could be induced and lead to NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death associated with NASH. To address this issue, we explored *in vivo* whether the administration of LPS could trigger exaggerated hepatic ER stress signaling, and compared the response with that of tunicamycin, a chemical ER stress inducer, in steatotic livers from genetically obese (*ob/ob*) mice. We analyzed the potential benefit of TUDCA, an ER stress inhibitor, in the prevention and treatment of hepatic inflammation and death caused by an LPS challenge. We found that PERK and IRE1α pathways cooperate to activate CHOP, and that this appears to be a critical link between inflammasome activation and hepatocyte death in NASH. Importantly, the upregulation of transcripts of ER stress correlated with inflammasome priming and liver injury in NASH patients, which highlights their relevance in disease progression.

Results

TUDCA protects the liver from LPS-induced injury, apoptosis and inflammasome priming. In genetically obese mice (*ob/ob*) with severe steatosis and challenged with LPS, we investigated the *in vivo* effects of TUDCA treatment. Liver histological analysis revealed severe inflammation with many inflammatory foci and areas of cell death in LPS-injected mice compared with PBS-injected mice (Figure 1a). Five days of TUDCA treatment dramatically reduced the number of steatohepatitis foci (presence of inflammatory foci and ballooned hepatocytes) induced by LPS (Figure 1a). TUDCA treatment also resulted in partial resolution of hepatic steatosis (Figure 1a and Supplementary Figure S1A). As expected, inflammatory foci were absent in PBS- and TUDCA-injected mice (Supplementary Figure S1A). Consistent with these observations, serum levels of aspartate (AST) and alanine (ALT) aminotransferases were significantly lower in [TUDCA+LPS]-treated *ob/ob* mice compared with LPS-treated mice (Figure 1b). TUDCA-treated mice also displayed a reduction in AST and ALT levels compared with those receiving PBS. Thus, in *ob/ob* mice, LPS challenge induced NASH-like pathological features: ballooned hepatocytes, liver damage and inflammation. TUDCA treatment prevented these effects. After LPS injection, liver sections of TUDCA-treated mice also contained less TUNEL-positive hepatocytes compared with untreated animals. TUNEL staining showed that both apoptosis (nuclear fragmentation, Figure 1c) and necrosis (diffuse cytoplasmic staining, Supplementary Figure S1A) were significantly reduced after TUDCA treatment. Furthermore, the levels of active caspase-3 and substrate CAD were markedly reduced in [TUDCA +LPS]-treated mice in comparison with LPS-treated ones (Figure 1c). In accordance with inflammatory cell infiltration, the hepatic levels of *TNFα, IL-1β*, *IFNγ* and *iNOS* messenger mRNA were significantly increased in LPS-injected mice (Figure 1d). TUDCA treatment decreased the hepatic levels of these markers upon LPS challenge. Notably, IL-1β is matured by proinflammatory caspases (caspase-1 and caspase-11).[17] Interestingly, the analysis of mRNA levels showed that *caspase-1* and *caspase-11* were significantly decreased in the livers of [TUDCA+LPS]-treated mice in comparison with LPS-treated ones (Figure 1d). We concluded that TUDCA treatment suppresses hepatocyte ballooning, apoptosis and inflammasome priming upon LPS challenge in *ob/ob* mice.

TUDCA provides protection against LPS-induced ER stress and inflammasome pyroptotic death. As TUDCA treatment prevented LPS-induced upregulation of *IL-1β, caspase-1* and *caspase-11* gene expression (Figure 1d) and TUNEL positivity (Figure 1c), we hypothesized that LPS could induce hepatic ER stress pyroptosis. As in apoptotic cell death, cells undergoing pyroptosis incur DNA damage and become positive in the terminal deoxynucleotidyl

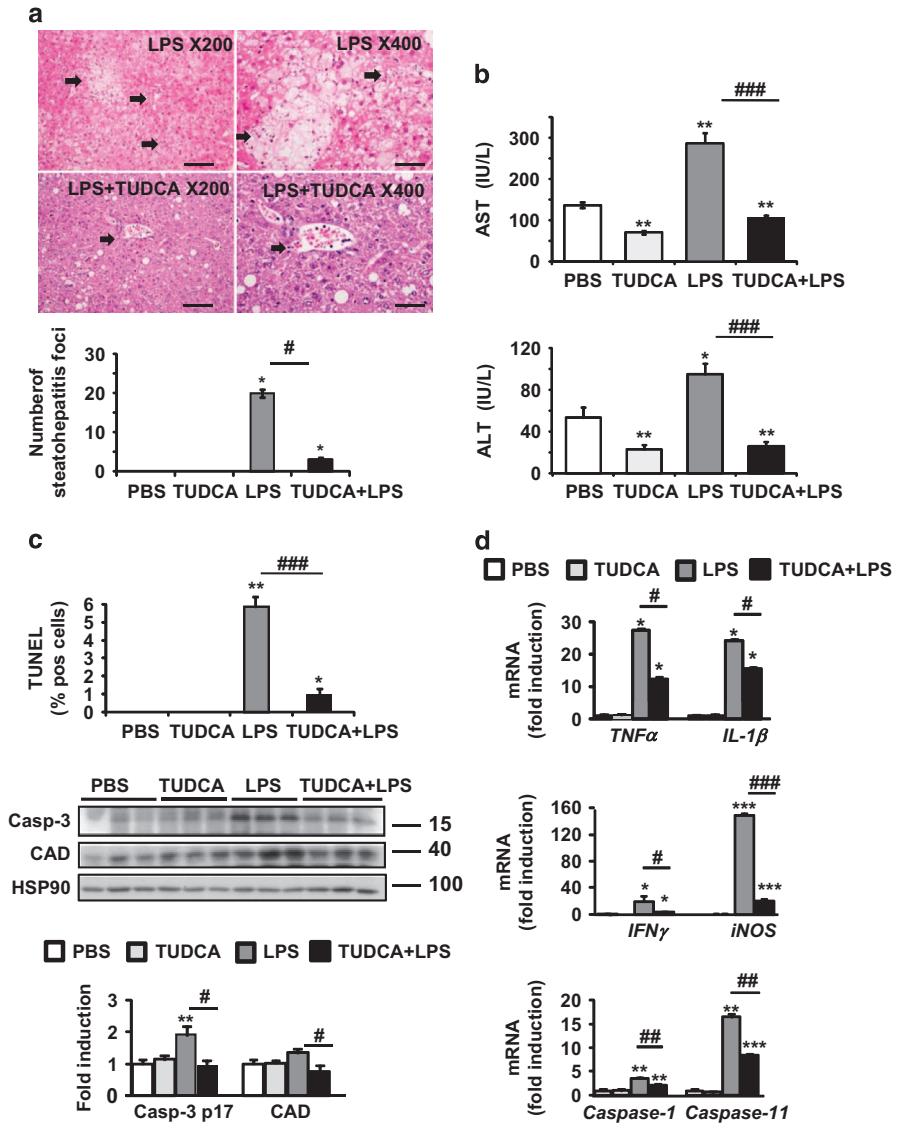


Figure 1 TUDCA protected against LPS-induced liver injury, apoptosis and inflammasome priming in *ob/ob* mice. TUDCA was injected intraperitoneally (500 μg/g) for 5 days. An LPS challenge (2 μg/g) was performed 6-h before killing. (**a**) Shown are photomicrographs of sections of murine liver stained with H&E (scale bar = 50 μm at × 200 or 25 μm at × 400 magnification). The number of steatohepatitis foci (number of inflammatory foci in contact with ballooned hepatocytes, identified by arrows) was evaluated. (**b**) Serum AST and ALT transaminase levels were measured ($n = 9$–12). (**c**) Apoptotic hepatocytes were visualized with TUNEL assay. The expression of active caspase-3 and CAD was evaluated in total liver lysates. Quantification was performed from the immunoblot analysis and expressed as fold induction ($n = 6$). (**d**) Relative expression of hepatic *TNFα, IL-1β, caspase-1* and *caspase-11* mRNA (normalized to *36B4* mRNA). Data were expressed as fold induction ($n = 7$). Data are expressed as mean ± standard error of the mean. Statistical significance from controls is denoted by $^{*,\#}P \leq 0.05$, $^{**,\#\#}P \leq 0.01$, $^{***,\#\#\#}P \leq 0.001$

transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. Also, Figure 2a shows that LPS-treated *ob/ob* mice exhibited marked increases in both active caspase-11 and -1, whereas TUDCA strongly prevented activation. As reported,[16] hepatic steatosis was already associated with increased levels of both active inflammatory caspases in the liver. We observed that NLRP3 expression was induced upon LPS stimulation at the protein and mRNA levels, whereas it was decreased with TUDCA, as shown in Figures 2a and b, respectively. Accordingly, hepatic activation of another specific inflammasome substrate, *IL-18*, was reduced at the mRNA level (Figure 2b). Importantly, in agreement with increased caspase-11 and -1 activation, the serum levels of systemic mature IL-1β rose after LPS injury, whereas TUDCA treatment completely abolished IL-1β secretion in these mice (Figure 2c). TUDCA treatment also decreased the circulating levels of global inflammatory markers such as TNFα, IFNγ (Figure 2c), MCP-1 and IL-6 (Supplementary Figure S1B) in response to LPS. It should be acknowledged that the circulating inflammatory markers could be derived from adipose tissue in addition to the liver and contribute to inflammatory responses.

Together, these data reveal that upon LPS treatment, ER-dependent NLRP3 inflammasome and hepatocyte death pathways were induced in the livers of *ob/ob* mice, whereas TUDCA blocked both pathways. We next decided to

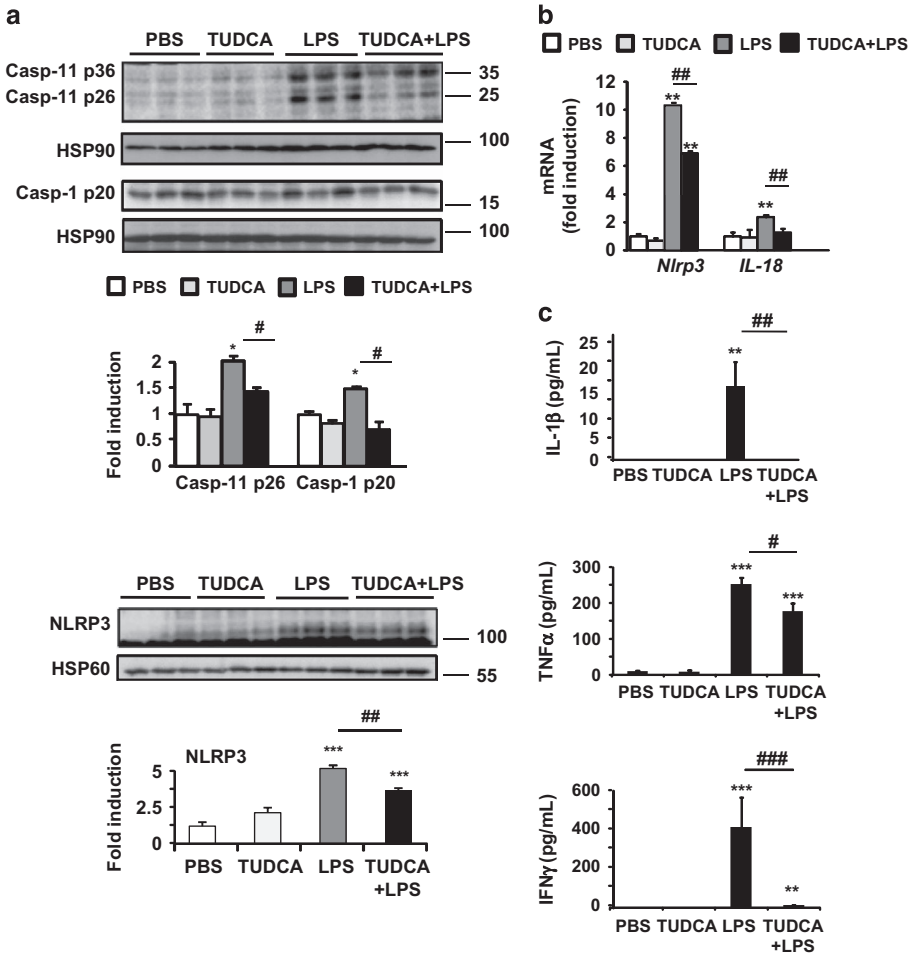


Figure 2 TUDCA treatment prevented hepatic activation of the NLRP3 inflammasome in *ob/ob* mice challenged with LPS. (**a**) Analysis of whole-liver samples from PBS-, TUDCA-, LPS- and [TUDCA+LPS]-treated mice. Immunoblot analysis of active caspase-11, active caspase-1 and NLRP3 protein levels are shown ($n=4$–6). (**b**) Real-time quantitative PCR analysis was performed to compare relative hepatic levels of *Nlrp3* and *IL-18* mRNAs. (**c**) Plasma cytokine levels were quantified for IL-1β, TNFα and IFNγ ($n=7$–9). Statistical significance from controls is denoted by $^{*,\#}P\leq0.05$, $^{**,\#\#}P\leq0.01$, $^{***,\#\#\#}P\leq0.001$

administer the TUDCA treatment with LPS for the duration of the 6-h treatment. Importantly, we observed that a unique dose of TUDCA was still capable of protecting the liver against LPS-induced steatohepatitis foci formation and necrosis (Supplementary Figure S2A), liver injury (Supplementary Figure S2B) and apoptosis (Supplementary Figure S2C) independently of the grade of steatosis (Supplementary Figure S2A). TUDCA 6-h co-treatment decreased the activation of inflammatory caspases in the liver at the protein and mRNA levels (Supplementary Figure S3A, top and bottom, respectively). The increase in circulating levels of IL-1β, TNFα and IFNγ in response to LPS was also limited by TUDCA (Supplementary Figure S3B). Thus, the hepatoprotective and anti-inflammatory properties of TUDCA against LPS are independent of its ability to improve steatosis.

TUDCA reduces LPS-induced hepatic IRE1α and PERK activation. During ER stress, IRE1α initiates an unconventional splicing of the mRNA encoding an isoform of the XBP-1 protein (sXBP-1).[5] PERK phosphorylates eIF2α, which results in the translational induction of ATF4. ATF6 is cleaved and its cytosolic domain translocates to the nucleus. We examined the hepatic status of sXBP-1, phospho-eIF2α, ATF4 and total ATF6 in *ob/ob* mice. The levels of the sXBP-1 protein (Figure 3a) and target gene *DnaJ9* (Supplementary Figure S4a) increased significantly in LPS-treated mice, whereas they were barely detected in [TUDCA+LPS]-treated mice. In addition, the hepatic levels of phosphorylated eIF2α and ATF4 protein expression were slightly enhanced with LPS, while TUDCA pretreatment protected from LPS-induced eIF2α activation (Figure 3a). Interestingly, 5 days of TUDCA treatment reduced the basal state of phosphorylation of eIF2α. In contrast, total ATF6 expression remained unchanged irrespective of LPS stimulation (Figure 3a). The GRP78 protein was markedly increased in the livers of TUDCA-treated *ob/ob* mice, whereas the CHOP protein was barely detectable. TUDCA further increased the [GRP78/CHOP] ratio, thereby promoting potential protection against LPS stimulation (Figure 3b). Importantly, we found similar results on an mRNA level when TUDCA and LPS were administrated together for the duration of the 6-h treatment (Supplementary Figure S3C).

As reported,[3] the basal levels of phospho-JNK were already elevated in the steatotic liver as a consequence of IRE1α

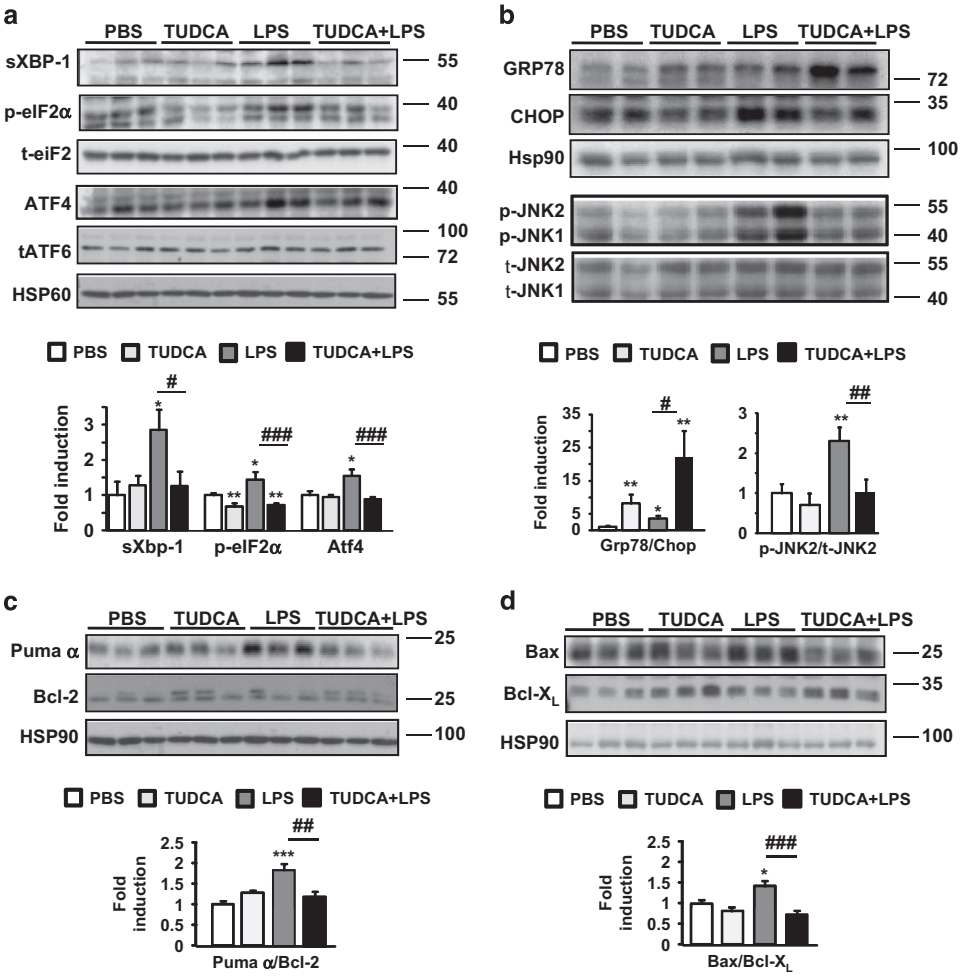


Figure 3 TUDCA inhibited the LPS-induced IRE1α and PERK hepatic activities by favoring anti-apoptotic signaling pathways in *ob/ob* mice. The expression of ER stress (**a** and **b**) and apoptotic proteins, presented as Bcl-2 family pro-apoptotic/anti-apoptotic ratios (**c** and **d**), was compared by immunoblotting and quantified ($n = 6$–9). Data are expressed as mean ± standard error of the mean. Statistical significance from controls is denoted by $^{*,\#}P \leq 0.05$, $^{**,\#\#}P \leq 0.01$, $^{***,\#\#\#}P \leq 0.001$

activation compared with lean control livers (Supplementary Figures S5A–C). Upon LPS challenge, the levels of phospho-JNK rose further, whereas TUDCA treatment prevented exaggerated JNK activation (Figure 3b). CHOP mediates its pro-apoptotic effects by positively regulating pro-apoptotic Puma and Bax proteins, while negatively regulating the anti-apoptotic Bcl-2 protein.[5] Importantly, LPS stimulation increased Puma and Bax protein expression (Figures 3c and d). TUDCA blocked this upregulation and slightly increased the levels of Bcl-X_L and Bcl-2 proteins. Thus, TUDCA treatment inhibited the increase in Bax and Puma protein levels, thereby promoting a protective Bcl-X_L- and Bcl-2-dependent mechanism against LPS-induced liver injury.

These data revealed that in livers from obese mice, administration of LPS results in the activation of IRE1α and PERK, as well as CHOP overexpression. This, in turn, activates the NLRP3 inflammasome, initiating hepatocyte apoptosis and, more specifically, pyroptosis. In contrast, the LPS challenge is blocked by the ER stress inhibitor TUDCA. In light of the data, we addressed whether feeding mice with a methionine- and choline-deficient (MCD) diet, a nutritional model of steatohepatitis, would induce a similar phenotype. As expected, the MCD-fed mice developed a typical feature of NASH: increased liver injury (Supplementary Figure S6A). All these parameters correlated with an increased hepatic priming of the NLRP3 inflammasome and ER stress markers, specifically CHOP, in the MCD-fed mice (Supplementary Figures S6B and C).

Tunicamycin treatment leads to hepatic apoptosis, exacerbated NLRP3 inflammasome activation and overwhelmed IRE1α and PERK activities. We questioned whether ER stress activation with tunicamycin (TUNI), a specific ER stress inducer, would lead to increased liver injury and NLRP3 inflammasome activation in the livers of obese mice. As shown in Figure 4a, the serum levels of AST were significantly increased in TUNI-injected mice compared with control animals, indicative of additional hepatocyte death, and we observed a strong increase in the number of steatohepatitis foci. Furthermore, these mice present a marked increase in TUNEL-positive hepatocytes, activated hepatic caspase-3, Puma α and active Bax in response to TUNI (Figure 4b). These results clearly indicate that ER

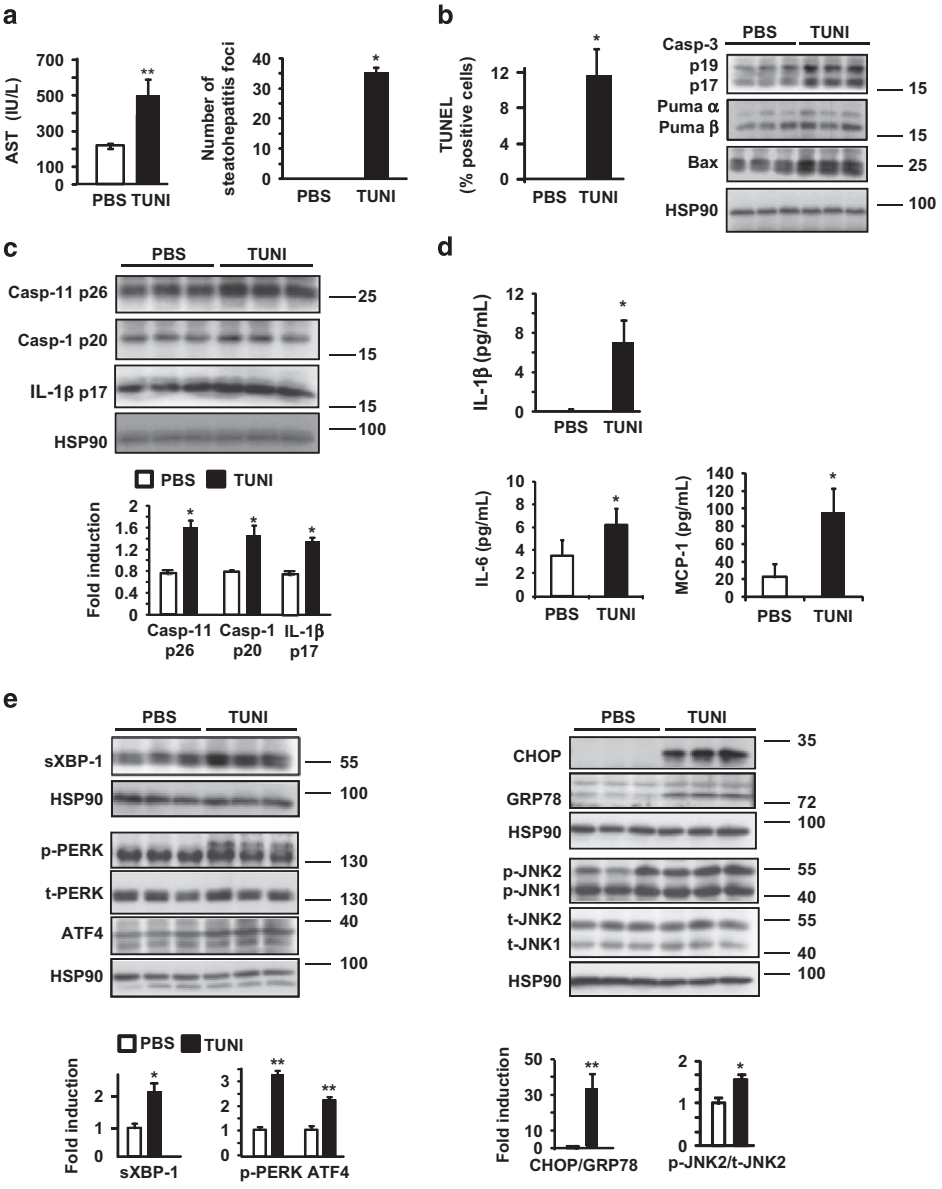


Figure 4 Challenge with tunicamycin in *ob/ob* mice increased apoptosis and activation of the NLRP3 inflammasome, and was associated with hepatic IRE1α and PERK activities. Mice were injected with TUNI (2 μg/g) 6 h before killing. (**a**) Serum AST (IU/l) levels were measured and the number of steatohepatitis foci was determined ($n=5$). (**b**) The number of apoptotic hepatocytes was monitored by TUNEL staining. Immunoblotting of active caspase-3, Puma and Bax was performed from whole-liver lysates. (**c**) Immunoblot analysis of the protein levels of active caspase-11, caspase-1 and IL-1β are shown ($n=5$). (**d**) Plasma levels of the cytokines IL-1β, IL-6 and MCP-1 are represented ($n=5$). (**e**) The expression of ER stress proteins was compared in TUNI- and PBS-injected mice ($n=5$). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Statistical significance from controls is denoted by $^{*}P\leq0.05$, $^{**}P\leq0.01$

stress by TUNI led to liver injury associated with hepatocyte apoptosis in *ob/ob* mice.

Regarding inflammasome activation, we found that TUNI exacerbated hepatic caspase-11, caspase-1 and production of IL-1β compared with control mice (Figure 4c). Importantly, in agreement with increased caspase-11 and -1 activation, the serum levels of systemic mature IL-1β increased after TUNI injection (Figure 4d). TUNI treatment also increased the circulating levels of the proinflammatory cytokines IL-6 and MCP-1 (Figure 4d). The mRNA level of *Nlrp3* was also specifically increased with TUNI (Supplementary Figure S4B). Hence, the induction of ER stress by TUNI administration not only triggered apoptosis, but also led to an increase in hepatocyte pyroptosis in *ob/ob* mice.

We thus analyzed the activity of UPR effectors in response to TUNI. The level of sXBP-1, a target of IRE1α, was significantly increased after TUNI treatment (Figure 4e). Consequently, the mRNA levels of *sXBP-1* and the target gene *DnaJ9* (Supplementary Figure S4B) were increased in response to TUNI. Simultaneously, levels of hepatic phospho-PERK increased in TUNI-challenged mice compared with control mice. Accordingly, we detected a marked increase in

the protein (Figure 4e) and mRNA levels (Supplementary Figure S4B) of ATF4. Finally, a strong upregulation in CHOP protein expression, a downstream target of sXBP-1 and ATF4,[5] was detected after TUNI challenge, alongside an increase in phospho-JNK expression (Figure 4e). Accordingly, TUNI increased the [CHOP/GRP78] ratio at the protein (Figure 4e) and the mRNA levels (Supplementary Figure S4B), thus favoring programmed hepatocyte death.

CHOP mediates ER-stress-induced pyroptosis and apoptosis in mouse primary hepatocytes. We evaluated cell viability, pyroptosis and apoptosis in primary mouse hepatocytes treated with LPS or TUNI, or co-treated with TUNI and LPS [TUNI+LPS], in the absence or presence of the ER stress inhibitor TUDCA. Although LPS and TUDCA alone did not alter hepatocyte viability (MTT test, Figure 5a) or positivity for TUNEL staining (Figure 5b), primary hepatocytes displayed enhanced sensitivity to co-treatment with TUNI+LPS, compared with TUNI alone, with a marked decrease in viability and a higher percentage of TUNEL-positive hepatocytes (Figures 5a and b). Furthermore, hepatocyte death induced by TUNI+LPS was partially suppressed by TUDCA. We also confirmed these results in AML12 hepatocytes (Supplementary Figure S7). We also tested whether Z-YVAD-fmk, a caspase-1 and caspase-11 inhibitor, could block the hepatocyte death induced by TUNI+LPS. The cell death caused by TUNI+LPS was indeed attenuated by Z-YVAD-fmk (Supplementary Figure S7). These results suggest that loss of viability was dependent on proinflammatory caspase-1 and caspase-11 activities. We next monitored the protein levels of proinflammatory caspases, IL-1β and CHOP by immunoblotting. Expression of the CHOP protein was enhanced in TUNI-treated hepatocytes, whereas it was barely detectable in controls (Figure 5c). Strikingly, CHOP protein expression was further increased in hepatocytes treated with TUNI+LPS. Importantly, this pattern of CHOP activation mirrored the increase in the active forms of caspase-11, caspase-1 and IL-1β. These effects were strongly inhibited by TUDCA (Figure 5c). We hypothesized that CHOP could induce the activation of inflammatory caspases, but not apoptotic caspase-3. We then performed similar experiments in primary hepatocytes by knocking-down *Chop* using siRNA. As shown in Figure 5d, the knockdown of endogenous *Chop* strongly prevented the accumulation of active caspase-11, caspase-1 and their substrate IL-1β in response to TUNI or TUNI+LPS, but not active caspase-3 (data not shown). This result indicated that TUNI and LPS act synergistically to induce CHOP-dependent inflammasome pyroptotic death.

NASH patients show increased hepatic ER stress, inflammasome priming and liver injury. In line with our results, we hypothesized that progression from steatosis to NASH could be associated with enhanced hepatic ER stress and inflammasome activation in obese patients. This was

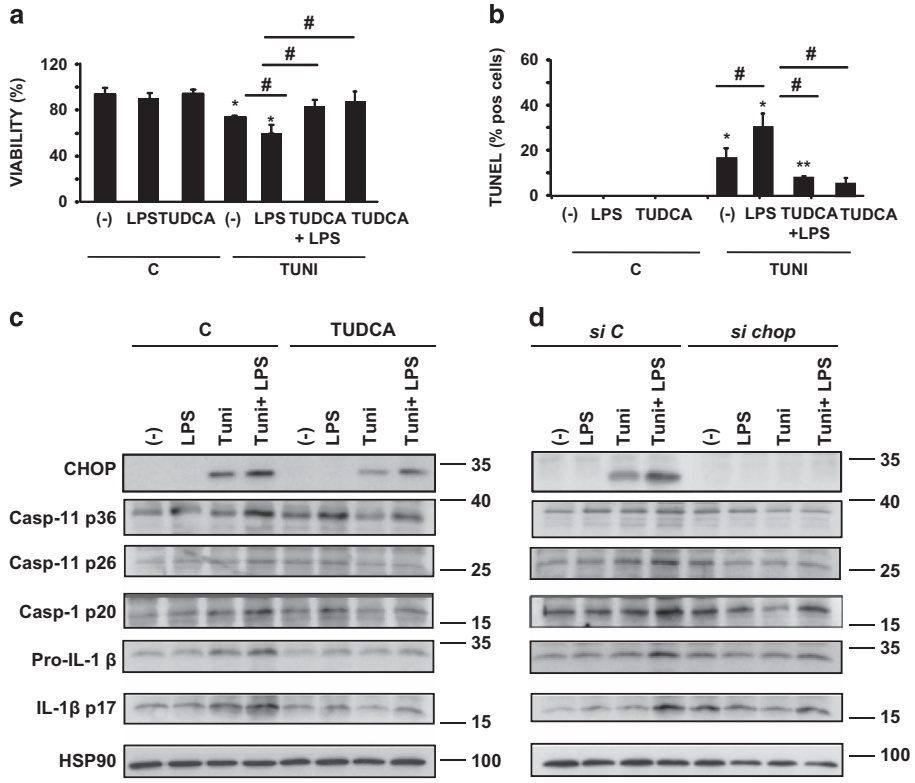


Figure 5 TUDCA inhibited CHOP-induced apoptosis and activation of the inflammasome in response to LPS and tunicamycin co-treatment in primary mouse hepatocytes. (**a** and **b**) Hepatocytes were pretreated for 48 h with 500 μg/ml TUDCA followed by culture for 24 h in normal medium (**c**) or 100 ng/ml LPS, 1 μg/ml TUNI or both (LPS+TUNI). After treatment, the percentage of viable cells quantified by MTT assay (**a**) (relative to control) and TUNEL-positive hepatocytes (**b**) was quantified ($n=4$–6). (**c** and **d**) Immunoblot analysis of CHOP, active caspase-11, caspase-1, pro-IL-1β and IL-1β protein levels assessed from hepatocytes pretreated either with TUDCA (**c**) or *Chop* siRNA (**d**) before stimulation ($n=3$). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Statistical significance from controls is denoted by $^{*,\#}P\leq 0.05$, $^{**}P\leq 0.01$

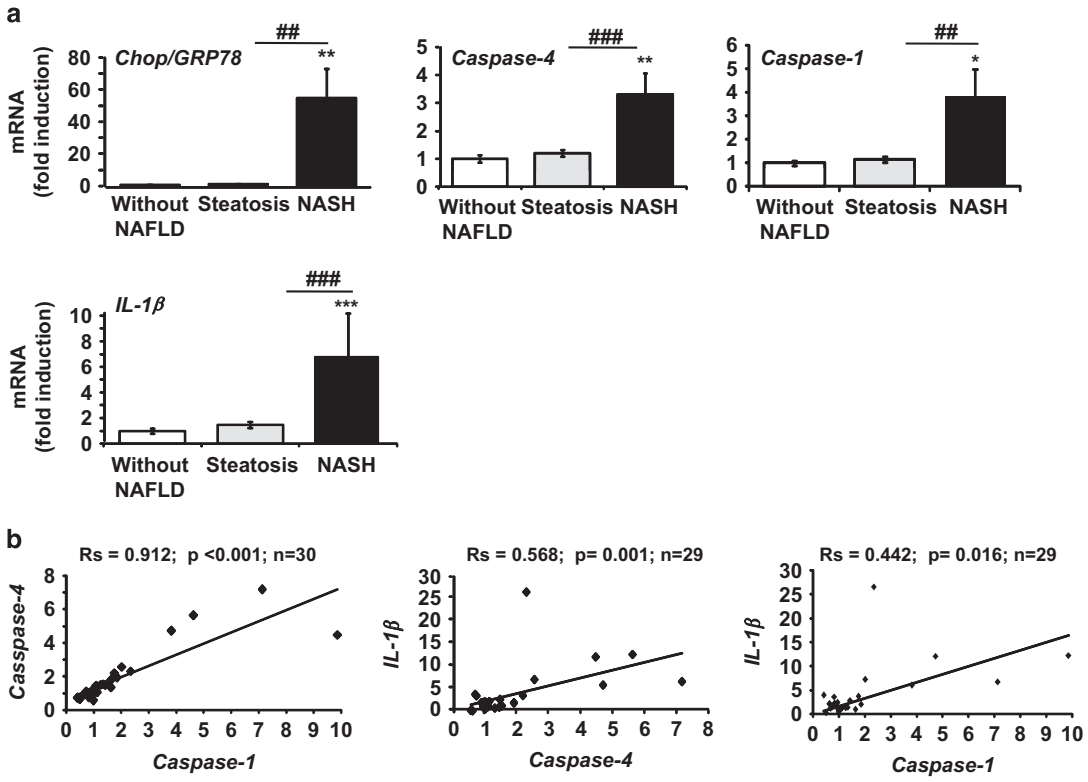


Figure 6 Increased expression of ER stress and inflammasome gene expression in human NASH. (**a**) The mRNA expression of *Chop*, *Grp78*, *caspase-4*, *caspase-1* and *IL-1β* (normalized to *RPLPO* mRNA) was measured in the livers of massively obese patients without NAFLD ($n=6$), with steatosis ($n=15$) or with NASH ($n=9$). Statistical significance of controls (patients without NAFLD) was determined with the Mann–Whitney test. (**b**) Correlation between NLRP3 inflammasome components at the relative mRNA expression level is shown. Correlation was evaluated using the Spearman's rank correlation test. Statistical significance from controls is denoted by $^{*}P\leq0.05$, $^{**,\#\#}P\leq0.01$, $^{***,\#\#\#}P\leq0.001$

tested by evaluating the expression of ER stress markers (*Chop* and *Grp78*) and inflammasome priming (*caspase-4*, which shares 60% homology with murine *caspase-11*), *caspase-1* and *IL-1β* in 30 obese subjects (Supplementary Table 1). The analysis of the mRNA levels showed a significant increase in both the deleterious [*Chop/Grp78*] ratio (54-fold increase), and inflammasome components (*caspase-4*, *caspase-1* and *IL-1β*) in NASH patients ($n=9$) compared with patients without NAFLD ($n=6$) and with steatosis ($n=15$, Figure 6a). These markers of ER stress and the inflammasome also correlated with the NAFLD Activity Score and liver injury, as evaluated by transaminase levels (Supplementary Table 2). In addition, we also found a positive correlation between the ER stress and level of inflammasome transcripts (Supplementary Table 2). The [*Chop/Grp78*] ratio correlated with the levels of *caspase-4* ($Rs=0.414$, $P=0.029$, $n=28$), *caspase-1* ($Rs=0.421$, $P=0.026$, $n=28$) and *IL-1β* ($Rs=0.46$, $P=0.016$, $n=27$) transcripts, which also correlated with each other (Figure 6b). These results indicate that ER stress and inflammasome platforms may cooperate in the progression from steatosis to NASH.

Discussion

Steatosis is an extremely common disorder affecting nearly 30% of the US population, among which 25% develop NASH with an inherent risk for progression to cirrhosis and hepatocarcinoma. Although the function of the NLRP3 inflammasome in myeloid immune cells has been well characterized, increasing evidence shows that the NLRP3 inflammasome activation also occurs in non-myeloid cells, namely hepatocytes,[30] in normal and pathogenic states. Nevertheless, studies have not examined whether the ER stress response stimulates hepatic NLRP3 inflammasome activation and associated cell death in NASH. Our studies suggest several potential mechanisms related to ER stress and inflammasome activation that cooperate to induce NASH development.

We first found that exaggerated ER stress obtained with LPS or TUNI in the steatotic liver leads to a transient state of NASH-like disease and the presence of hepatocyte pyroptotic cell death. Remarkably, in livers from *ob/ob* mice, challenge with LPS resulted in a degree of steatohepatitis that closely resembled human NASH, and two of the main pathological features, steatohepatitis foci and hepatocyte apoptosis, were also rapidly induced by the administration of TUNI to *ob/ob* mice. In addition, we demonstrated in these animal models that the ER stress effectors PERK and IRE1*α* converge on CHOP activation, thus increasing the activity of the NLRP3 inflammasome (caspase-11, caspase-1, IL-1*β*) and hepatic apoptosis (TUNEL positivity, caspase-3, BH3-only proteins). Second, a treatment with TUDCA dramatically reduces NLRP3 inflammasome activation and improves the NASH-pathological features in these models. Indeed, we have shown

that TUDCA, administered as a protective 5-day pretreatment or as a potential 6-h treatment in *ob/ob* LPS-injected mice, exhibits anti-inflammatory and hepatoprotective properties. Third, CHOP is a critical signaling node that links ER stress-induced cell death and inflammasome activation in hepatocytes. The level of CHOP activation was robust after LPS and TUNI co-treatment, which correlated with increased cell death and activation of caspase-11 and caspase-1. Genetic silencing of *Chop* strongly reduced the activation of caspase-11, -1 and IL-1β production, suggesting that *Chop* modulates caspase-11 and caspase-1 activation at the transcriptional level in hepatocytes. We also observed that TUDCA protected hepatocytes from LPS- and TUNI-induced inflammasome activation and cell death, thus phenocopying the effects observed in mice with TUDCA treatment. Importantly, we reported a significant increase in gene expression of *Chop* in the livers of NASH patients, which correlated with priming of the inflammasome markers *caspase-1*, *caspase-4* and *IL-1β*. These markers significantly correlated with liver injury (transaminases) and inflammation (presence of inflammatory foci and NAS score) suggesting that the cross-talk between ER stress and inflammasome is an important mediator in the pathophysiology of NASH.

Sustained inflammasome activation can trigger apoptosis and pyroptosis, resulting in DNA damage with positivity for TUNEL staining. We found an increase in TUNEL-positive hepatocytes in both livers from LPS- and TUNI-injected mice, which correlated with increased production of active caspase-1, caspase-11, IL-1β and of caspase-3, PERK and IRE1α activities. These results suggest that LPS and TUNI induce ER-dependent pyroptosis and apoptosis in the livers of *ob/ob* mice, whereas Z-YVAD-fmk and TUDCA blocked both pathways.

Our current data demonstrate for the first time a connection between ER stress activation and the presence of pyroptotic cell death in hepatocytes with a hyperactivated NLRP3 inflammasome. Importantly, we confirmed our results in a frequently used nutritional model of steatohepatitis by feeding mice with the MCD diet.

The role of CHOP in NAFLD remains unclear, as evidence demonstrated that MCD-diet-induced steatohepatitis was reduced in *Chop* knockout mice and that inflammation was exacerbated in macrophages from *Chop*-deficient mice[13] arguing for a cell autonomous effect of the *Chop* deficiency. Our results support a deleterious role of CHOP, driving both ER stress-induced hepatocyte death through the activation of BH3-only proteins[31] and the NLRP3 inflammasome activation in our experimental models. Herein, we demonstrated that CHOP expression correlated with Puma and Bax induction. These results are consistent with the concept that the induction of Puma is necessary for ER stress-induced apoptosis and can be linked to direct Bax activation, initiating mitochondrial dysfunction as a downstream consequence of ER stress.[32] These results are in accordance with the high hepatic expression levels of Puma and Bax found in patients with NASH contributing to hepatocyte lipoapoptosis.[33] Interestingly under stress conditions, Bax and Bak can activate IRE1α.[34] They could act as retro-positive controls amplifying ER stress apoptosis, inflammasome activation and downstream mitochondrial dysfunction in NASH models.

Transcriptionally, CHOP expression is regulated by ATF4, sXBP-1 and cATF6.[35] Therefore, the increase in CHOP expression observed in the steatotic livers of mice treated with LPS and TUNI could be a reflection of both PERK and IRE1α/sXBP1 activation, as ATF6 remained unchanged. The increase in phospho-JNK observed in these mice could also reflect IRE1α/TRAF2/ASK1 activation.[5] Interestingly, JNK is speculated to promote CHOP activity through phosphorylation,[5,6] thereby potentially reinforcing the PERK pathway and the IRE1α/sXBP-1-dependent pathway that increases CHOP production, inflammasome activation and hepatocyte death.

Such a connection between ER stress and inflammasome pathways has been recently suggested through the thioredoxin-interacting protein (TXNIP) which associates PERK and IRE1α with the NLRP3 inflammasome, thus activating β-cell death and contributing to diabetes.[36,37] We did not observe any variation of TXNIP protein expression in our experimental conditions suggesting that TXNIP does not seem to be a target of hepatic IRE1α and PERK, at least in our models (Supplementary Figure S8). Hyperactivated IRE1α or irremediable ER stress would also spontaneously generate ROS.[36] We found that the level of ROS production was slightly increased after LPS and TUNI co-treatment (Supplementary Figure S8). As ROS enhance the activation of NLRP3 inflammasome, they may further amplify effects of the IRE1α-PERK-CHOP axes to increase pyroptosis in our experimental conditions. Future studies seeking to characterize the tight link between ER stress and NLRP3 pathways and its contribution to liver inflammation and cell death are worth considering.

As other inflammasome pathways have been described,[38] our results support a model in which the severity of the ER stress response could activate these pathways, in hepatocytes and nonparenchymal cells, resulting in the induction of proinflammatory signaling, hepatocyte pyroptotic death and fibrosis in various liver pathologies, such as NASH, ASH and HCC. For example, AIM2 could be an attractive candidate as it senses damage-associated molecular patterns, such as cytoplasmic and mitochondrial DNA, which are increased in NASH patients.[39] AIM2 could form an NLRP3-independent inflammasome with Pycard and caspase-1, contributing to the pathological features of these liver diseases.

A therapeutic strategy that aims to target these common processes might be effective; TUDCA could provide such a strategy. In our animal models, it is possible that TUDCA decreases the amount of inflammatory mediators produced by activating inflammatory macrophages and the inflammatory microenvironment. Studies have reported that TUDCA decreases the amount of TNFα produced by inflammatory macrophages in a model of HCC.[40] TUDCA could also decrease the expression of TLR4, the receptor of LPS. In the liver, TLR4 is expressed in both hepatocytes and immune cells such as macrophages. TLR4 specifically activates IRE1α to increase cytokine production (IL-6 and TNFα) in macrophages.[41] Such a mechanism could also occur in hepatocytes contributing to amplify the inflammatory responses provoked by an LPS challenge

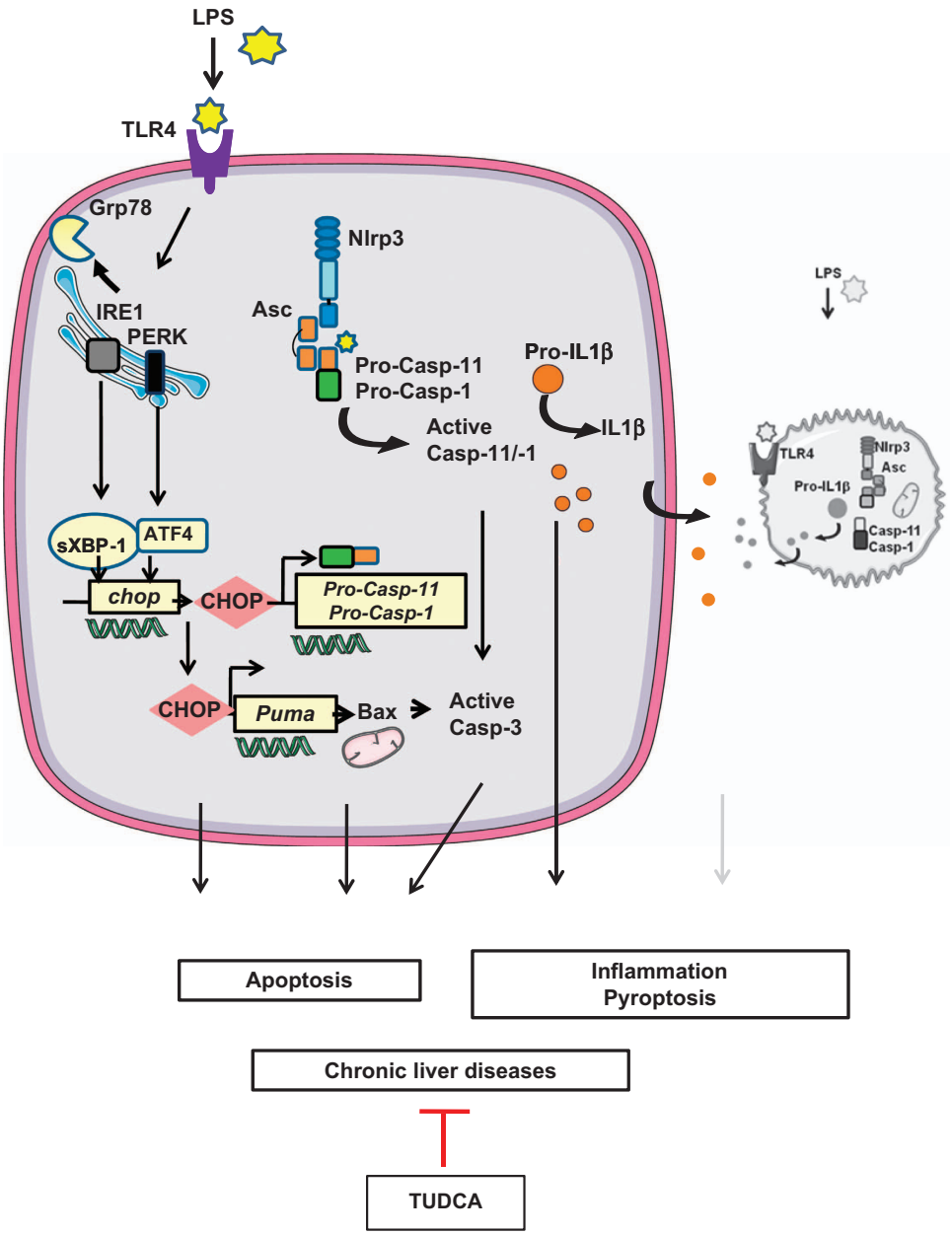


Figure 7 ER stress activates NLRP3 inflammasome and hepatocyte death in liver disorders. Endotoxinemia (LPS), a pathological condition found in chronic liver diseases, overwhelms hepatic IRE1α and PERK activities, leading to the overexpression of CHOP, which regulates the expression of *caspase-1*, *caspase-11* and Puma, and triggers hepatocyte pyroptosis and apoptosis. TUDCA increased the [GRP78/CHOP] ratio, promoting protection against ER-dependent NLRP3 inflammasome and cell death pathways. Using TUDCA, either alone or combined with hepatoprotective and anti-inflammatory interventions, could be a valid therapeutic strategy for the treatment of liver disorders

(Figure 7). Further studies are needed to fully answer this question.

In summary, we have demonstrated that ER stress leads to NLRP3 inflammasome activation, thus resulting in severe liver inflammation and hepatocyte pyroptotic death, and contributing as a novel mechanism of ER-mediated liver damage (Figure 7). In this way, blocking ER-dependent NLRP3 inflammasome and cell death pathways, with TUDCA alone, or combined with other hepatoprotective and anti-inflammatory interventions, may represent a valid therapeutic strategy for the treatment of liver disorders.

Materials and Methods

Animal care, mouse model and treatments. All the animal procedures were conducted in compliance with protocols approved by local ethical government authorities. Male, *ob/ob* mice (C57BL/6J-ob/ob), at 6 weeks of age were purchased from Janvier Laboratories (Saint-Berthevin, France). Experiments were started 2 weeks after the arrival of the mice in our animal facility. Four different treatment protocols were administered: (1) TUDCA was injected intraperitoneally (250 μg/g twice a day, total 500 μg/g/day) for 5 days. Control mice received the same volume of vehicle (PBS). Mice were subjected to a single LPS injection (2 μg/g) 6 h before being killed. (2) TUDCA and LPS were co-injected intraperitoneally at the above-mentioned concentrations for the duration of the 6-h treatment. Other mice were either injected with PBS, TUDCA or LPS 6 h before being killed, at the

concentrations stated previously. (3) Mice were intraperitoneally injected with tunicamycin (2 μg/g) or vehicle control (PBS) 6 h before being killed. All the mice were fed a normal chow diet (A04, Safe Diet, Augy, France). (4) Wild-type C57BL/6 male mice (16–18 weeks of age), from Janvier were fed a methionine- and choline-deficient diet (MCD, ref 960439) or control diet (ND) (ref 960440, MP BIO) for 2 weeks. Water was available *ad libitum*.

Biochemical analysis and cytokine measurement. Serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were determined using a standardized UV test after activation with pyridoxal-phosphate (Roche-Hitachi analyzer, ASTPM, ALTPM, Cobas, Meylan, France). The BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation Kit was used to quantitatively measure cytokines by flow cytometry as described previously.[42]

Histological evaluation. Liver tissue specimens were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned (5 μm thick), stained with hematoxylin–eosin, and then analyzed blindly by a liver pathologist.

TUNEL assay. Liver tissue specimens were embedded in paraffin and sectioned at 5 μm for processing by the TUNEL method using a commercial kit, using DAB peroxidase substrate (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France) and counterstained with methyl green. Specimens were evaluated by microscopy at high power magnification (×100) in a blinded manner. A total of 30 random fields were counted for each TUNEL-stained tissue sample. TUNEL assays on primary hepatocytes were performed following exactly the same procedure as we previously described.[43,44]

***In vitro* assay for viability.** Cell viability was determined by a colorimetric assay based on the ability of viable cells to reduce 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) as described,[45,46] generating a dark blue formazan product. Dissolved MTT was added to each well of the plate and the plate was incubated at 37 °C for 1 h. The absorbance at 550 nm was measured using a microplate spectrophotometer system (ELX800, Bio-TEK Instruments, Colmar, France). Results are presented as a percentage of the control values.

Real-time quantitative PCR analysis. Total RNA was extracted from liver tissue using an RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The samples were treated with Turbo DNA-free (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) or RNAse-free DNAse kit (Qiagen) following the manufacturer's protocols. The quality of the isolated RNA was determined using the Agilent 2100 Bioanalyser with RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Massy, France). Total RNA was reverse-transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Real-time quantitative PCR was performed using the ABI PRISM 7500/Step-One Fast Real Time PCR System following the manufacturer's protocols in C3M genomics facilities. The TaqMan gene expression assays were purchased from Applied Biosystems (Supplementary Materials and Methods). Gene expression values were normalized to the value of the housekeeping gene 36B4 (mice conditions) or RPLP0 (human conditions) and calculated on the basis of the comparative cycle threshold Ct method (22DDCt) as we described previously.[44,46]

Immunoblot analysis. Total liver protein was isolated from snap-frozen tissues, homogenized in detergent-containing buffer, normalized for the protein content (50 μg per sample), and analyzed by SDS-PAGE (8–15% gels) immunoblotting as previously described for ER stress studies[42,46] and for inflammasome studies.[47] Equal loading was assured by Ponceau S staining. Western blot analyses were performed using the primary antibodies described in Supplementary Materials and Methods. Antibody detection was accomplished using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Supplementary Materials and Methods) and an enhanced chemiluminescence method (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Immunoblots were scanned, and the signals were quantified using ImageJ software.

Cellular models and treatments. Hepatocytes from mouse liver were isolated by a two-step collagenase procedure, as we previously described.[46] Isolated cells were resuspended in Medium I (Williams' Medium E) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories, Villacoublay, France), 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamine, 0.02 UI/ml insulin (Humulin, Lilly, Fegersheim, France). Viability was evaluated by trypan blue exclusion (Sigma, St. Louis, MO, USA). Hepatocytes were incubated for 4 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2. For culture, Medium I was renewed with Medium II (a fetal bovine serum-free Medium I, supplemented instead with 0.5% bovine serum albumin). Hepatocytes were also pretreated with TUDCA (500 μg/ml) for 48 h or with Z-YVAD-fmk (25 μM) for 1 h in Medium II. Following these incubation times, tunicamycin (TUNI; 1 μg/ml), LPS (100 ng/ml) or [TUNI+LPS] was gently added to the culture for 24 h in Medium II. AML12 hepatocytes (CRL-2254, ATCC) were cultured in medium (DMEM, 4.5 g/l glucose, 100 units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and 2 mM L-glutamine) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories), under 5% CO_2 at 37 °C. The conditions for stimulation were the same.

siRNA transfection. Primary hepatocytes were transfected with *chop (ddit3)* siRNA (MSS273951, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or control siRNA (Invitrogen, Low) at 30 nM using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 48 h of transfection, the cells were then treated as indicated above.

Human studies. Morbidly obese patients ($n = 30$) were recruited through the Department of Digestive Surgery and Liver Transplantation (Nice Hospital) where they underwent bariatric surgery for their morbid obesity. Bariatric surgery was indicated for these patients in accordance with the French guidelines. Exclusion criteria were: presence of a hepatitis B or hepatitis C infection, excessive alcohol consumption (>20 g/day) or another cause of chronic liver disease, as previously described.[48] The characteristics of the study groups are given in Supplementary Table 1. Before surgery, fasting blood samples were obtained and used to measure ALT and AST aminotransaminases; glucose and insulin resistance were calculated using the homeostatic model assessment (HOMA-IR) index. Surgical liver biopsies were obtained during surgery and no ischemic preconditioning had been performed. Histopathological analysis was performed according to the scoring system of Kleiner *et al*.[49] Four histopathological features were semi-quantitatively evaluated: grade of steatosis (0, <5%; 1, 5–30%; 2, >30–60%; 3, >60%), lobular inflammation (0, no inflammatory foci; 1, <2 inflammatory foci per $\times 200$ field; 2, 2–4 inflammatory foci per $\times 200$ field; 3, >4 inflammatory foci per $\times 200$ field), hepatocellular ballooning (0, none; 1, few ballooned cells; 2, many cells/prominent ballooning) and stage of fibrosis (from none = 0, to cirrhosis = 4). All the subjects gave their informed written consent to participate in this study in accordance with the French legislation regarding Ethics and Human Research (Huriet–Serusclat law). The "Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale de Nice" approved the study (07/04:2003, N°03.017).

Statistical analysis. Statistical significance of differential gene expression between the two study groups was determined using the non-parametric Mann–Whitney test with the ΔCt of each group. Correlations were analyzed using the Spearman's rank correlation test. Other data from mice and cells were statistically analyzed by Student's *t*-test or ANOVA and *post hoc* analysis for multiple group comparison. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. Statistical significance from controls is denoted by $^{*}P \leqslant 0.05$, $^{**}P \leqslant 0.01$, $^{***}P \leqslant 0.001$. Following the same pattern, # denotes statistical significance between specified groups.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was supported by grants from INSERM (France), the University of Nice, the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Centre Hospitalier Universitaire Nice) and charities (Association Française pour l'Etude du Foie (AFEF)/Aptalis, Société Francophone du Diabète (SFD/MSD), Benjamin Delessert, Fondation Recherche Médicale (FRM) to BBM; EFSD/Lilly European Diabetes Research Programme, SFD, SFD/Roche Pharma, AFEF/LFB to PG). This work and CL were funded by the French Government (National Research Agency, ANR) through the 'Investments for the Future' LABEX SIGNALIFE: program reference #ANR-11-LABX-0028-01. We thank Dr. Sandrine Marchetti and Dr. Jean-Louis Nahon for scientific discussions. We thank the C3M Animal Facility team for their assistance with animal care.

1. Henao-Mejia J, Elinav E, Jin C, Hao L, Mehal WZ, Strowig T *et al.* Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 2012; **482**: 179–185.
2. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1221–1231.

3. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; **306**: 457–461.
4. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM *et al.* Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008; **134**: 568–576.
5. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005; **115**: 2656–2664.
6. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 1249–1259.
7. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA *et al.* Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* 2005; **280**: 847–851.
8. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS *et al.* Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes* 2009; **58**: 693–700.
9. Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 2008; **320**: 1492–1496.
10. Oyadomari S, Harding HP, Zhang Y, Oyadomari M, Ron D. Dephosphorylation of translation initiation factor 2alpha enhances glucose tolerance and attenuates hepatosteatosis in mice. *Cell Metab* 2008; **7**: 520–532.
11. Gonzalez-Rodriguez A, Mayoral R, Agra N, Valdecantos MP, Pardo V, Miquilena-Colina ME *et al.* Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1179.
12. Toriguchi K, Hatano E, Tanabe K, Takemoto K, Nakamura K, Koyama Y *et al.* CHOP deficiency attenuates steatohepatitis, fibrosis and carcinogenesis in mice fed an MCD diet. *J Gastroenterol Hepatol* 2014; **29**: 1109–1118.
13. Malhi H, Kropp EM, Clavo VF, Kobrossi CR, Han J, Mauer AS *et al.* C/EBP homologous protein-induced macrophage apoptosis protects mice from steatohepatitis. *J Biol Chem* 2013; **288**: 18624–18642.
14. Goodall JC, Wu C, Zhang Y, McNeill L, Ellis L, Saudek V *et al.* Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 17698–17703.
15. Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, Castro RE, Ramalho RM, Baptista A *et al.* Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF-kappaB in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients. *Am J Gastroenterol* 2004; **99**: 1708–1717.
16. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL *et al.* The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011; **17**: 179–188.
17. Lamkanfi M, Dixit VM. Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol Rev* 2009; **227**: 95–105.
18. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D *et al.* Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; **56**: 1761–1772.
19. Ruiz AG, Casafont F, Crespo J, Cayon A, Mayorga M, Estebanez A *et al.* Lipopolysaccharide-binding protein plasma levels and liver TNF-alpha gene expression in obese patients: evidence for the potential role of endotoxin in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Obes Surg* 2007; **17**: 1374–1380.
20. Vyberg M, Ravn V, Andersen B. Pattern of progression in liver injury following jejunoileal bypass for morbid obesity. *Liver* 1987; **7**: 271–276.
21. Shanab AA, Scully P, Crosbie O, Buckley M, O'Mahony L, Shanahan F *et al.* Small intestinal bacterial overgrowth in nonalcoholic steatohepatitis: association with toll-like receptor 4 expression and plasma levels of interleukin 8. *Dig Dis Sci* 2011; **56**: 1524–1534.
22. Stienstra R, Joosten LA, Koenen T, van Tits B, van Diepen JA, van den Berg SA *et al.* The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab* 2010; **12**: 593–605.
23. Stienstra R, van Diepen JA, Tack CJ, Zaki MH, van de Veerdonk FL, Perera D *et al.* Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 15324–15329.
24. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; **116**: 3015–3025.
25. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; **19**: 107–120.
26. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D *et al.* Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell Death Differ* 2015; **22**: 58–73.
27. Day CP, James OF. *Steatohepatitis: a tale of two 'hits'? Gastroenterology* 1998; **114**: 842–845.
28. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 2557–2562.
29. Kudo H, Takahara T, Yata Y, Kawai K, Zhang W, Sugiyama T. Lipopolysaccharide triggered TNF-alpha-induced hepatocyte apoptosis in a murine non-alcoholic steatohepatitis model. *J Hepatol* 2009; **51**: 168–175.
30. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A *et al.* NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation and fibrosis. *Hepatology* 2014; **59**: 898–910.
31. Li J, Lee B, Lee AS. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *J Biol Chem* 2006; **281**: 7260–7270.
32. Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP *et al.* Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2009; **36**: 487–499.
33. Cazanave SC, Elmi NA, Akazawa Y, Bronk SF, Mott JL, Gores GJ. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; **299**: G236–G243.
34. Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B *et al.* Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* 2006; **312**: 572–576.
35. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 381–389.
36. Lerner AG, Upton JP, Praveen PV, Ghosh R, Nakagawa Y, Igbaria A *et al.* IRE1alpha induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metab* 2012; **16**: 250–264.
37. Oslowski CM, Hara T, O'Sullivan-Murphy B, Kanekura K, Lu S, Hara M *et al.* Thioredoxin-interacting protein mediates ER stress-induced beta cell death through initiation of the inflammasome. *Cell Metab* 2012; **16**: 265–273.
38. Lamkanfi M, Dixit VM. The inflammasomes. *PLoS Pathog* 2009; **5**: e1000510.
39. Brunt EM. Pathology of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res* 2005; **33**: 68–71.
40. Nakagawa H, Umemura A, Taniguchi K, Font-Burgada J, Dhar D, Ogata H *et al.* ER stress cooperates with hypernutrition to trigger TNF-dependent spontaneous HCC development. *Cancer Cell* 2014; **26**: 331–343.
41. Martinon F, Chen X, Lee AH, Glimcher LH. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol* 2010; **11**: 411–418.
42. Bailly-Maitre B, Belgardt BF, Jordan SD, Coornaert B, von Freyend MJ, Kleinridders A *et al.* Hepatic Bax inhibitor-1 inhibits IRE1alpha and protects from obesity-associated insulin resistance and glucose intolerance. *J Biol Chem* 2010; **285**: 6198–6207.
43. Bailly-Maitre B, de Sousa G, Zucchini N, Gugenheim J, Boulukos KE, Rahmani R. Spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes: molecular mechanisms and regulation by dexamethasone. *Cell Death Differ* 2002; **9**: 945–955.
44. Patouraux S, Rousseau D, Rubio A, Bonnafous S, Lavallard VJ, Lauron J *et al.* Osteopontin deficiency aggravates hepatic injury induced by ischemia-reperfusion in mice. *Cell Death Dis* 2014; **5**: e1208.
45. Bailly-Maitre B, de Sousa G, Boulukos K, Gugenheim J, Rahmani R. Dexamethasone inhibits spontaneous apoptosis in primary cultures of human and rat hepatocytes via Bcl-2 and Bcl-xL induction. *Cell Death Differ* 2001; **8**: 279–288.
46. Bailly-Maitre B, Fondevila C, Kaldas F, Droin N, Luciano F, Ricci JE *et al.* Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 2809–2814.
47. Bruey JM, Bruey-Sedano N, Luciano F, Zhai D, Balpai R, Xu C *et al.* Bcl-2 and Bcl-XL regulate proinflammatory caspase-1 activation by interaction with NALP1. *Cell* 2007; **129**: 45–56.
48. Anty R, Marjoux S, Iannelli A, Patouraux S, Schneck AS, Bonnafous S *et al.* Regular coffee but not espresso drinking is protective against fibrosis in a cohort mainly composed of morbidly obese European women with NAFLD undergoing bariatric surgery. *J Hepatol* 2012; **57**: 1090–1096.
49. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; **41**: 1313–1321.

Cell Death and Disease **is an open-access journal published by** ***Nature Publishing Group*****. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 Unported License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/**

Supplementary Information accompanies this paper on Cell Death and Disease website (http://www.nature.com/cddis)

1.2. Revue

1.2.1. « The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects » (Le Thuc et al., 2015)

Au cours de ma thèse, nous avons publié une revue, dont je suis le premier auteur, sur l'implication des chimiokines dans le cerveau, notamment en conditions de pathologies neuroinflammatoires (Le Thuc et al., 2015).

Dans cette revue, nous évoquons le rôle des chimiokines dans le cerveau en conditions physiologiques, mais surtout, nous nous intéressons à la contribution complexe des chimiokines en cas de neuroinflammation. En effet, en fonction du contexte inflammatoire, notamment en terme de durée, une même chimiokine peut avoir au départ des effets inflammatoires bénéfiques, visant à protéger le cerveau de la cause de l'inflammation, et, en conditions inflammatoires chroniques, avoir des effets au contraire délétère, participant souvent au développement de pathologies.

Dans ce contexte, nous nous sommes particulièrement intéressés aux rôles des chimiokines CX3CL1, CXCL12 et CCL2, dans deux pathologies neuroinflammatoires, l'une aiguë, l'accident vasculaire cérébral, et l'autre chronique, la maladie d'Alzheimer.

Ann. N.Y. Acad. Sci. ISSN 0077-8923

ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES
Issue: *Neuroimmunomodulation in Health and Disease*

The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects

Ophélia Le Thuc, Nicolas Blondeau, Jean-Louis Nahon, and Carole Rovère

Université de Nice Sophia Antipolis, Nice, France, and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Valbonne, France

Address for correspondence: Carole Rovère, Ph.D., Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660 route des Lucioles, Valbonne, 06560, France. rovere@ipmc.cnrs.fr

Inflammation is an innate mechanism that defends organisms against harmful stimuli. Inflammation leads to the production and secretion of proinflammatory mediators that activate and recruit immune cells to damaged tissues, including the brain, to resolve the cause of inflammation. In the central nervous system, inflammation is referred to as neuroinflammation, which occurs in various pathological conditions of the brain. The primary role of neuroinflammation is to protect the brain. However, prolonged and/or inappropriate inflammation can be harmful for the brain, from individual cells to the whole tissue. This review focuses on a particular type of inflammatory mediator, chemokines, and describes their complex effects both under physiological and pathophysiological conditions of the brain. The clinical relevance of the multiple characters of chemokines is highlighted with respect to acute and chronic inflammation of the brain, including their actions in stroke and Alzheimer's disease, respectively.

Keywords: chemokines; neuroinflammation; central nervous system; neuromodulation; CNS disorders

Introduction

Inflammation is an innate mechanism that defends organisms against harmful stimuli that can be either nonaseptic (e.g., bacterial infection, viral invasion) or aseptic (e.g., inflammatory response generated in response to tissue mechanical damage). Immune challenges immediately trigger nonspecific innate immune responses, which are mediated by tissue resident leukocytes that induce the expression of cellular adhesion molecules by endothelial cells to recruit circulating immune cells to the damaged tissue. These immune cells are activated and attracted by cytokines that are abundantly produced and concentrated near the damaged site. Locally, monocytes differentiate to macrophages, which produce an additional broad panel of inflammatory mediators (proinflammatory cytokines, nitric oxide, prostaglandins) that boost cell activation and recruitment. If maintained and/or amplified, there is a risk that the local inflammatory response could become systemic. In this context, inflammation features also include fever, activation of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis and behavioral changes.

Even though the central nervous system (CNS; the brain and spinal cord) was long considered as immune privileged, inflammation may take place within the CNS and is referred to as neuroinflammation, the cause of which can be either central or peripheral. Indeed, bidirectional communication exists between the immune system and the CNS through neural, humoral, and cellular pathways. Neuroinflammation is mediated primarily by microglia, as well as astrocytes, which can interact with immune cells from the periphery. Peripheral inflammation and neuroinflammation involve the release of similar proinflammatory mediators, such as cytokines, chemokines, and nitric oxide.

The first described neuroinflammatory mediators were cytokines (such as interleukin-1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNF-α) and, to a lesser extent, IL-6), which have been primarily involved in the effects of inflammation on brain function

doi: 10.1111/nyas.12855

and disease. Yet, downstream actors may link these cytokines to the functional and behavioral changes induced by inflammation. Indeed, IL-1β and TNF-α, which are able to stimulate their own synthesis, also induce the synthesis of other proinflammatory cytokines, such as IL-6 and chemokines (chemotactic cytokines).

Among cytokines, chemokines are small heparin-binding proteins (8–14 kDa), primarily known for their role in the attraction of circulating leukocytes to sites of inflammation or injury during immune responses. In fact, they are endowed with the capacity for chemoattraction and activation of immune and nonimmune cells, both *in vitro* and *in vivo.*

Chemokines and their receptors are suspected to be major mediators of the neuroinflammation effects, from the attraction of immune cells to behavioral changes. Indeed, the chemokine system (chemokine ligands and their cognate receptors) participates in the immune response. In addition, the chemokine system is constitutively and unevenly expressed in the brain with respect to chemokine-expressing cells and brain regions, similar to the expression of various neurotransmitter and neuropeptide systems.[1,2] Furthermore, the chemokine system has been found to interact with specific neurotransmitter and neuropeptide systems,[3,4] and recent reports suggest that it is capable of direct neuromodulation; thus, the chemokine system may be responsible for behavioral changes associated with inflammation.[5–7]

In addition to mediating immune responses, chemokines and their receptors are involved in physiological processes that are important for ensuring normal brain function by driving crosstalk between neurons, glial cells, and peripheral immune cells.[4,8] This review highlights the complex role of chemokines in physiological and pathophysiological conditions in the brain. Also discussed are the multiple characters of chemokines in acute and chronic inflammation, including in different stages of the pathological process for the same disease, thus providing a time frame of opportunity for drugs targeting chemokine signaling.

Chemokine ligands and receptors: structure and nomenclature

To date, over 50 chemokines have been found and systemically classified into four families according to their structure (number and spacing of cysteine residues at the N-terminus).[9] These families are named CXC (α), CC (β), CX3C (δ), and C (γ). Chemokines (except the C family) contain four cysteine residues, forming disulfide bonds that determine their three-dimensional shape.

Chemokines exert their biological effects through cell-surface receptors belonging to the superfamily of seven-transmembrane domain G protein–coupled receptors (GPCRs). Chemokine receptors are approximately 40 kDa in size. Most chemokines bind to several distinct chemokine receptors, and most chemokine receptors bind to several chemokines.[10] A chemokine ligand binding to its cognate receptor elicits distinct signaling cascades that are specific for each chemokine ligand/receptor pairing. Yet, atypical chemokine receptors also exist: they do not transduce all of the chemokine receptor signals that are responsible for chemotaxis and other cellular responses but influence availability and function of chemokines.

Chemokine ligands and receptors are designated by their family name followed by "L" or "R" symbolizing a ligand or a receptor, respectively, and finally by a specific number (e.g., CX3CL1 and CX3CR1; CCL2 and CCR2; or CXCL12, CXCR4, and CXCR7).

Besides the structural classification of chemokines, other classifications have emerged on the basis of their functional roles, from the simplest classification describing a dichotomy between the pro- and anti-inflammatory potential of chemokines, to the most recent classification distinguishing three functional groups that classify inflammatory, homeostatic, or dual-function chemokines. Inflammatory chemokines are essentially upregulated during inflammation and are primarily involved in leukocyte recruitment to inflamed tissues. Homeostatic chemokines are constitutively expressed in lymphoid and other organs and mediate normal migration and homing of various cells, including leukocytes. Finally, dual-function chemokines cannot be assigned to either of the previous categories without ambiguity.[11,12] Such functional classification may be subject to constant evolution, as a function of the progress in the field. For the sake of clarity, our examples were primarily based on the structural classification focusing on chemokines with four cysteine residues from the CXC, CC, and CX3C families.

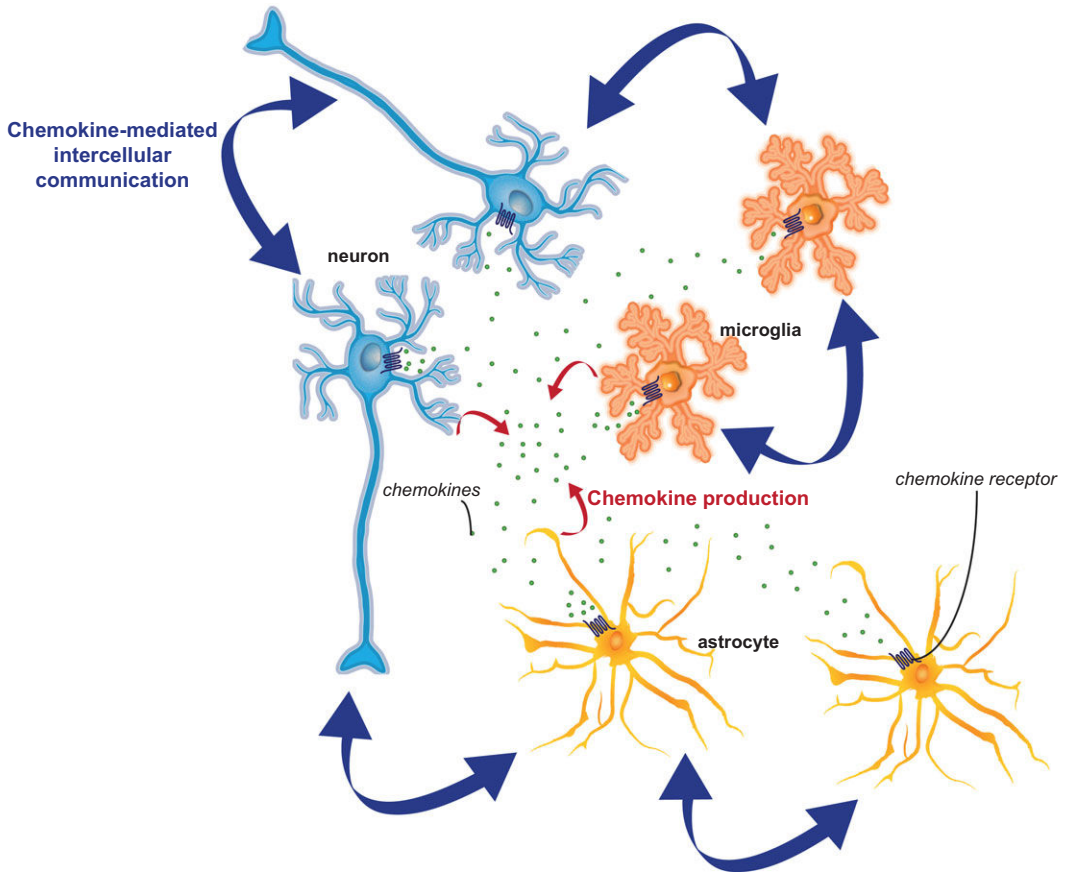


Figure 1. Chemokines mediate communication between cell types in the brain. In the brain, different cell types, such as neurons, astrocytes, and microglia, produce chemokines and express chemokine receptors in both physiological and pathophysiological contexts. Thus, chemokines can mediate neuron–astrocyte, neuron–microglia, microglia–astrocyte, microglia–microglia, astrocyte–astrocyte, and neuron–neuron communication. These interconnections involve chemokines in physiological (such as the regulation of hydric metabolism) and pathophysiological contexts.

Chemokines in the central nervous system

In the brain, glial cells (astrocytes, oligodendrocytes, and microglia), vascular endothelial cells, and neurons constitutively express both chemokines and their receptors. Consequently, besides its well-documented role in the immune system, the chemokine system may participate in important physiological or pathophysiological processes in the CNS, through paracrine or autocrine activity.[13] This hypothesis is supported by their specific distribution in the brain and their interaction with various neurotransmitter and neuropeptide systems (Fig. 1).[3,4]

In physiological conditions, chemokines and other inflammatory mediators acting on microglia and astrocytes contribute to physiological processes, such as memory, learning, brain development, and synapse formation (Fig. 2). The physiological roles of chemokines engage mainly (1) chemotaxis, involved in CNS development and homeostatic migration, and homing and turnover of various cells, including neural precursors in the adult brain, and (2) neuromodulation (modulation of the release of neuropeptides and neurotransmitters with induction of presynaptic release of glutamate, gamma-aminobutyric acid (GABA), and/or postsynaptic increase of intracellular calcium levels), as illustrated by the effect of CXCL12 on arginine vasopressin (AVP) neuron firing and AVP release.[7,10]

From physiological to pathophysiological inflammatory contexts, the main change in chemokines is their increased expression, which could account,

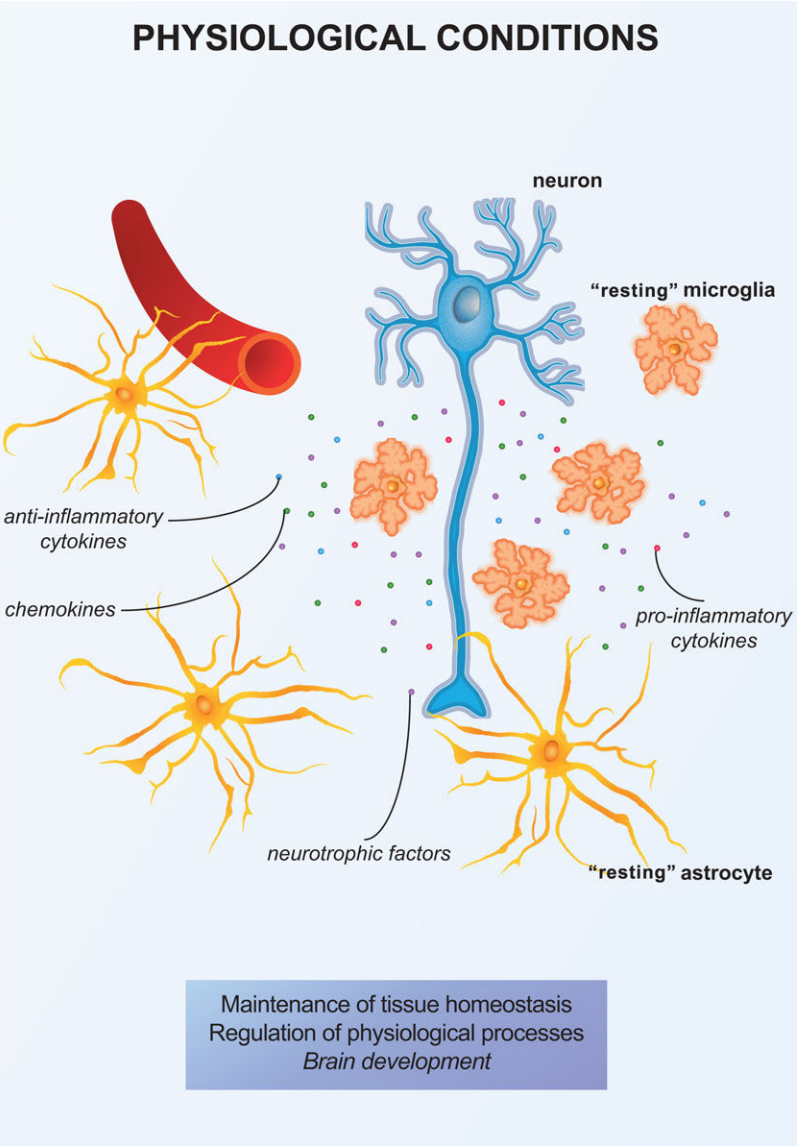


Figure 2. Effects of chemokines in physiological conditions in the brain. Shown in the frame are processes in which chemokines participate. In physiological conditions, neurons, astrocytes, and microglia are in close contact. When nonactivated or "resting" microglia and astrocytes participate in the maintenance of tissue homeostasis and in the regulation of brain functions (synapse remodeling, scanning brain parenchyma for pathogens and damage) that are supported by production and release of neurotrophic factors and pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines. In physiological conditions, chemokines participate in the maintenance of tissue homeostasis and the regulation of physiological processes in the adult CNS and also participate in brain development.

at least in part, for the difference in the effects of the same ligand/receptor pairs. Indeed, during inflammation, chemokines are upregulated and their most described feature is the chemoattraction of immune cells from the periphery to the brain, which in turn maintains inflammation through chemokine secretion, among other processes. They have also been involved in the activation of resident microglia and astrocytes. Recruitment and activation of these various cell types induce the release of inflammatory factors that can become deleterious for neuronal survival and function. Yet, even if

insufficient data are presently available to confirm this finding, we cannot exclude the possibility that chemokines could exert altered neuromodulatory effects in inflammatory conditions.

This review focuses on the three most studied chemokines in the adult CNS—CX3CL1, CCL2, and CXCL12, and their receptors—because of their actions in acute or chronic inflammatory contexts, such as cerebral ischemia and Alzheimer's disease (AD), respectively.

CX3CL1 or fractalkine/neurotactin. CX3CL1 is the only member of the CX3C family and is one of the only two transmembrane chemokines, the second being CXCL16. CX3CL1 is composed of 373 amino acids and contains particular domains: a mucin-like stalk and a transmembrane α helix. CX3CL1, reported to have membrane-bound and soluble forms, is converted to a soluble form after cleavage from the plasma membrane by metalloproteinases of the ADAM family (a desintegrin and metalloproteinase) or by the cysteine protease cathepsin S.[14] These two forms may have distinct roles within the same compartment and also different actions depending on the type of tissue. The two forms of CX3CL1 bind to only one receptor, CX3CR1, with a similar affinity. CX3CL1 is expressed by monocytes, T cells, natural killer cells, smooth muscle cells, and several CNS cell types.[14–16] Indeed, CX3CL1 is constitutively expressed in the CNS, mostly in neurons of the hippocampus and to a lesser extent in astrocytes.[17] Microglia do not express CX3CL1, but Hatori *et al.* reported that microglial cells, along with neurons, express its receptor, CX3CR1.[17] This suggests that neurons and astrocytes expressing CX3CL1 can communicate with microglia and neurons expressing the receptor, allowing CX3CL1/CX3CR1 contribution to normal functional maturation of synapses in the cortex.[18] CX3CL1/CX3CR1 signaling in the CNS could also be involved in pathophysiological contexts.[14]

CCL2 or monocyte chemoattractant protein-1. CCL2 is a member of the monocyte chemoattractant proteins (MCPs), a group of CC chemokines that are known to recruit monocytes to damaged tissues after trauma, infection, toxin exposure, or ischemia.[9] There are five MCPs known to date (CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), CCL13 (MCP-4), and CCL12 (MCP-5)), which share 60–70% sequence homology and structural similarity.[19] CCL2 was the first discovered and is the best characterized. In humans, CCL2 is composed of 76 amino acids and its molecular weight is approximately 15 kDa. Many different cell types, such as endothelial and smooth muscle cells, fibroblasts, epithelial cells, monocytes, astrocytes, microglial cells, and neurons in distinct neuroanatomical regions, can produce CCL2.[19] CCL2 exerts its effects through the receptor CCR2. Most studies on the role of CCL2 in neurons have been carried out in pathological contexts; therefore, very little is known about CCL2 constitutive neuronal expression.[14,20–22]

CXCL12 or stromal cell–derived factor 1. Six human isoforms (α, β, γ, δ, ε, φ) of CXCL12/stromal cell–derived factor-1 (SDF-1) have been characterized, whereas only three (α, β, γ) have been described in the rat and mouse. These isoforms result from an alternative splicing of the same mRNA precursor. SDF1-α is the most common and the smallest isoform (89 amino acids). All splice variants encode functional proteins that can bind to two different receptors, CXCR4 and CXCR7. CXCL12 is a known chemoattractant for leucocytes and neurons and is, along with its receptor CXCR4, extensively and constitutively expressed in the developing and adult CNS. CXCL12 protein and mRNA have been found to be expressed in acetylcholine-, dopamine-, and AVP-containing neurons in distinct regions of the rat brain.[23] Interestingly, CXCL12 and its receptor CXCR4 are coexpressed in different neuronal populations, such as hypothalamic melanin-concentrating hormone (MCH) neurons, AVP-containing neurons in the supraoptic nucleus, and nociceptive primary sensory neurons.[5,7,24]

Chemokines in neuroinflammation: from physiological to pathophysiological responses

After injury, chemokines, like other inflammatory mediators, normally contribute to a beneficial controlled and adapted inflammatory response to end the causative stimulus and allow recovery. However, there is often poor recovery after a CNS insult, suggesting a failure of tissue repair–like responses.[25] Even though initially beneficial, an inflammatory response that is prolonged or inadequate could promote tissue damage beyond the originally

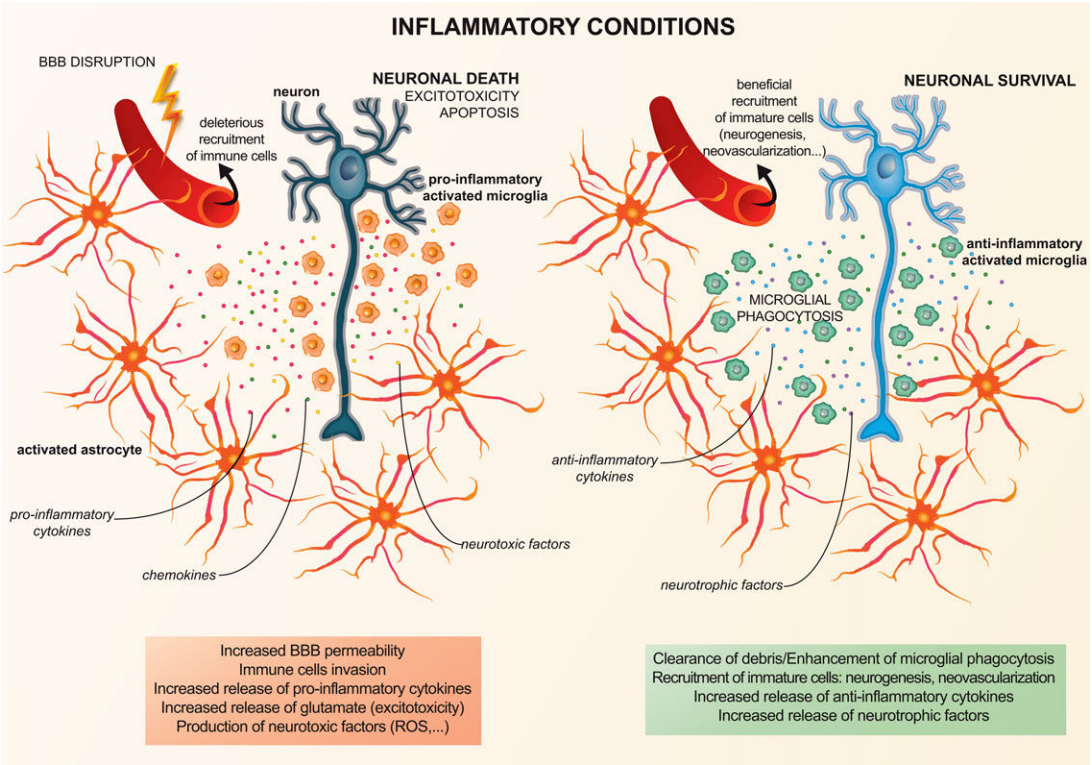


Figure 3. **Beneficial and detrimental effects of chemokines in inflammatory conditions in the brain. Shown in the frames are processes in which chemokines participate. In inflammatory conditions, neuroinflammation can be dysfunctional, leading to neurotoxicity or anti-inflammatory actions. The features of maladaptive neuroinflammation that can induce neuronal death are gliosis (increased number and activation of glial cells), proinflammatory activation profile of microglia, disruption of the BBB (increased permeability), immune cell invasion, glutamate-induced excitotoxicity, apoptosis, and overproduction of proinflammatory mediators and neurotoxic factors (e.g., ROS). In these conditions, chemokines participate in BBB disruption, detrimental immune cell recruitment, the increase in the release of proinflammatory cytokines and of neurotoxic factors and excitotoxicity. On the contrary, anti-inflammatory actions during neuroinflammation include anti-inflammatory activation of microglia (with enhancement of phagocytic capacity), neurogenesis, neovascularization, and increased release of anti-inflammatory cytokines and neurotrophic factors. These processes participate in neuronal survival and damage limitation. Chemokines can favor enhancement of microglial phagocytosis, neurogenesis, and neovascularization through the recruitment of immature cells from the circulation and release of anti-inflammatory cytokines and neurotrophic factors. Abbreviations: BBB, blood–brain barrier; ROS, reactive oxygen species.**

injured site, further leading to impairment of synaptic function and neuronal death, thus contributing to an aggravation of brain disease.

Inflammation can either be acute or chronic. Acute inflammation occurs within seconds to days following tissue damage (by a mechanical injury, for example), whereas chronic inflammation occurs over longer periods of time as a result of a persistent activation of immune responses by, for example, unresolved infections or autoimmune reactions (Fig. 3). In this review, we focus on ischemic stroke and AD—two mechanistically different, yet both neuroinflammatory, conditions (acute and chronic, respectively)—to investigate the roles of CXCL12, CX3CL1, and CCL2 and their receptors in neuroinflammation.

Chemokines in acute neuroinflammation: example of cerebral ischemic stroke

Stroke or cerebral vascular accident corresponds to an interruption of brain blood supply that can be ischemic or hemorrhagic. Ischemic stroke, in which a blood clot blocks a blood vessel in the brain, is the most common form of stroke and, according to the World Health Organization, the second leading cause of death in the world. Mechanisms

underlying CNS tissue damage induced by stroke include excitotoxicity, peri-infarct depolarizations, inflammation, and apoptosis.[26] Inflammatory responses after stroke involve numerous cell types, including leukocytes, endothelial cells, astrocytes, microglia, and neurons, and most proinflammatory mediators, including cytokines and chemokines, are upregulated after stroke. In stroke, inflammation seems to have both detrimental and beneficial effects. Activation of resident cells (microglia, astrocytes, endothelial cells) appears to be neuroprotective and promotes brain regeneration/recovery, whereas recruitment of immune cells with a subsequent increase in the expression of inflammatory mediators, such as reactive oxygen species (ROS), cytokines, and chemokines, together with blood–brain barrier (BBB) disruption, could lead to edema, neuronal death, and hemorrhagic transformation.[27] Chemokines in stroke attracted the interest of researchers in the first place because of their central role in leukocyte invasion, one of the key events of the inflammatory response. Several studies conducted over the past few years have provided some insight into the different roles, beneficial or detrimental, of chemokines in stroke.

The literature on CX3CL1, CXCL12, and CCL2 in stroke describes opposite effects, depending on the window of observation after stroke. Detrimental effects of chemokines appear primarily linked to their proinflammatory ability to recruit and activate monocytes and resident microglia, which promote the development of disproportionate inflammation that is detrimental to neurons. The late effects appear to be beneficial and mainly linked to their constitutive ability to attract immature cells that will participate in poststroke recovery.

Several studies with murine middle cerebral artery occlusion (MCAo) models of cerebral ischemic stroke have shown that deficient CX3CL1/CX3CR1 signaling induces a reduction of postischemic consequences: excitotoxicity, production of ROS, proinflammatory cytokine release, BBB damage, leukocyte infiltration, neuronal apoptosis, and infarction size.[28–31] These reports identified CX3CL1/CX3CR1 signaling as an actor in stroke pathophysiology, especially through activation of microglia, astrocytes, or macrophages toward a proinflammatory detrimental state. On the other hand, other studies have shown neuroprotective effects of this signaling in cerebral ischemia[30,32,33] in that a strong positive correlation was found between high plasmatic concentration of CX3CL1 and better clinical outcome in stroke patients.[34] Interestingly, Rosito *et al.* implicate the transmembrane chemokine CXCL16, the adenosine receptor A_3R, and CCL2 as downstream effectors of CX3CL1 signaling for neuroprotection against glutamate excitotoxicity.[32] They proposed a mechanism of chemokine-induced chemokine release, involving a signaling loop between neurons, astrocytes, and microglia that may participate in the limiting of brain damage after ischemia, by counteracting glutamate-induced neuronal excitotoxic death. It is worth noting that the adenosine receptors A_1R and $A_{2A}R$, previously reported to be involved in neuroprotection, were later linked to CX3CL1-mediated neuroprotective effects.[35,36] The beneficial role of CX3CL1/CX3CR1 signaling in stroke is still disputed as it may take part in both aggravation of stroke-induced damage, by enhancement of the proinflammatory cascade mediated by monocyte-derived cells and proinflammatory molecules (cytokines, ROS), and in neuroprotection, through inhibition of excitotoxicity (to note, CX3CL1/CX3CR1 has been shown to protect rat hippocampal neurons from glutamate-mediated excitotoxic death through modulation of ERK/MEK and PI3-K/AKT pathways).[32,36,37]

The most studied chemokine signaling in cerebral ischemia is certainly CCL2 and its receptor CCR2. In the MCAo rat model, both CCL2 protein and mRNA levels were found to be significantly increased hours after the operation and remained high several days after MCAo.[38] An increase in CCL2 expression was found in neurons in early stages of stroke and in astrocytes days later.[39] Many studies have found that disrupting CCL2/CCR2 signaling in rodents decreased the number of infiltrating monocytes/macrophages, together with reduced levels of proinflammatory cytokine production and BBB permeability, and that it was associated with a reduction in the infarct volume.[40–43] Another study also showed functional benefits of the disruption of CCL2/CCR2 signaling in a model of combined radiation/traumatic brain injury. In this study, hippocampal-dependent cognitive impairment was reduced in CCR2-deficient mice.[44] In addition, CCL2 may be one major actor in BBB disruption in neuroinflammatory conditions after stroke. According to Strecker *et al.*, the decrease in

BBB permeability observed after MCAo in *Ccl2*$^{-/-}$ mice would be linked to the transcriptional effects of CCL2 on BBB-related genes.[45]

On the other hand, CCL2/CCR2 may also participate in regeneration after ischemia, as well as in maintenance of the neurovascular unit. CCL2, secreted by activated glial cells after stroke, may play a role in neurogenesis after stroke, attracting neuroblasts derived from neuroprogenitor cells (NPCs) from the subventricular zone toward the ischemic region.[46] In addition, it appears that CCL2/CCR2 can prevent the transformation of the ischemic infarct into a hemorrhagic one, by recruiting bone marrow–derived monocytes/macrophages to the brain and by preserving the integrity of the neurovascular unit, through activation of a transforming growth factor-β (TGF-β) pathway.[47] Taken together, these data attribute once again a dual role to chemokine signaling in stroke. CCL2/CCR2 signaling (enhancing the acute ischemia–induced inflammatory response through cytokine production, altered BBB permeability, and immune cell recruitment) contributes to ischemia-induced damage in the brain, whereas it also appears to induce neurogenesis and maintain the neurovascular unit over the long term, through microglia and hematogenous macrophage recruitment and migration of neural precursor cells.

Finally, disrupting CXCL12/CXCR4 signaling during the acute phase of ischemic stroke reduces proinflammatory responses and the infarct volume in MCAo models in rodents. Indeed, blocking CXCL12/CXCR4 seems to prevent early massive recruitment of invasive leukocytes to the ischemic site and reduces the expression of proinflammatory cytokines, precluding the development of a detrimental acute ischemia–induced inflammation. In addition, blocking CXCL12/CXCR4 also limits the BBB disruption that usually occurs after MCAo.[48,49] Therefore, a detrimental role has been attributed to CXCL12/CXCR4 interaction in the early stages of stroke. On the contrary, it was shown in a permanent MCAo mouse model that CXCL12 expression might be beneficial in late recovery phases after stroke, once the acute ischemia–induced inflammation is resolved. CXCL12/CXCR4 signaling promoted neurovascular recovery in the ischemic region, as it stimulated both neurogenesis (through enhancement of proliferation, migration, and maturation of neural progenitor cells) and angiogenesis.[50] Interestingly, Li *et al.* also observed a CXCL12/CXCR4–dependent neovascularization after stroke.[51] Further evidence supporting a beneficial role of CXCL12 in cerebral ischemia was observed in an ischemic preconditioning paradigm in which ischemic brain extracts were shown to stimulate the release of CXCL1 and CXCL5 that bind to CXCR2 in C6 astrocytoma cells to induce the production and release of CXCL12, which, in turn, promotes neuroprotection.[52] This echoes results found for CX3CL1/CX3CR1 and CCL2/CCR2, emphasizing the role of chemokines in detrimental proinflammatory processes as well as in beneficial neuroprotective repair actions.

Taken together, these results suggest that the detrimental effects of chemokines in stroke are linked to their proinflammatory properties, particularly the recruitment and activation of macrophages from the peripheral blood circulation and the proinflammatory activation of resident microglia. On the other hand, chemokines appear to play an important role in recovery as well, by attracting immature cells and macrophages/monocytes derived from bone marrow, thought to become anti-inflammatory microglia, in order to induce neuronal and vascular recovery.

Chemokines in chronic neuroinflammation: example of Alzheimer's disease

AD, the most common form of dementia, is a neurodegenerative disorder whose histopathological hallmarks are intracellular neurofibrillary tangles (NTFs), formed by aggregates of hyperphosphorylated tau protein, and extracellular senile plaques, which are aggregates of amyloid-β (Aβ) peptide. The neurological symptoms of AD are linked to neuroinflammation with astrogliosis, accumulation of macrophages and microglia around senile plaques, production of proinflammatory cytokines and chemokines, and neuronal death. Many different murine AD models exist, most of which are transgenic mice or rats bearing mutations favoring the development of senile plaques (e.g., APP/PS1 mice that overexpress human mutated APP and bear a mutation of presenilin 1 (*Psen1*) that promotes detrimental cleaving of APP) and/or NTFs. The participation of neuroinflammation in the pathogenesis of neurodegenerative diseases (e.g., AD, Parkinson's disease, multiple sclerosis) was often attributed to microglial activation and proliferation and

accumulation of infiltrated macrophages and leukocytes. In AD, the recruitment of immune cells from the periphery seems limited. The neuroinflammatory mechanisms in AD include mainly the promotion of neuroinflammation by activated astrocytes and resident microglia. The latter finally acquires a dystrophic phenotype via its constant activation by inflammatory mediators through a vicious circle. The dystrophic microglia is globally nonfunctional and thus unable to clear Aβ, leading to neurodegeneration and neuronal loss.[53] Because of their implication in the activation of immune cells and the regulation of neuron–microglia crosstalk, chemokines have been extensively studied in AD. CX3CL1, CCL2, and CXCL12 have also been proposed to participate both in the pathogenesis of AD and its protection, suggesting a dual role of these chemokines.

CX3CL1/CX3CR1 signaling would affect the two main pathological features of AD (Aβ deposition and phosphorylated tau accumulation) in opposite ways, favoring amyloid pathology development and opposing tau pathology.[54–56] In one study, a gene dose–dependent decrease of Aβ deposition was observed in the APP/PS1 mouse model of AD deficient for CX3CR1. The authors proposed that this effect on Aβ deposition was due to an enhanced capability of microglia to uptake fibrillar Aβ and that CX3CL1 could decrease microglial phagocytic activity via CX3CR1 signaling.[54] On the contrary, mice overexpressing human APP and deficient for CX3CR1 exhibited an increased tau pathology, microglial activation, expression of proinflammatory markers (IL-1β, TNF-α, IL-6), neuronal death in the dentate gyrus, and decreased memory retention.[55] This underlines the idea that CX3CR1 may be a key microglial mediator of the protection against AD-related cognitive deficits linked to aberrant microglial activation and overproduction of inflammatory cytokines. A recent study by Lee *et al.* aimed to determine the contribution of soluble versus membrane-bound forms of CX3CL1 in Aβ and tau pathologies. The absence of the membrane-bound form of this chemokine may be responsible for the observed aggravation in tau pathology and the reduction in Aβ load, as the transgenic expression of the soluble form in *Cx3cl1*$^{-/-}$ APP/PS1 mice does not rescue the phenotype. Conversely, Nash *et al.* showed that the overexpression of the soluble form of CX3CL1, in mouse models of Aβ and tau pathologies (APP/PS1 and Tg4510 mice, respectively), reduced tau pathology, lowered microglial activation, and prevented neuronal degeneration, without further increasing Aβ burden. This is in contradiction to the findings on CX3CR1 deficiency.[57] The discrepancy in the results from Lee *et al.* and Nash *et al.* might be explained by the use of different models, as constitutive CX3CL1 deficiency may have induced compensation mechanisms and impaired the immune environment. Finally, CX3CL1 plasma levels were found elevated in mild cognitive impairment (MCI) and mild AD patients.[58] In humans, a higher CX3CL1 gene expression in the brains of AD patients versus controls, especially in the early stages of AD, was observed. The authors also showed that this increase is more important in brain regions that are vulnerable to AD-induced changes, such as the hippocampus.[59] Thus, CX3CL1 could be an interesting early biomarker of AD. Taken together, these data suggest a beneficial role of CX3CL1/CX3CR1 in tau pathology by favoring an anti-inflammatory context, whereas it would have a detrimental effect on Aβ pathology by impairing microglial phagocytic capacity.

A dual role of CCL2 was also shown in AD. CCL2 was first suggested to play a role in AD pathogenesis because it was found to be upregulated in mature senile plaques, microglia, and in microvessels of AD patients.[60,61] In addition, CCL2 expression was also increased in the brains of AD transgenic mice.[62] Yet, whether CCL2 overexpression in AD brains is a cause or consequence of this pathology remains unclear. Indeed, Aβ was shown to induce production of CCL2 by cultured astrocytes and microglia *in vitro* and *in vivo* by monocytes, endothelial cells, and microglia.[63–65] Overproduction of CCL2 could, in turn, induce monocyte differentiation, but also monocyte and leukocyte recruitment, from the blood to the brain through the disrupted BBB, thus enhancing neuroinflammation and AD pathogenesis.[66–68] Interestingly, CCL2 expression was found to be increased in cerebrospinal fluid (CSF) and serum of patients in the early stages of AD (MCI or mild AD), whereas in late stages of AD, CCL2 expression was decreased in the serum, although it remained high in the CSF.[69,70] Therefore, high serum CCL2 levels could represent an early biomarker for AD, whereas CCL2 expression in the CSF could reflect the progression of the disease (to note, increased CCL2 expression in the CSF

was linked to increased neurodegeneration). In an AD mouse model, CCL2 deficiency accelerated Aβ deposition and oligomer formation, with accumulation of microglia in Aβ plaque areas, decreased Aβ phagocytosis, acceleration of cognitive impairment, and alteration of neurogenesis in the dentate gyrus.[71] In addition, El Khoury *et al.* demonstrated that CCR2 deficiency in early stages impairs microglial accumulation, thus increasing the deposition of Aβ.[72] It was also suggested that CCR2 deficiency accelerates AD onset with an increase in mnesic defects and Aβ deposition. Thus, an early protective role of CCL2/CCR2, as well as a late neurotoxic effect of this signaling, was described.[62]

CXCL12/CXCR4 signaling was also studied in AD. For example, higher CXCR4 gene and protein levels were found in the brains of AD patients compared to those of controls.[73] In contrast, in a transgenic mouse model of AD (APP transgene insertion 2576 (*Tg(APPSWE)2576Kha2576*) mutation with overproduction of human APP), a correlation was found between cognitive impairment and lower gene and protein levels of CXCL12 and CXCR4.[74] In agreement, a decrease in CXCL12 plasmatic concentration was reported in AD patients and negatively correlated to levels of tau protein in the CSF.[75] The treatment with AMD3100 (specific inhibitor of CXCR4) induced cognitive impairment, supporting the hypothesis that low levels of CXCL12/CXCR4 are linked to cognitive deficits. These cognitive impairments observed in this model may be due, at least in part, to an effect of Aβ on CXCL12 signaling. A recent study suggests that the beneficial effect of CXCL12/CXCR4 on memory and learning in AD could be linked to the prevention of dendritic regression and neuronal apoptosis induced by Aβ. Intracerebroventricular (icv) injections of Aβ in mice lowered spine density and dendrite length of CA1 hippocampal neurons, while pretreatment with CXCL12, through activation of AKT and ERK1/2 pathways, inhibited this Aβ-induced neurotoxicity. Similar results were found *in vitro* in cultured neurons.[76] Finally, treatment of APP/PS1 mice with CXCL12 (intracerebroventricular injection) induced the recruitment of bone marrow–derived microglia (a well-known role of CXCL12) to the brain, which is thought to be neuroprotective, contrary to activated resident CNS microglia. These effects were associated with a decrease in number and area of Aβ deposits in brain parenchyma.[77] Taken together, CXCL12/CXCR4 signaling may be beneficial in AD. The decrease of CXCL12 could be responsible for cognitive impairments, underlining a constitutive crucial role of CXCL12/CXCR4 signaling in memory and learning processes. In addition, CXCL12/CXCR4 signaling could also participate in neuroprotective processes through a decrease in Aβ neurotoxicity.

Altogether, the results on CX3CL1/CX3CR1, CCL2/CCR2, and CXCL12/CXCR4 suggest a time-related discrepancy in their effects. In general, it is mainly their ability to modulate microglial activity that seems to be involved, especially whether it favors or prevents Aβ clearance. However, mechanisms responsible for chemokine effects in AD need to be further investigated.

Conclusion

Chemokines appear to be very active in cerebral pathogenic and repair processes in neuroinflammatory contexts. Indeed, the data that we described on the role of chemokines in stroke and AD clearly underline their significance as endogenous mediators between the different brain cell types to orchestrate either physiological neuroprotective or pathophysiological mechanisms. The ability of chemokines to attract and activate immune and nonimmune cells seems detrimental during overactivation of the inflammatory response, whereas, in post-acute inflammatory phases, this ability, associated with the capacity of chemokines to regulate microglial function, may enhance recovery and protection. The data discussed in this review highlight the idea that a similar chemokine ligand/chemokine receptor pair can mediate different effects, depending on the physiological or pathophysiological conditions, and also underline the importance of the time frame in determining the impact of the chemokine system on the brain. Taking this notion into consideration raises the question of the feasibility of therapeutic targeting of chemokine ligands and receptors in neuroinflammatory contexts, which will not be achievable without increasing our knowledge on the therapeutic windows and specific cell types and/or specific brain regions to target.

Neuroinflammation, which is meant to protect the brain from damage, also induces behavioral changes, suggesting its potential to modify neural activity. In this aspect, the chemokine system is a

particularly interesting candidate because it shows similarities with neurotransmitter and neuropeptide systems. For example, it is unevenly distributed and interactions have been shown between these systems. Indeed, chemokines have recently been shown to be able to constitutively modulate neuronal activity (for review, see Ref. 10). Nevertheless, little data to date have directly addressed the constitutive or induced neuromodulatory effect of specific chemokines on the different neuronal systems. Yet, CXCL12 has been shown to modulate the activity of hypothalamic MCH neurons, AVP neurons in the supraoptic nucleus, and dopaminergic neurons in the substantia nigra in noninflammatory contexts.[6,7,78] These kinds of interactions may attribute a new role to chemokines in neuroendocrine function. For instance, inflammation has repeatedly been linked to reduced appetite (in AD, stroke, cancer, and aging), suggesting that chemokine ligands and receptors may modulate neuropeptidergic systems involved in the regulation of feeding behavior (such as the orexigenic MCH system). In this context, preliminary data from our lab suggest that CCL2 induces a hyperpolarization of hypothalamic MCH neurons, with which it colocalizes.[79] Thus, CCL2, inhibiting MCH activity, could participate in the decrease in appetite observed with acute inflammation.

Furthermore, while this review focuses on the implication of chemokines in high-grade neuroinflammation, it would also be interesting to understand chemokine effects in low-grade neuroinflammation, such as in obesity, considering the putative effects of CCL2 on the MCH system. Indeed, obesity has only recently been linked to hypothalamic neuroinflammation; thus, an interesting question to ask would be: In obesity, can one or several moderately upregulated chemokine(s) modulate neuronal circuits involved in feeding behavior regulation so that food intake is increased?

Since the identification of chemokines and cognate receptors in the brain,[8,10] great progress has been made in characterizing the mechanisms of action of these immune factors. Studies deciphering chemokine functioning under acute and chronic inflammatory diseases provide information on novel signaling pathways and demonstrate complex interactions among these molecules. Consequently, drugs with specific activity toward the candidate chemokines are awaited to test the validity of the proposed mode of action in human diseases.

Acknowledgments

We would like to thank Jacques Noël and Etienne Audinat for their critical reading of the manuscript. This work was mainly supported by CNRS, Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20150331738), and by the French Government (National Research Agency, ANR) through the Investments for the Future LABEX SIGNALIFE, program reference # ANR-11-LABX-0028-01 [Correction added on August 28, 2015, after first online publication: In the preceding sentence, "(Equipe FRM DEQ20150331738)" was inserted after "Fondation pour la Recherche Medicale"].

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Banisadr, G., F. Queraud-Lesaux, M.C. Boutterin, *et al.* 2002. Distribution, cellular localization and functional role of CCR2 chemokine receptors in adult rat brain. *J. Neurochem.* **81:** 257–269.
2. van der Meer, P., A.M. Ulrich, F. Gonzalez-Scarano, *et al.* 2000. Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5, and CXCR4 in the human brain: potential mechanisms for HIV dementia. *Exp. Mol. Pathol.* **69:** 192–201.
3. Adler, M.W. & T.J. Rogers. 2005. Are chemokines the third major system in the brain? *J. Leukoc. Biol.* **78:** 1204–1209.
4. Rostene, W., M.A. Dansereau, D. Godefroy, *et al.* 2011. Neurochemokines: a menage a trois providing new insights on the functions of chemokines in the central nervous system. *J. Neurochem.* **118:** 680–694.
5. Guyon, A., G. Banisadr, C. Rovere, *et al.* 2005. Complex effects of stromal cell-derived factor-1 alpha on melanin-concentrating hormone neuron excitability. *Eur. J. Neurosci.* **21:** 701–710.
6. Guyon, A., C. Rovere, A. Cervantes, *et al.* 2005. Stromal cell-derived factor-1alpha directly modulates voltage-dependent currents of the action potential in mammalian neuronal cells. *J. Neurochem.* **93:** 963–973.
7. Callewaere, C., G. Banisadr, M.G. Desarmenien, *et al.* 2006. The chemokine SDF-1/CXCL12 modulates the firing pattern of vasopressin neurons and counteracts induced vasopressin release through CXCR4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103:** 8221–8226.
8. Rostene, W., A. Guyon, L. Kular, *et al.* 2011. Chemokines and chemokine receptors: new actors in neuroendocrine regulations. *Front. Neuroendocrinol.* **32:** 10–24.
9. Charo, I.F. & R.M. Ransohoff. 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N. Engl. J. Med.* **354:** 610–621.

10. Rostene, W., P. Kitabgi & S.M. Parsadaniantz. 2007. Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat. Rev. Neurosci.* **8:** 895–903.
11. Moser, B., M. Wolf, A. Walz, *et al.* 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* **25:** 75–84.
12. Zlotnik, A. & O. Yoshie. 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity* **36:** 705–716.
13. Cardona, A.E., M. Li, L. Liu, *et al.* 2008. Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **84:** 587–594.
14. Reaux-Le Goazigo, A., J. VanSteenwinckel, W. Rostene, *et al.* 2013. Current status of chemokines in the adult CNS. *Prog. Neurobiol.* **104:** 67–92.
15. Apostolakis, S. & D. Spandidos. 2013. Chemokines and atherosclerosis: focus on the CX3CL1/CX3CR1 pathway. *Acta Pharmacol. Sin.* **34:** 1251–1256.
16. Sheridan, G.K. & K.J. Murphy. 2013. Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biol.* **3:** 130181.
17. Hatori, K., A. Nagai, R. Heisel, *et al.* 2002. Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. *J. Neurosci. Res.* **69:** 418–426.
18. Hoshiko, M., I. Arnoux, E. Avignone, *et al.* 2012. Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J. Neurosci.* **32:** 15106–15111.
19. Deshmane, S.L., S. Kremlev, S. Amini, *et al.* 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res.* **29:** 313–326.
20. Banisadr, G., R.D. Gosselin, P. Mechighel, *et al.* 2005. Highly regionalized neuronal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in rat brain: evidence for its colocalization with neurotransmitters and neuropeptides. *J. Comp. Neurol.* **489:** 275–292.
21. Coughlan, C.M., C.M. McManus, M. Sharron, *et al.* 2000. Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. *Neuroscience* **97:** 591–600.
22. Meng, S.Z., A. Oka & S. Takashima. 1999. Developmental expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the human cerebellum and brainstem. *Brain Dev.* **21:** 30–35.
23. Banisadr, G., D. Skrzydelski, P. Kitabgi, *et al.* 2003. Highly regionalized distribution of stromal cell–derived factor-1/CXCL12 in adult rat brain: constitutive expression in cholinergic, dopaminergic and vasopressinergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* **18:** 1593–1606.
24. Reaux-Le Goazigo, A., C. Rivat, P. Kitabgi, *et al.* 2012. Cellular and subcellular localization of CXCL12 and CXCR4 in rat nociceptive structures: physiological relevance. *Eur. J. Neurosci.* **36:** 2619–2631.
25. Shechter, R. & M. Schwartz. 2013. CNS sterile injury: just another wound healing? *Trends Mol. Med.* **19:** 135–143.
26. Dirnagl, U., C. Iadecola & M.A. Moskowitz. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* **22:** 391–397.
27. Jin, R., G. Yang & G. Li. 2010. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J. Leukoc. Biol.* **87:** 779–789.
28. Soriano, S.G., L.S. Amaravadi, Y.F. Wang, *et al.* 2002. Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *J. Neuroimmunol.* **125:** 59–65.
29. Denes, A., S. Ferenczi, J. Halasz, *et al.* 2008. Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28:** 1707–1721.
30. Cipriani, R., P. Villa, G. Chece, *et al.* 2011. CX3CL1 is neuroprotective in permanent focal cerebral ischemia in rodents. *J. Neurosci.* **31:** 16327–16335.
31. Tang, Z., Y. Gan, Q. Liu, *et al.* 2014. CX3CR1 deficiency suppresses activation and neurotoxicity of microglia/macrophage in experimental ischemic stroke. *J. Neuroinflammation* **11:** 26.
32. Rosito, M., C. Lauro, G. Chece, *et al.* 2014. Trasmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 drive interplay between neurons, microglia and astrocytes to counteract pMCAO and excitotoxic neuronal death. *Front. Cell. Neurosci.* **8:** 193.
33. Pimentel-Coelho, P.M., J.P. Michaud & S. Rivest. 2013. Evidence for a gender-specific protective role of innate immune receptors in a model of perinatal brain injury. *J. Neurosci.* **33:** 11556–11572.
34. Donohue, M.M., K. Cain, D. Zierath, *et al.* 2012. Higher plasma fractalkine is associated with better 6-month outcome from ischemic stroke. *Stroke* **43:** 2300–2306.
35. Blondeau, N., H. Plamondon, C. Richelme, *et al.* 2000. K(ATP) channel openers, adenosine agonists and epileptic preconditioning are stress signals inducing hippocampal neuroprotection. *Neuroscience* **100:** 465–474.
36. Lauro, C., M. Catalano, E. Di Paolo, *et al.* 2014. Fractalkine/CX3CL1 engages different neuroprotective responses upon selective glutamate receptor overactivation. *Front. Cell. Neurosci.* **8:** 472.
37. Limatola, C., C. Lauro, M. Catalano, *et al.* 2005. Chemokine CX3CL1 protects rat hippocampal neurons against glutamate-mediated excitotoxicity. *J. Neuroimmunol.* **166:** 19–28.
38. Wang, X. & G.Z. Feuerstein. 1995. Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia. *J. Neurotrauma.* **12:** 825–832.
39. Che, X., W. Ye, L. Panga, *et al.* 2001. Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res.* **902:** 171–177.
40. Hughes, P.M., M.S. Botham, S. Frentzel, *et al.* 2002. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. *Glia* **37:** 314–327.
41. Dimitrijevic, O.B., S.M. Stamatovic, R.F. Keep, *et al.* 2006. Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26:** 797–810.
42. Dimitrijevic, O.B., S.M. Stamatovic, R.F. Keep, *et al.* 2007. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke* **38:** 1345–1353.
43. Schilling, M., J.K. Strecker, E.B. Ringelstein, *et al.* 2009. The role of CC chemokine receptor 2 on microglia activation and blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res.* **1289:** 79–84.

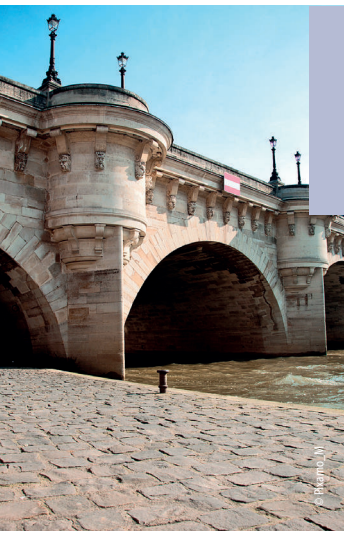
44. Allen, A.R., K. Eilertson, S. Sharma, *et al.* 2013. Effects of radiation combined injury on hippocampal function are modulated in mice deficient in chemokine receptor 2 (CCR2). *Radiat. Res.* **180:** 78–88.
45. Strecker, J.K., J. Minnerup, K. Schutte-Nutgen, *et al.* 2013. Monocyte chemoattractant protein-1-deficiency results in altered blood-brain barrier breakdown after experimental stroke. *Stroke* **44:** 2536–2544.
46. Liu, X.S., Z.G. Zhang, R.L. Zhang, *et al.* 2007. Chemokine ligand 2 (CCL2) induces migration and differentiation of subventricular zone cells after stroke. *J. Neurosci. Res.* **85:** 2120–2125.
47. Gliem, M., A.K. Mausberg, J.I. Lee, *et al.* 2012. Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models. *Ann. Neurol.* **71:** 743–752.
48. Huang, J., Y. Li, Y. Tang, *et al.* 2013. CXCR4 antagonist AMD3100 protects blood-brain barrier integrity and reduces inflammatory response after focal ischemia in mice. *Stroke* **44:** 190–197.
49. Ruscher, K., E. Kuric, Y. Liu, *et al.* 2013. Inhibition of CXCL12 signaling attenuates the postischemic immune response and improves functional recovery after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33:** 1225–1234.
50. Li, Y., J. Huang, X. He, *et al.* 2014. Postacute stromal cell-derived factor-1alpha expression promotes neurovascular recovery in ischemic mice. *Stroke* **45:** 1822–1829.
51. Mao, L., M. Huang, S.C. Chen, *et al.* 2014. Endogenous endothelial progenitor cells participate in neovascularization via CXCR4/SDF-1 axis and improve outcome after stroke. *CNS Neurosci. Ther.* **20:** 460–468.
52. Shin, J.H., Y.M. Park, D.H. Kim, *et al.* 2014. Ischemic brain extract increases SDF-1 expression in astrocytes through the CXCR2/miR-223/miR-27b pathway. *Biochim. Biophys. Acta* **1839:** 826–836.
53. Heppner, F.L., R.M. Ransohoff & B. Becher. 2015. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **16:** 358–372.
54. Lee, S., N.H. Varvel, M.E. Konerth, *et al.* 2010. CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models. *Am. J. Pathol.* **177:** 2549–2562.
55. Cho, S.H., B. Sun, Y. Zhou, *et al.* 2011. CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **286:** 32713–32722.
56. Lee, S., G. Xu, T.R. Jay, *et al.* 2014. Opposing effects of membrane-anchored CX3CL1 on amyloid and tau pathologies via the p38 MAPK pathway. *J. Neurosci.* **34:** 12538–12546.
57. Nash, K.R., D.C. Lee, J.B. Hunt, Jr., *et al.* 2013. Fractalkine overexpression suppresses tau pathology in a mouse model of tauopathy. *Neurobiol. Aging* **34:** 1540–1548.
58. Kim, T.S., H.K. Lim, J.Y. Lee, *et al.* 2008. Changes in the levels of plasma soluble fractalkine in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **436:** 196–200.
59. Strobel, S., E. Grunblatt, P. Riederer, *et al.* 2015. Changes in the expression of genes related to neuroinflammation over the course of sporadic Alzheimer's disease progression: CX3CL1, TREM2, and PPARγ. *J. Neural Transm.* **122:** 1069–1076.
60. Ishizuka, K., T. Kimura, R. Igata-yi, *et al.* 1997. Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin. Neurosci.* **51:** 135–138.
61. Grammas, P. & R. Ovase. 2001. Inflammatory factors are elevated in brain microvessels in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **22:** 837–842.
62. Naert, G. & S. Rivest. 2013. A deficiency in $CCR2^{+}$ monocytes: the hidden side of Alzheimer's disease. *J. Mol. Cell. Biol.* **5:** 284–293.
63. Smits, H.A., A. Rijsmus, J.H. vanLoon, *et al.* 2002. Amyloid-beta-induced chemokine production in primary human macrophages and astrocytes. *J. Neuroimmunol.* **127:** 160–168.
64. Meda, L., S. Bernasconi, C. Bonaiuto, *et al.* 1996. Beta-amyloid (25-35) peptide and IFN-gamma synergistically induce the production of the chemotactic cytokine MCP-1/JE in monocytes and microglial cells. *J. Immunol.* **157:** 1213–1218.
65. El Khoury, J.B., K.J. Moore, T.K. Means, *et al.* 2003. CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J. Exp. Med.* **197:** 1657–1666.
66. Vukic, V., D. Callaghan, D. Walker, *et al.* 2009. Expression of inflammatory genes induced by beta-amyloid peptides in human brain endothelial cells and in Alzheimer's brain is mediated by the JNK-AP1 signaling pathway. *Neurobiol. Dis.* **34:** 95–106.
67. Berger, O., X. Gan, C. Gujuluva, *et al.* 1999. CXC and CC chemokine receptors on coronary and brain endothelia. *Mol. Med.* **5:** 795–805.
68. Roberts, T.K., E.A. Eugenin, L. Lopez, *et al.* 2012. CCL2 disrupts the adherens junction: implications for neuroinflammation. *Lab. Invest.* **92:** 1213–1233.
69. Galimberti, D., C. Fenoglio, C. Lovati, *et al.* 2006. Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **27:** 1763–1768.
70. Galimberti, D., N. Schoonenboom, P. Scheltens, *et al.* 2006. Intrathecal chemokine synthesis in mild cognitive impairment and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **63:** 538–543.
71. Kiyota, T., H.E. Gendelman, R.A. Weir, *et al.* 2013. CCL2 affects beta-amyloidosis and progressive neurocognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **34:** 1060–1068.
72. El Khoury, J., M. Toft, S.E. Hickman, *et al.* 2007. Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat. Med.* **13:** 432–438.
73. Weeraratna, A.T., A. Kalehua, I. Deleon, *et al.* 2007. Alterations in immunological and neurological gene expression patterns in Alzheimer's disease tissues. *Exp. Cell Res.* **313:** 450–461.

74. Parachikova, A. & C.W. Cotman. 2007. Reduced CXCL12/CXCR4 results in impaired learning and is downregulated in a mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* **28:** 143–153.
75. Laske, C., K. Stellos, E. Stransky, *et al.* 2008. Decreased plasma and cerebrospinal fluid levels of stem cell factor in patients with early Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **15:** 451–460.
76. Raman, D., S.Z. Milatovic, D. Milatovic, *et al.* 2011. Chemokines, macrophage inflammatory protein-2 and stromal cell-derived factor-1alpha, suppress amyloid beta-induced neurotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **256:** 300–313.
77. Wang, Q., Y. Xu, J.C. Chen, *et al.* 2012. Stromal cell-derived factor 1alpha decreases beta-amyloid deposition in Alzheimer's disease mouse model. *Brain Res.* **1459:** 15–26.
78. Guyon, A., D. Skrzydelski, I. DeGiry, *et al.* 2009. Long term exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release. *Neuroscience* **162:** 1072–1080.
79. Le Thuc, O., N. Blondeau, W. Rostène, *et al.* 2013. The chemokine MCP1 mediates inflammation-induced anorexia through its action on hypothalamic MCH neurons. Presented at 11ème Colloque de la Société des Neurosciences, Lyon, France, 21–24 May 2014.

2. Autres publications

2.1. Résumé de congrès

Au cours de ma thèse, j'ai aussi eu l'opportunité de pouvoir rédiger avec Elise Laperrousaz, elle-même doctorante à l'Université Paris Diderot, le résumé de la 1ère Journée Thématique de la Société de NeuroEndocrinologie qui s'est déroulée les 29 et 30 septembre 2014 à Paris sur le thème « Régulation centrale du métabolisme énergétique, nouveaux concepts, nouveaux espoirs ». Ce résumé est paru dans une revue destinée à un public médical, « Correspondances en Métabolismes Hormones Diabète et Nutrition ».



Journée thématique de la Société de neuroendocrinologie

Les 29 et 30 septembre, Université Paris Diderot, Paris

Elise Laperrousaz*, Ophélia Le Thuc**

Cette année, J. Cohen-Tannoudji, N. de Roux et S. Luquet ont organisé une journée thématique* "Régulation centrale du métabolisme énergétique, nouveaux concepts, nouveaux espoirs", *pour la Société de neuroendocrinologie (SNE, www.societe-neuroendocrinologie.fr/). Deux demi-journées, les 29 et 30 septembre, ont réuni chercheurs francophones en neuroendocrinologie et médecins endocrinologues, dans un format novateur alliant conférences plénières, communications orales classiques ou rapides, et posters.

De nouvelles approches thérapeutiques pour le syndrome métabolique

M. Tschöp, directeur de l'IDO (*Institute for Diabetes and Obesity*, Munich) a présenté 2 stratégies pharmacologiques innovantes pour traiter l'obésité, à laquelle est très souvent lié un syndrome métabolique. Le principe est d'améliorer des molécules dont on connaît les effets bénéfiques, mais qui ne sont pas suffisamment efficaces ou qui ont des effets délétères. Première stratégie : tromper le cerveau en mimant la chirurgie bariatrique grâce à des multiagonistes (des récepteurs des incrétines par exemple), mais unimoléculaires. Se fixant à un seul des récepteurs à la fois, ils agissent néanmoins sur tous les systèmes pour potentialiser les effets bénéfiques et éviter les effets délétères de chaque agoniste *(1)*. Deuxième stratégie : un couplage stable, à l'incrétine *Glucagon-Like Peptide-1* (GLP-1), de petites molécules, dont l'action centrale induit une perte de poids (estrogènes, T3, etc.). Ces composés ne sont délivrés et n'agissent qu'au niveau de cellules exprimant le récepteur du GLP-1, dans le cerveau, évitant ainsi les effets indésirables qu'engendrerait une distribution systémique *(2)*. Certains de ces composés sont déjà en développement clinique et représentent peut-être l'avenir des traitements contre l'obésité.

Relations réticulum endoplasmique-mitochondrie dans l'hypothalamus et régulation de la balance énergétique

M. Claret, chercheur au IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelone), propose pour la première fois un mécanisme moléculaire liant stress du réticulum endoplasmique (RE), leptinorésistance et dérégulation de l'appétit et du poids *(3)*. Il a d'abord observé que l'expression de la protéine Mitofusin 2 (MFN2), impliquée dans la fusion mitochondriale et les interactions RE-mitochondrie, diminue dans l'hypothalamus de souris DIO *(diet-induced obesity)*, rendues obèses par la consommation d'un régime hyperlipidique. Il a ensuite montré qu'un déficit en MFN2 dans les neurones hypothalamiques à pro-opiomélanocortine (POMC) entraîne une perturbation de l'homéostasie RE-mitochondrie, provoquant un stress du RE, ce qui induit un défaut de maturation de la POMC en *α-melanocyte-stimulating hormone* (MSHα), une leptinorésistance et une obésité.

Trois concepts novateurs dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique et du comportement alimentaire

Dans un premier temps, V. Prévot, directeur de recherche au CRJPA (Centre de recherche Jean-Pierre Aubert, Lille) a montré que les tanycytes, cellules épendymogliales

** Université Paris Diderot, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, CNRS UMR 8251, Paris.*
*** Université de Nice-Sophia Antipolis, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 7275, Valbonne.*

bordant le 3e ventricule, en facilitant de différentes manières l'accès des signaux métaboliques à leur cible hypothalamique, sont des acteurs clés de l'homéostasie énergétique. Le transport de la leptine périphérique, par les tanycytes, jusqu'au liquide céphalorachidien (LCR) est indispensable au maintien de la sensibilité à la leptine *(4)*. De plus, un jeûne favorise une plasticité de la barrière hématoencéphalique, dépendante du VEGF-A produit par les tanycytes, facilitant le passage de molécules métaboliques vers l'hypothalamus et donc l'adaptation au statut nutritionnel *(5)*.

Dans une seconde conférence, C. Rovère, chercheuse à l'IPMC (Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Sophia-Antipolis) a mis en avant l'implication de la neuro-inflammation, et en particulier des chimiokines, dans la physiopathologie de troubles du comportement alimentaire. L'inflammation liée à la cachexie ou à l'obésité modifie les niveaux d'expression des chimiokines, ce qui perturbe la régulation centrale du comportement alimentaire : en modulant de façon négative ou positive l'activité de neurones hypothalamiques, notamment les neurones orexigènes à *Melanin-Concentrating Hormone* (MCH), les chimiokines CCL2 et CCL5 induisent respectivement une perte ou un gain de poids et représenteraient des cibles thérapeutiques potentielles.

Enfin, A. Benani, chercheur au CSGA (Centre des sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon), a étudié la plasticité liée au statut nutritionnel, de circuits neuronaux hypothalamiques impliqués dans la prise alimentaire. Il a identifié l'acide polysialique comme facteur permettant la plasticité synaptique hypothalamique induite par un challenge hypercalorique chez la souris *(6)*. La polysialisation dépend de l'histone acétyltransférase MOF qui induit, dans l'hypothalamus médiobasal, la transcription du gène codant PST-1 pour une enzyme de polysialisation *(7)*. Une altération de cette plasticité synaptique hypothalamique constituerait un risque de développer une obésité.

Liens entre horloges circadiennes, hormones, métabolisme et vieillissement

Tout d'abord, M.S. Clerget-Froidevaux, professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris), a mis en évidence le lien entre longévité et plasticité métabolique associée aux hormones thyroïdiennes (HT) dans l'hypothalamus, en exposant le cas de la souris WSB/EiJ qui présente un phénotype particulier : une résistance à l'obésité, une espérance de vie accrue et un niveau plasmatique d'HT T4 faible. Or, cette souris est dotée d'un métabolisme optimisé (changement de substrat énergétique – des lipides aux glucides – au moment de la prise alimentaire, lipogenèse de novo, meilleure tolérance au glucose) qui se maintient avec l'âge.

Ensuite, E. Challet, chercheur à l'Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives (Strasbourg), a montré qu'indices métaboliques/nutritionnels (consommation calorique, heure du repas, carences, etc.) et vieillissement influencent la rythmicité circadienne *(8)*. Mais la réciproque est vraie : dans un modèle de déphasage chronique, le rat roussard montre une arythmie du cycle veille-sommeil, un gain de poids, une intolérance au glucose et un raccourcissement des télomères, signe de vieillissement cellulaire.

La Journée thématique de la SNE : faire le plein d'informations

Ce colloque a aussi offert la possibilité à une vingtaine d'étudiants et de chercheurs de s'exprimer dans un contexte convivial et dynamique via des communications orales classiques ou rapides. Au-delà du défi à relever, cela a permis de faire part de l'état de l'art dans les laboratoires francophones de neuroendocrinologie. Par exemple, en 60 secondes seulement, J. Lannes (BFA CNRS UMR 8251, Paris) a exposé l'implication du tandem de miARN 132/212 dans la signalisation de la GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone*) et V. Hellier (Groupe interdisciplinaire de génoprotéomique appliquée [GIGA] Neuroscience, Liège) a dévoilé le rôle de la kisspeptine, de la NOS *(Nitric Oxide Synthase)* et du récepteur de la GnRH dans le contrôle du réflexe de lordose. Cette Journée a aussi permis, entre autres, à B. Tata (INSERM U1141, Paris) de montrer qu'un déficit neuronal en Rabconnectin-3α (protéine vésiculaire synaptique) induit une perte des neurones à GnRH et une diminution de son expression génique, associées à des défauts de puberté et à une infertilité, ou à J. Pantel (Centre de Psychiatrie et Neurosciences [CPN], Paris) de présenter un tout nouveau modèle d'étude : la mutation gain-de-fonction Q343X sur le gène Ghsr codant pour le récepteur de la ghréline, qui induit chez le rat adulte, un gain de poids et une augmentation de la prise alimentaire.

Conclusion

Cette journée thématique de la SNE portait sur la régulation centrale du métabolisme, thème porteur qui a réuni avec succès plus de 130 chercheurs et étudiants, qui ont ainsi pu faire le point sur les dernières avancées dans ce domaine. Ce colloque a de nouveau démontré le dynamisme de la recherche dans les laboratoires francophones de neuroendocrinologie.

Références

1. *Finan B, Ma T, Ottaway N, Müller TD, Habegger KM, Heppner KM, Kirchner H et al. nimolecular dual incretins maximize metabolic benefits in rodents, monkeys, and humans. Sci Transl Med 2013; 5(209):209ra151.*
2. *Finan B, Yang B, Ottaway N et al. Targeted estrogen delivery reverses the metabolic syndrome. Nat Med 2012;18(12):1847-56.*
3. *Schneeberger M, Dietrich M, Sebastián D et al. Mitofusin 2 in POMC neurons connects ER stress with leptin resistance and energy imbalance. Cell 2013;26;155(1):172-87.*
4. *Balland E, Dam J, Langlet F et al. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. Cell Metab 2014;19(2):293-301.*
5. *Langlet F, Levin BE, Luquet S et al. Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. Cell Metab 2013;17(4):607-17.*
6. *Benani A, Hryhorczuk C, Gouazé A et al. Food intake adaptation to dietary fat involves PSA-dependent rewiring of the arcuate melanocortin system in mice. J Neurosci 2012;32(35):11970-9.*
7. *Brenachot X, Rigault C, Nédélec E et al. The histone acetyltransferase MOF activates hypothalamic polysialylation to prevent diet-induced obesity in mice. Mol Metab 2014;3(6):619-29.*
8. *Challet E, Dumont S, Mehdi MK et al. Aging-like circadian disturbances in folate-deficient mice. Neurobiol Aging 2013;34(6):1589-98.*

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

BIBLIOGRAPHIE

CC BY NC

A

Abbott, C.R., Kennedy, A.R., Wren, A.M., Rossi, M., Murphy, K.G., Seal, L.J., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Small, C.J., and Bloom, S.R. (2003). Identification of hypothalamic nuclei involved in the orexigenic effect of melanin-concentrating hormone. Endocrinology *144*, 3943-3949.

Adamantidis, A., and de Lecea, L. (2009). A role for Melanin-Concentrating Hormone in learning and memory. Peptides *30*, 2066-2070.

Adler, M.W., and Rogers, T.J. (2005). Are chemokines the third major system in the brain? Journal of leukocyte biology *78*, 1204-1209.

Ahnaou, A., Dautzenberg, F.M., Huysmans, H., Steckler, T., and Drinkenburg, W.H. (2011). Contribution of melanin-concentrating hormone (MCH1) receptor to thermoregulation and sleep stabilization: evidence from MCH1 (-/-) mice. Behav Brain Res *218*, 42-50.

Air, E.L., Benoit, S.C., Blake Smith, K.A., Clegg, D.J., and Woods, S.C. (2002). Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms. Pharmacol Biochem Behav *72*, 423-429.

Alexander, C., and Rietschel, E.T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. J Endotoxin Res *7*, 167-202.

Allaeys, I., Bouyer, K., Loudes, C., Faivre-Bauman, A., Petit, F., Ortola, C., Cardinaud, B., Epelbaum, J., and Nahon, J.L. (2004). Characterization of MCH-gene-overprinted-polypeptide-immunoreactive material in hypothalamus reveals an inhibitory role of pro-somatostatin1-64 on somatostatin secretion. The European journal of neuroscience *19*, 925-936.

Allen, S.J., Crown, S.E., and Handel, T.M. (2007). Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. Annu Rev Immunol *25*, 787-820.

Alon, T., and Friedman, J.M. (2006). Late-onset leanness in mice with targeted ablation of melanin concentrating hormone neurons. J Neurosci *26*, 389-397.

Ambrosini, E., and Aloisi, F. (2004). Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. Neurochem Res *29*, 1017-1038.

An, S., Cutler, G., Zhao, J.J., Huang, S.G., Tian, H., Li, W., Liang, L., Rich, M., Bakleh, A., Du, J.*, et al.* (2001). Identification and characterization of a melanin-concentrating hormone receptor. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 7576-7581.

Andjelkovic, A.V., Song, L., Dzenko, K.A., Cong, H., and Pachter, J.S. (2002). Functional expression of CCR2 by human fetal astrocytes. J Neurosci Res *70*, 219-231.

Appay, V., and Rowland-Jones, S.L. (2001). RANTES: a versatile and controversial chemokine. Trends Immunol *22*, 83-87.

Araujo, E.P., De Souza, C.T., Ueno, M., Cintra, D.E., Bertolo, M.B., Carvalheira, J.B., Saad, M.J., and Velloso, L.A. (2007). Infliximab restores glucose homeostasis in an animal model of diet-induced obesity and diabetes. Endocrinology *148*, 5991-5997.

Arkan, M.C., Hevener, A.L., Greten, F.R., Maeda, S., Li, Z.W., Long, J.M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J., and Karin, M. (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. Nat Med *11*, 191-198.

Arruda, A.P., Milanski, M., Coope, A., Torsoni, A.S., Ropelle, E., Carvalho, D.P., Carvalheira, J.B., and Velloso, L.A. (2011). Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. Endocrinology *152*, 1314-1326.

Asnicar, M.A., Smith, D.P., Yang, D.D., Heiman, M.L., Fox, N., Chen, Y.F., Hsiung, H.M., and Koster, A. (2001). Absence of cocaine- and amphetamine-regulated transcript results in obesity in mice fed a high caloric diet. Endocrinology *142*, 4394-4400.

B

Bacon, K., Baggiolini, M., Broxmeyer, H., Horuk, R., Lindley, I., Mantovani, A., Maysushima, K., Murphy, P., Nomiyama, H., Oppenheim, J.*, et al.* (2002). Chemokine/chemokine receptor nomenclature. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research *22*, 1067-1068.

Bagdade, J.D., Bierman, E.L., and Porte, D., Jr. (1967). The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. J Clin Invest *46*, 1549-1557.

Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., and Schettini, G. (2002). Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. Journal of neurochemistry *82*, 1311-1329.

Bakhiet, M., Tjernlund, A., Mousa, A., Gad, A., Stromblad, S., Kuziel, W.A., Seiger, A., and Andersson, J. (2001). RANTES promotes growth and survival of human first-trimester forebrain astrocytes. Nat Cell Biol *3*, 150-157.

Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner, H.L., and Hancock, W.W. (1999). CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 6873-6878.

Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B*., et al.* (2014). Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. Cell Metab *19*, 293-301.

Banisadr, G., Gosselin, R.D., Mechighel, P., Kitabgi, P., Rostene, W., and Parsadaniantz, S.M. (2005a). Highly regionalized neuronal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in rat brain: evidence for its colocalization with neurotransmitters and neuropeptides. J Comp Neurol *489*, 275-292.

Banisadr, G., Gosselin, R.D., Mechighel, P., Rostene, W., Kitabgi, P., and Melik Parsadaniantz, S. (2005d). Constitutive neuronal expression of CCR2 chemokine receptor and its colocalization with neurotransmitters in normal rat brain: functional effect of MCP-1/CCL2 on calcium mobilization in primary cultured neurons. J Comp Neurol *492*, 178-192.

Banisadr, G., Queraud-Lesaux, F., Boutterin, M.C., Pelaprat, D., Zalc, B., Rostene, W., Haour, F., and Parsadaniantz, S.M. (2002). Distribution, cellular localization and functional role of CCR2 chemokine receptors in adult rat brain. Journal of neurochemistry *81*, 257-269.

Banks, W.A. (2006). The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology. Neurol Clin *24*, 413-419.

Banks, W.A., Farr, S.A., La Scola, M.E., and Morley, J.E. (2001). Intravenous human interleukin-1alpha impairs memory processing in mice: dependence on blood-brain barrier transport into posterior division of the septum. J Pharmacol Exp Ther *299*, 536-541.

Barna, B.P., Pettay, J., Barnett, G.H., Zhou, P., Iwasaki, K., and Estes, M.L. (1994). Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. J Neuroimmunol *50*, 101-107.

Barson, J.R., Karatayev, O., Gaysinskaya, V., Chang, G.Q., and Leibowitz, S.F. (2012). Effect of dietary fatty acid composition on food intake, triglycerides, and hypothalamic peptides. Regul Pept *173*, 13-20.

Barson, J.R., Morganstern, I., and Leibowitz, S.F. (2013). Complementary roles of orexin and melanin-concentrating hormone in feeding behavior. Int J Endocrinol *2013*, 983964.

Bartoli, C., Civatte, M., Pellissier, J.F., and Figarella-Branger, D. (2001). CCR2A and CCR2B, the two isoforms of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor are up-regulated and expressed by different cell subsets in idiopathic inflammatory myopathies. Acta Neuropathol *102*, 385-392.

Baura, G.D., Foster, D.M., Porte, D., Jr., Kahn, S.E., Bergman, R.N., Cobelli, C., and Schwartz, M.W. (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. J Clin Invest *92*, 1824-1830.

Beck, B., Jhanwar-Uniyal, M., Burlet, A., Chapleur-Chateau, M., Leibowitz, S.F., and Burlet, C. (1990). Rapid and localized alterations of neuropeptide Y in discrete hypothalamic nuclei with feeding status. Brain Res *528*, 245-249.

Belmadani, A., Tran, P.B., Ren, D., and Miller, R.J. (2006). Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. J Neurosci *26*, 3182-3191.

Benoit, S.C., Air, E.L., Coolen, L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. J Neurosci *22*, 9048-9052.

Benrick, A., Schele, E., Pinnock, S.B., Wernstedt-Asterholm, I., Dickson, S.L., Karlsson-Lindahl, L., and Jansson, J.O. (2009). Interleukin-6 gene knockout influences energy balance regulating peptides in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. J Neuroendocrinol *21*, 620-628.

Berg, A.H., and Scherer, P.E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. Circ Res *96*, 939-949.

Berkseth, K.E., Guyenet, S.J., Melhorn, S.J., Lee, D., Thaler, J.P., Schur, E.A., and Schwartz, M.W. (2014). Hypothalamic gliosis associated with high-fat diet feeding is reversible in mice: a combined immunohistochemical and magnetic resonance imaging study. Endocrinology *155*, 2858-2867.

Berman, J.W., Guida, M.P., Warren, J., Amat, J., and Brosnan, C.F. (1996). Localization of monocyte chemoattractant peptide-1 expression in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis and trauma in the rat. J Immunol *156*, 3017-3023.

Berridge, K.C., and Kringelbach, M.L. (2015). Pleasure systems in the brain. Neuron *86*, 646-664.

Berridge, K.C., and Robinson, T.E. (2003). Parsing reward. Trends Neurosci *26*, 507-513.

Berridge, K.C., Robinson, T.E., and Aldridge, J.W. (2009). Dissecting components of reward: 'liking', 'wanting', and learning. Curr Opin Pharmacol *9*, 65-73.

Berthoud, H.R. (2011). Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: who is the boss? Curr Opin Neurobiol *21*, 888-896.

Berthoud, H.R. (2012). The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. Proc Nutr Soc *71*, 478-487.

Bewick, G.A., Gardiner, J.V., Dhillo, W.S., Kent, A.S., White, N.E., Webster, Z., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2005). Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. FASEB J *19*, 1680-1682.

Bi, S., Ladenheim, E.E., Schwartz, G.J., and Moran, T.H. (2001). A role for NPY overexpression in the dorsomedial hypothalamus in hyperphagia and obesity of OLETF rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *281*, R254-260.

Bingham, N.C., Anderson, K.K., Reuter, A.L., Stallings, N.R., and Parker, K.L. (2008). Selective loss of leptin receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus results in increased adiposity and a metabolic syndrome. Endocrinology *149*, 2138-2148.

Bittencourt, J.C. (2011). Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. Gen Comp Endocrinol *172*, 185-197.

Bittencourt, J.C., Presse, F., Arias, C., Peto, C., Vaughan, J., Nahon, J.L., Vale, W., and Sawchenko, P.E. (1992). The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. J Comp Neurol *319*, 218-245.

Blanpain, C., Buser, R., Power, C.A., Edgerton, M., Buchanan, C., Mack, M., Simmons, G., Clapham, P.R., Parmentier, M., and Proudfoot, A.E. (2001). A chimeric MIP-1alpha/RANTES protein demonstrates the use of different regions of the RANTES protein to bind and activate its receptors. Journal of leukocyte biology *69*, 977-985.

Bluthe, R.M., Walter, V., Parnet, P., Laye, S., Lestage, J., Verrier, D., Poole, S., Stenning, B.E., Kelley, K.W., and Dantzer, R. (1994). Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. C R Acad Sci III *317*, 499-503.

Boddeke, E.W., Meigel, I., Frentzel, S., Gourmala, N.G., Harrison, J.K., Buttini, M., Spleiss, O., and Gebicke-Harter, P. (1999). Cultured rat microglia express functional beta-chemokine receptors. J Neuroimmunol *98*, 176-184.

Boden, G., and Shulman, G.I. (2002). Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. Eur J Clin Invest *32 Suppl 3*, 14-23.

Bolborea, M., and Dale, N. (2013). Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. Trends Neurosci *36*, 91-100.

Bolin, L.M., Murray, R., Lukacs, N.W., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Schall, T.J., and Bacon, K.B. (1998). Primary sensory neurons migrate in response to the chemokine RANTES. J Neuroimmunol *81*, 49-57.

Bonnavion, P., Jackson, A.C., Carter, M.E., and de Lecea, L. (2015). Antagonistic interplay between hypocretin and leptin in the lateral hypothalamus regulates stress responses. Nat Commun *6*, 6266.

Borbely, A.A. (1977). Sleep in the rat during food deprivation and subsequent restitution of food. Brain Res *124*, 457-471.

Borg, M.L., Omran, S.F., Weir, J., Meikle, P.J., and Watt, M.J. (2012). Consumption of a high-fat diet, but not regular endurance exercise training, regulates hypothalamic lipid accumulation in mice. J Physiol *590*, 4377-4389.

Boura-Halfon, S., and Zick, Y. (2009). Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab *296*, E581-591.

Braun, T.P., Grossberg, A.J., Veleva-Rotse, B.O., Maxson, J.E., Szumowski, M., Barnes, A.P., and Marks, D.L. (2012). Expression of myeloid differentiation factor 88 in neurons is not requisite for the induction of sickness behavior by interleukin-1beta. J Neuroinflammation *9*, 229.

Braun, T.P., and Marks, D.L. (2010). Pathophysiology and treatment of inflammatory anorexia in chronic disease. J Cachexia Sarcopenia Muscle *1*, 135-145.

Broadwell, R.D., and Brightman, M.W. (1976). Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. J Comp Neurol *166*, 257-283.

Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., and Hokfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 15043-15048.

Brown, C.M., Mulcahey, T.A., Filipek, N.C., and Wise, P.M. (2010). Production of proinflammatory cytokines and chemokines during neuroinflammation: novel roles for estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology *151*, 4916-4925.

Buckley, J.D., and Howe, P.R. (2010). Long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids may be beneficial for reducing obesity-a review. Nutrients *2*, 1212-1230.

Buettner, R., Scholmerich, J., and Bollheimer, L.C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. Obesity (Silver Spring) *15*, 798-808.

Burdakov, D., Gerasimenko, O., and Verkhratsky, A. (2005). Physiological changes in glucose differentially modulate the excitability of hypothalamic melanin-concentrating hormone and orexin neurons in situ. J Neurosci *25*, 2429-2433.

Burdakov, D., Jensen, L.T., Alexopoulos, H., Williams, R.H., Fearon, I.M., O'Kelly, I., Gerasimenko, O., Fugger, L., and Verkhratsky, A. (2006). Tandem-pore K+ channels mediate inhibition of orexin neurons by glucose. Neuron *50*, 711-722.

Butler, D., and Bahr, B.A. (2006). Oxidative stress and lysosomes: CNS-related consequences and implications for lysosomal enhancement strategies and induction of autophagy. Antioxid Redox Signal *8*, 185-196.

C

Cai, D., and Liu, T. (2011). Hypothalamic inflammation: a double-edged sword to nutritional diseases. Ann N Y Acad Sci *1243*, E1-39.

Cai, D., Yuan, M., Frantz, D.F., Melendez, P.A., Hansen, L., Lee, J., and Shoelson, S.E. (2005). Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. Nat Med *11*, 183-190.

Caiello, I., Minnone, G., Holzinger, D., Vogl, T., Prencipe, G., Manzo, A., De Benedetti, F., and Strippoli, R. (2014). IL-6 amplifies TLR mediated cytokine and chemokine production: implications for the pathogenesis of rheumatic inflammatory diseases. PLoS One *9*, e107886.

Calegari, V.C., Torsoni, A.S., Vanzela, E.C., Araujo, E.P., Morari, J., Zoppi, C.C., Sbragia, L., Boschero, A.C., and Velloso, L.A. (2011). Inflammation of the hypothalamus leads to defective pancreatic islet function. J Biol Chem *286*, 12870-12880.

Callewaere, C., Banisadr, G., Desarmenien, M.G., Mechighel, P., Kitabgi, P., Rostene, W.H., and Melik Parsadaniantz, S. (2006). The chemokine SDF-1/CXCL12 modulates the firing pattern of vasopressin neurons and counteracts induced vasopressin release through CXCR4. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 8221-8226.

Cani, P.D., Amar, J., Iglesias, M.A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A.M., Fava, F., Tuohy, K.M., Chabo, C*., et al.* (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes *56*, 1761-1772.

Cardona, A.E., Li, M., Liu, L., Savarin, C., and Ransohoff, R.M. (2008a). Chemokines in and out of the central nervous system: much more than chemotaxis and inflammation. Journal of leukocyte biology *84*, 587-594.

Cardona, A.E., Sasse, M.E., Liu, L., Cardona, S.M., Mizutani, M., Savarin, C., Hu, T., and Ransohoff, R.M. (2008b). Scavenging roles of chemokine receptors: chemokine receptor deficiency is associated with increased levels of ligand in circulation and tissues. Blood *112*, 256-263.

Carrillo-de Sauvage, M.A., Gomez, A., Ros, C.M., Ros-Bernal, F., Martin, E.D., Perez-Valles, A., Gallego-Sanchez, J.M., Fernandez-Villalba, E., Barcia, C., Sr., Barcia, C., Jr*., et al.* (2012). CCL2-expressing astrocytes mediate the extravasation of T lymphocytes in the brain. Evidence from patients with glioma and experimental models in vivo. PLoS One *7*, e30762.

Carson, M.J., Thrash, J.C., and Walter, B. (2006). The cellular response in neuroinflammation: The role of leukocytes, microglia and astrocytes in neuronal death and survival. Clin Neurosci Res *6*, 237-245.

Cartier, L., Hartley, O., Dubois-Dauphin, M., and Krause, K.H. (2005). Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. Brain Res Brain Res Rev *48*, 16-42.

Cason, A.M., Smith, R.J., Tahsili-Fahadan, P., Moorman, D.E., Sartor, G.C., and Aston-Jones, G. (2010). Role of orexin/hypocretin in reward-seeking and addiction: implications for obesity. Physiol Behav *100*, 419-428.

Cazareth, J., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., and Petit-Paitel, A. (2014). Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. J Neuroinflammation *11*, 132.

Chang, G.Q., Karatayev, O., and Leibowitz, S.F. (2015). Prenatal exposure to ethanol stimulates hypothalamic CCR2 chemokine receptor system: Possible relation to increased density of orexigenic peptide neurons and ethanol drinking in adolescent offspring. Neuroscience *310*, 163-175.

Chao, P.T., Yang, L., Aja, S., Moran, T.H., and Bi, S. (2011). Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. Cell Metab *13*, 573-583.

Charo, I.F., Myers, S.J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A.J., and Coughlin, S.R. (1994). Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 2752-2756.

Charo, I.F., and Ransohoff, R.M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. N Engl J Med *354*, 610-621.

Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L.A., Woolf, E.A., Weng, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., Moore, K.J., Breitbart, R.E*., et al.* (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. Cell *84*, 491-495.

Chen, W., Gao, Q., Han, S., Pan, F., and Fan, W. (2015). The CCL2/CCR2 axis enhances IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition by cooperatively activating STAT3-Twist signaling. Tumor Biol *36*, 973-981.

Chen, Y., Hu, C., Hsu, C.K., Zhang, Q., Bi, C., Asnicar, M., Hsiung, H.M., Fox, N., Slieker, L.J., Yang, D.D*., et al.* (2002). Targeted disruption of the melanin-concentrating hormone receptor-1 results in hyperphagia and resistance to diet-induced obesity. Endocrinology *143*, 2469-2477.

Cheung, C.C., Clifton, D.K., and Steiner, R.A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. Endocrinology *138*, 4489-4492.

Cheung, C.C., Kurrasch, D.M., Liang, J.K., and Ingraham, H.A. (2013). Genetic labeling of steroidogenic factor-1 (SF-1) neurons in mice reveals ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) circuitry beginning at neurogenesis and development of a separate non-SF-1 neuronal cluster in the ventrolateral VMH. J Comp Neurol *521*, 1268-1288.

Cho, M.L., Yoon, B.Y., Ju, J.H., Jung, Y.O., Jhun, J.Y., Park, M.K., Park, S.H., Cho, C.S., and Kim, H.Y. (2007). Expression of CCR2A, an isoform of MCP-1 receptor, is increased by MCP-1, CD40 ligand and TGF-beta in fibroblast like synoviocytes of patients with RA. Exp Mol Med *39*, 499-507.

Chu, H.X., Arumugam, T.V., Gelderblom, M., Magnus, T., Drummond, G.R., and Sobey, C.G. (2014). Role of CCR2 in inflammatory conditions of the central nervous system. J Cereb Blood Flow Metab *34*, 1425-1429.

Chung, S., Parks, G.S., Lee, C., and Civelli, O. (2011). Recent updates on the melanin-concentrating hormone (MCH) and its receptor system: lessons from MCH1R antagonists. J Mol Neurosci *43*, 115-121.

Cintra, D.E., Ropelle, E.R., Moraes, J.C., Pauli, J.R., Morari, J., Souza, C.T., Grimaldi, R., Stahl, M., Carvalheira, J.B., Saad, M.J*., et al.* (2012). Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. PLoS One *7*, e30571.

Claret, M., Smith, M.A., Batterham, R.L., Selman, C., Choudhury, A.I., Fryer, L.G., Clements, M., Al-Qassab, H., Heffron, H., Xu, A.W*., et al.* (2007). AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. J Clin Invest *117*, 2325-2336.

Clark, J.T., Kalra, P.S., Crowley, W.R., and Kalra, S.P. (1984). Neuropeptide Y and human pancreatic polypeptide stimulate feeding behavior in rats. Endocrinology *115*, 427-429.

Clegg, D.J., Air, E.L., Benoit, S.C., Sakai, R.S., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2003). Intraventricular melanin-concentrating hormone stimulates water intake independent of food intake. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *284*, R494-499.

Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., Cabrol, S., Pelloux, V., Cassuto, D., Gourmelen, M., Dina, C., Chambaz, J., Lacorte, J.M*., et al.* (1998). A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. Nature *392*, 398-401.

Colombani, A.L., Carneiro, L., Benani, A., Galinier, A., Jaillard, T., Duparc, T., Offer, G., Lorsignol, A., Magnan, C., Casteilla, L*., et al.* (2009). Enhanced hypothalamic glucose sensing in obesity: alteration of redox signaling. Diabetes *58*, 2189-2197.

Conductier, G., Blondeau, N., Guyon, A., Nahon, J.L., and Rovere, C. (2010). The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. J Neuroimmunol *224*, 93-100.

Considine, R.V., Sinha, M.K., Heiman, M.L., Kriauciunas, A., Stephens, T.W., Nyce, M.R., Ohannesian, J.P., Marco, C.C., McKee, L.J., Bauer, T.L*., et al.* (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med *334*, 292-295.

Corander, M.P., Rimmington, D., Challis, B.G., O'Rahilly, S., and Coll, A.P. (2011). Loss of agouti-related peptide does not significantly impact the phenotype of murine POMC deficiency. Endocrinology *152*, 1819-1828.

Corp, E.S., Woods, S.C., Porte, D., Jr., Dorsa, D.M., Figlewicz, D.P., and Baskin, D.G. (1986). Localization of 125I-insulin binding sites in the rat hypothalamus by quantitative autoradiography. Neurosci Lett *70*, 17-22.

Cotta-Grand, N., Rovere, C., Guyon, A., Cervantes, A., Brau, F., and Nahon, J.L. (2009). Melanin-concentrating hormone induces neurite outgrowth in human neuroblastoma SH-SY5Y cells through p53 and MAPKinase signaling pathways. Peptides *30*, 2014-2024.

Coughlan, C.M., McManus, C.M., Sharron, M., Gao, Z., Murphy, D., Jaffer, S., Choe, W., Chen, W., Hesselgesser, J., Gaylord, H*., et al.* (2000). Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. Neuroscience *97*, 591-600.

Courseaux, A., and Nahon, J.L. (2001). Birth of two chimeric genes in the Hominidae lineage. Science *291*, 1293-1297.

Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. Nature *411*, 480-484.

Croitoru-Lamoury, J., Guillemin, G.J., Boussin, F.D., Mognetti, B., Gigout, L.I., Cheret, A., Vaslin, B., Le Grand, R., Brew, B.J., and Dormont, D. (2003). Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: evidence for a central role of TNF alpha and IFN gamma in CXCR4 and CCR5 modulation. Glia *41*, 354-370.

Cross, A.K., and Woodroofe, M.N. (1999). Chemokines induce migration and changes in actin polymerization in adult rat brain microglia and a human fetal microglial cell line in vitro. J Neurosci Res *55*, 17-23.

Cui, H., Sohn, J.W., Gautron, L., Funahashi, H., Williams, K.W., Elmquist, J.K., and Lutter, M. (2012). Neuroanatomy of melanocortin-4 receptor pathway in the lateral hypothalamic area. J Comp Neurol *520*, 4168-4183.

Cummings, D.E., Foster-Schubert, K.E., and Overduin, J. (2005). Ghrelin and energy balance: focus on current controversies. Curr Drug Targets *6*, 153-169.

Cummings, D.E., Weigle, D.S., Frayo, R.S., Breen, P.A., Ma, M.K., Dellinger, E.P., and Purnell, J.Q. (2002). Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. N Engl J Med *346*, 1623-1630.

D

Dalmas, E., Rouault, C., Abdennour, M., Rovere, C., Rizkalla, S., Bar-Hen, A., Nahon, J.L., Bouillot, J.L., Guerre-Millo, M., Clement, K*., et al.* (2011). Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in calorie and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. Am J Clin Nutr *94*, 450-458.

Dantzer, R. (2006). Cytokine, sickness behavior, and depression. Neurol Clin *24*, 441-460.

Davis, A.M., Seney, M.L., Stallings, N.R., Zhao, L., Parker, K.L., and Tobet, S.A. (2004). Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. J Neurobiol *60*, 424-436.

Dawson, J., Miltz, W., Mir, A.K., and Wiessner, C. (2003). Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. Expert Opin Ther Targets *7*, 35-48.

de Lecea, L., Kilduff, T.S., Peyron, C., Gao, X., Foye, P.E., Danielson, P.E., Fukuhara, C., Battenberg, E.L., Gautvik, V.T., Bartlett, F.S., 2nd*, et al.* (1998). The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 322-327.

De Souza, C.T., Araujo, E.P., Bordin, S., Ashimine, R., Zollner, R.L., Boschero, A.C., Saad, M.J., and Velloso, L.A. (2005). Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. Endocrinology *146*, 4192-4199.

DeBoer, M.D., Zhu, X.X., Levasseur, P., Meguid, M.M., Suzuki, S., Inui, A., Taylor, J.E., Halem, H.A., Dong, J.Z., Datta, R*., et al.* (2007). Ghrelin treatment causes increased food intake and retention of lean body mass in a rat model of cancer cachexia. Endocrinology *148*, 3004-3012.

DeLany, J.P., Windhauser, M.M., Champagne, C.M., and Bray, G.A. (2000). Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. Am J Clin Nutr *72*, 905-911.

Della-Zuana, O., Presse, F., Ortola, C., Duhault, J., Nahon, J.L., and Levens, N. (2002). Acute and chronic administration of melanin-concentrating hormone enhances food intake and body weight in Wistar and Sprague-Dawley rats. Int J Obes Relat Metab Disord *26*, 1289-1295.

Denes, A., Lopez-Castejon, G., and Brough, D. (2012). Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? Cell Death Dis *3*, e338.

Denis, R.G., Joly-Amado, A., Webber, E., Langlet, F., Schaeffer, M., Padilla, S.L., Cansell, C., Dehouck, B., Castel, J., Delbes, A.S.*, et al.* (2015). Palatability Can Drive Feeding Independent of AgRP Neurons. Cell Metab *22*, 646-657.

Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research *29*, 313-326.

Di Prisco, S., Summa, M., Chellakudam, V., Rossi, P.I., and Pittaluga, A. (2012). RANTES-mediated control of excitatory amino acid release in mouse spinal cord. Journal of neurochemistry *121*, 428-437.

Drazen, D.L., Vahl, T.P., D'Alessio, D.A., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (2006). Effects of a fixed meal pattern on ghrelin secretion: evidence for a learned response independent of nutrient status. Endocrinology *147*, 23-30.

Dube, M.G., Kalra, S.P., and Kalra, P.S. (1999). Food intake elicited by central administration of orexins/hypocretins: identification of hypothalamic sites of action. Brain Res *842*, 473-477.

Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Heath, J.W., Kidd, G.J., and Rostas, J.A. (1986). A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. Brain Res *372*, 115-129.

Dzenko, K.A., Andjelkovic, A.V., Kuziel, W.A., and Pachter, J.S. (2001). The chemokine receptor CCR2 mediates the binding and internalization of monocyte chemoattractant protein-1 along brain microvessels. J Neurosci *21*, 9214-9223.

Dzenko, K.A., Song, L., Ge, S., Kuziel, W.A., and Pachter, J.S. (2005). CCR2 expression by brain microvascular endothelial cells is critical for macrophage transendothelial migration in response to CCL2. Microvasc Res *70*, 53-64.

Dziedzic, B., Szemraj, J., Bartkowiak, J., and Walczewska, A. (2007). Various dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats. J Neuroendocrinol *19*, 364-373.

E

Edwards, C.M., Abusnana, S., Sunter, D., Murphy, K.G., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (1999). The effect of the orexins on food intake: comparison with neuropeptide Y, melanin-concentrating hormone and galanin. J Endocrinol *160*, R7-12.

Egawa, M., Yoshimatsu, H., and Bray, G.A. (1991). Neuropeptide Y suppresses sympathetic activity to interscapular brown adipose tissue in rats. Am J Physiol *260*, R328-334.

Ehses, J.A., Perren, A., Eppler, E., Ribaux, P., Pospisilik, J.A., Maor-Cahn, R., Gueripel, X., Ellingsgaard, H., Schneider, M.K., Biollaz, G.*, et al.* (2007). Increased number of islet-associated macrophages in type 2 diabetes. Diabetes *56*, 2356-2370.

Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., Kelly, J., Ahima, R.S., Bjorbaek, C., Flier, J.S., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. Neuron *23*, 775-786.

Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. Neuron *21*, 1375-1385.

Elmquist, J.K., Bjorbaek, C., Ahima, R.S., Flier, J.S., and Saper, C.B. (1998). Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. J Comp Neurol *395*, 535-547.

Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V.E., Georgilis, K., Lonnemann, G., van der Meer, J.W., Cannon, J.G., Rogers, T.S., Klempner, M.S., Weber, P.C.*, et al.* (1989). The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. N Engl J Med *320*, 265-271.

Enriori, P.J., Evans, A.E., Sinnayah, P., Jobst, E.E., Tonelli-Lemos, L., Billes, S.K., Glavas, M.M., Grayson, B.E., Perello, M., Nillni, E.A*., et al.* (2007). Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. Cell Metab *5*, 181-194.

Espana, R.A., Baldo, B.A., Kelley, A.E., and Berridge, C.W. (2001). Wake-promoting and sleep-suppressing actions of hypocretin (orexin): basal forebrain sites of action. Neuroscience *106*, 699-715.

F

Fekete, C., Legradi, G., Mihaly, E., Huang, Q.H., Tatro, J.B., Rand, W.M., Emerson, C.H., and Lechan, R.M. (2000). alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. J Neurosci *20*, 1550-1558.

Fekete, C., Marks, D.L., Sarkar, S., Emerson, C.H., Rand, W.M., Cone, R.D., and Lechan, R.M. (2004). Effect of Agouti-related protein in regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the melanocortin 4 receptor knockout mouse. Endocrinology *145*, 4816-4821.

Finck, B.N., Kelley, K.W., Dantzer, R., and Johnson, R.W. (1998). In vivo and in vitro evidence for the involvement of tumor necrosis factor-alpha in the induction of leptin by lipopolysaccharide. Endocrinology *139*, 2278-2283.

Finger, F.W. (1965). Effect of Food Deprivation on Running-Wheel Activity in Naive Rats. Psychol Rep *16*, 753-757.

Flores, A., Maldonado, R., and Berrendero, F. (2013). Cannabinoid-hypocretin cross-talk in the central nervous system: what we know so far. Front Neurosci *7*, 256.

Forray, C. (2003). The MCH receptor family: feeding brain disorders? Curr Opin Pharmacol *3*, 85-89.

Funato, H., Tsai, A.L., Willie, J.T., Kisanuki, Y., Williams, S.C., Sakurai, T., and Yanagisawa, M. (2009). Enhanced orexin receptor-2 signaling prevents diet-induced obesity and improves leptin sensitivity. Cell Metab *9*, 64-76.

Furet, J.P., Kong, L.C., Tap, J., Poitou, C., Basdevant, A., Bouillot, J.L., Mariat, D., Corthier, G., Dore, J., Henegar, C*., et al.* (2010). Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. Diabetes *59*, 3049-3057.

G

Gaykema, R.P., and Goehler, L.E. (2009). Lipopolysaccharide challenge-induced suppression of Fos in hypothalamic orexin neurons: their potential role in sickness behavior. Brain Behav Immun *23*, 926-930.

Gayle, D., Ilyin, S.E., and Plata-Salaman, C.R. (1999). Feeding status and bacterial LPS-induced cytokine and neuropeptide gene expression in hypothalamus. Am J Physiol *277*, R1188-1195.

Gaysinskaya, V.A., Karatayev, O., Chang, G.Q., and Leibowitz, S.F. (2007). Increased caloric intake after a high-fat preload: relation to circulating triglycerides and orexigenic peptides. Physiol Behav *91*, 142-153.

Geerling, J.C., Shin, J.W., Chimenti, P.C., and Loewy, A.D. (2010). Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. J Comp Neurol *518*, 1460-1499.

Gehlert, D.R., Chronwall, B.M., Schafer, M.P., and O'Donohue, T.L. (1987). Localization of neuropeptide Y messenger ribonucleic acid in rat and mouse brain by in situ hybridization. Synapse *1*, 25-31.

Gelin, J., Moldawer, L.L., Lonnroth, C., Sherry, B., Chizzonite, R., and Lundholm, K. (1991). Role of endogenous tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 for experimental tumor growth and the development of cancer cachexia. Cancer Res *51*, 415-421.

Gemma, C., and Bachstetter, A.D. (2013). The role of microglia in adult hippocampal neurogenesis. Front Cell Neurosci *7*, 229.

Gil, K., Bugajski, A., and Thor, P. (2011). Electrical vagus nerve stimulation decreases food consumption and weight gain in rats fed a high-fat diet. J Physiol Pharmacol *62*, 637-646.

Giugliano, D., Ceriello, A., and Esposito, K. (2006). The effects of diet on inflammation: emphasis on the metabolic syndrome. J Am Coll Cardiol *48*, 677-685.

Glabinski, A.R., Balasingam, V., Tani, M., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Yong, V.W., and Ransohoff, R.M. (1996). Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. J Immunol *156*, 4363-4368.

Goforth, P.B., Leinninger, G.M., Patterson, C.M., Satin, L.S., and Myers, M.G., Jr. (2014). Leptin acts via lateral hypothalamic area neurotensin neurons to inhibit orexin neurons by multiple GABA-independent mechanisms. J Neurosci *34*, 11405-11415.

Gomori, A., Ishihara, A., Ito, M., Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., Ito, M., Tanaka, T., Tokita, S., Moriya, M.*, et al.* (2003). Chronic intracerebroventricular infusion of MCH causes obesity in mice. Melanin-concentrating hormone. Am J Physiol Endocrinol Metab *284*, E583-588.

Gosselin, R.D., Varela, C., Banisadr, G., Mechighel, P., Rostene, W., Kitabgi, P., and Melik-Parsadaniantz, S. (2005). Constitutive expression of CCR2 chemokine receptor and inhibition by MCP-1/CCL2 of GABA-induced currents in spinal cord neurones. Journal of neurochemistry *95*, 1023-1034.

Gourmala, N.G., Buttini, M., Limonta, S., Sauter, A., and Boddeke, H.W. (1997). Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. J Neuroimmunol *74*, 35-44.

Gouwy, M., Struyf, S., Catusse, J., Proost, P., and Van Damme, J. (2004). Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. Journal of leukocyte biology *76*, 185-194.

Graham, M., Shutter, J.R., Sarmiento, U., Sarosi, I., and Stark, K.L. (1997). Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. Nat Genet *17*, 273-274.

Grayson, B.E., Levasseur, P.R., Williams, S.M., Smith, M.S., Marks, D.L., and Grove, K.L. (2010). Changes in melanocortin expression and inflammatory pathways in fetal offspring of nonhuman primates fed a high-fat diet. Endocrinology *151*, 1622-1632.

Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. Annu Rev Immunol *29*, 415-445.

Grilli, M., Raiteri, L., and Pittaluga, A. (2004). Somatostatin inhibits glutamate release from mouse cerebrocortical nerve endings through presynaptic sst2 receptors linked to the adenylyl cyclase-protein kinase A pathway. Neuropharmacology *46*, 388-396.

Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A.W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A.*, et al.* (2005). Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. Nat Neurosci *8*, 1289-1291.

Grossberg, A.J., Zhu, X., Leinninger, G.M., Levasseur, P.R., Braun, T.P., Myers, M.G., Jr., and Marks, D.L. (2011). Inflammation-induced lethargy is mediated by suppression of orexin neuron activity. J Neurosci *31*, 11376-11386.

Guan, X.M., Yu, H., Trumbauer, M., Frazier, E., Van der Ploeg, L.H., and Chen, H. (1998). Induction of neuropeptide Y expression in dorsomedial hypothalamus of diet-induced obese mice. Neuroreport *9*, 3415-3419.

Guo, L., Munzberg, H., Stuart, R.C., Nillni, E.A., and Bjorbaek, C. (2004). N-acetylation of hypothalamic alpha-melanocyte-stimulating hormone and regulation by leptin. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 11797-11802.

Gupta, S., Knight, A.G., Gupta, S., Keller, J.N., and Bruce-Keller, A.J. (2012). Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. Journal of neurochemistry *120*, 1060-1071.

Guyon, A., Banisadr, G., Rovere, C., Cervantes, A., Kitabgi, P., Melik-Parsadaniantz, S., and Nahon, J.L. (2005a). Complex effects of stromal cell-derived factor-1 alpha on melanin-concentrating hormone neuron excitability. The European journal of neuroscience *21*, 701-710.

Guyon, A., Massa, F., Rovere, C., and Nahon, J.L. (2008). How cytokines can influence the brain: a role for chemokines? J Neuroimmunol *198*, 46-55.

Guyon, A., Rovere, C., Cervantes, A., Allaeys, I., and Nahon, J.L. (2005e). Stromal cell-derived factor-1alpha directly modulates voltage-dependent currents of the action potential in mammalian neuronal cells. Journal of neurochemistry *93*, 963-973.

Guyon, A., Tardy, M.P., Rovere, C., Nahon, J.L., Barhanin, J., and Lesage, F. (2009). Glucose inhibition persists in hypothalamic neurons lacking tandem-pore K+ channels. J Neurosci *29*, 2528-2533.

H

Hagan, M.M., Rushing, P.A., Pritchard, L.M., Schwartz, M.W., Strack, A.M., Van Der Ploeg, L.H., Woods, S.C., and Seeley, R.J. (2000). Long-term orexigenic effects of AgRP-(83---132) involve mechanisms other than melanocortin receptor blockade. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *279*, R47-52.

Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Maffei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., and Friedman, J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Science *269*, 543-546.

Haring, S.J., and Harris, R.B. (2011). The relation between dietary fructose, dietary fat and leptin responsiveness in rats. Physiol Behav *104*, 914-922.

Haslett, P.A. (1998). Anticytokine approaches to the treatment of anorexia and cachexia. Semin Oncol *25*, 53-57.

Hassani, O.K., Lee, M.G., and Jones, B.E. (2009). Melanin-concentrating hormone neurons discharge in a reciprocal manner to orexin neurons across the sleep-wake cycle. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 2418-2422.

Hausler, K.G., Prinz, M., Nolte, C., Weber, J.R., Schumann, R.R., Kettenmann, H., and Hanisch, U.K. (2002). Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. The European journal of neuroscience *16*, 2113-2122.

Havrankova, J., Roth, J., and Brownstein, M. (1978). Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. Nature *272*, 827-829.

Hawes, B.E., Kil, E., Green, B., O'Neill, K., Fried, S., and Graziano, M.P. (2000). The melanin-concentrating hormone receptor couples to multiple G proteins to activate diverse intracellular signaling pathways. Endocrinology *141*, 4524-4532.

Hayashi, M., Luo, Y., Laning, J., Strieter, R.M., and Dorf, M.E. (1995). Production and function of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines in murine glial cells. J Neuroimmunol *60*, 143-150.

Hayashida, K., Nanki, T., Girschick, H., Yavuz, S., Ochi, T., and Lipsky, P.E. (2001). Synovial stromal cells from rheumatoid arthritis patients attract monocytes by producing MCP-1 and IL-8. Arthritis Res *3*, 118-126.

Hines, D.J., Choi, H.B., Hines, R.M., Phillips, A.G., and MacVicar, B.A. (2013). Prevention of LPS-induced microglia activation, cytokine production and sickness behavior with TLR4 receptor interfering peptides. PLoS One *8*, e60388.

Hisadome, K., Reimann, F., Gribble, F.M., and Trapp, S. (2010). Leptin directly depolarizes preproglucagon neurons in the nucleus tractus solitarius: electrical properties of glucagon-like Peptide 1 neurons. Diabetes *59*, 1890-1898.

Holland, W.L., Bikman, B.T., Wang, L.P., Yuguang, G., Sargent, K.M., Bulchand, S., Knotts, T.A., Shui, G., Clegg, D.J., Wenk, M.R*., et al.* (2011). Lipid-induced insulin resistance mediated by the proinflammatory receptor TLR4 requires saturated fatty acid-induced ceramide biosynthesis in mice. J Clin Invest *121*, 1858-1870.

Hopkins, S.J., and Rothwell, N.J. (1995). Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. Trends Neurosci *18*, 83-88.

Hosoda, H., Kojima, M., Mizushima, T., Shimizu, S., and Kangawa, K. (2003). Structural divergence of human ghrelin. Identification of multiple ghrelin-derived molecules produced by post-translational processing. J Biol Chem *278*, 64-70.

Hotamisligil, G.S. (2010). Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Cell *140*, 900-917.

Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. J Clin Invest *95*, 2409-2415.

Howard, J.K., Cave, B.J., Oksanen, L.J., Tzameli, I., Bjorbaek, C., and Flier, J.S. (2004). Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. Nat Med *10*, 734-738.

Hurwitz, A.A., Lyman, W.D., and Berman, J.W. (1995). Tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta upregulate astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1. J Neuroimmunol *57*, 193-198.

I

Ito, A., Suganami, T., Yamauchi, A., Degawa-Yamauchi, M., Tanaka, M., Kouyama, R., Kobayashi, Y., Nitta, N., Yasuda, K., Hirata, Y*., et al.* (2008). Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. J Biol Chem *283*, 35715-35723.

Iyer, A., Fairlie, D.P., Prins, J.B., Hammock, B.D., and Brown, L. (2010). Inflammatory lipid mediators in adipocyte function and obesity. Nat Rev Endocrinol *6*, 71-82.

J

Jamieson, T., Cook, D.N., Nibbs, R.J., Rot, A., Nixon, C., McLean, P., Alcami, A., Lira, S.A., Wiekowski, M., and Graham, G.J. (2005). The chemokine receptor D6 limits the inflammatory response in vivo. Nat Immunol *6*, 403-411.

Janik, J.E., Curti, B.D., Considine, R.V., Rager, H.C., Powers, G.C., Alvord, W.G., Smith, J.W., 2nd, Gause, B.L., and Kopp, W.C. (1997). Interleukin 1 alpha increases serum leptin concentrations in humans. J Clin Endocrinol Metab *82*, 3084-3086.

Johnson, R.W., Gheusi, G., Segreti, S., Dantzer, R., and Kelley, K.W. (1997). C3H/HeJ mice are refractory to lipopolysaccharide in the brain. Brain Res *752*, 219-226.

Joly-Amado, A., Denis, R.G., Castel, J., Lacombe, A., Cansell, C., Rouch, C., Kassis, N., Dairou, J., Cani, P.D., Ventura-Clapier, R.*, et al.* (2012). Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning. EMBO J *31*, 4276-4288.

K

Kalehua, A.N., Nagel, J.E., Whelchel, L.M., Gides, J.J., Pyle, R.S., Smith, R.J., Kusiak, J.W., and Taub, D.D. (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-2 are involved in both excitotoxin-induced neurodegeneration and regeneration. Exp Cell Res *297*, 197-211.

Kalra, S.P., Dube, M.G., Sahu, A., Phelps, C.P., and Kalra, P.S. (1991). Neuropeptide Y secretion increases in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. Proc Natl Acad Sci U S A *88*, 10931-10935.

Kang, K., Reilly, S.M., Karabacak, V., Gangl, M.R., Fitzgerald, K., Hatano, B., and Lee, C.H. (2008). Adipocyte-derived Th2 cytokines and myeloid PPARdelta regulate macrophage polarization and insulin sensitivity. Cell Metab *7*, 485-495.

Karteris, E., Machado, R.J., Chen, J., Zervou, S., Hillhouse, E.W., and Randeva, H.S. (2005). Food deprivation differentially modulates orexin receptor expression and signaling in rat hypothalamus and adrenal cortex. Am J Physiol Endocrinol Metab *288*, E1089-1100.

Kasukawa, T., Masumoto, K.H., Nikaido, I., Nagano, M., Uno, K.D., Tsujino, K., Hanashima, C., Shigeyoshi, Y., and Ueda, H.R. (2011). Quantitative expression profile of distinct functional regions in the adult mouse brain. PLoS One *6*, e23228.

Kelley, A.E., Baldo, B.A., Pratt, W.E., and Will, M.J. (2005). Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. Physiol Behav *86*, 773-795.

Kent, S., Bluthe, R.M., Dantzer, R., Hardwick, A.J., Kelley, K.W., Rothwell, N.J., and Vannice, J.L. (1992a). Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin 1. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 9117-9120.

Kent, S., Bluthe, R.M., Kelley, K.W., and Dantzer, R. (1992b). Sickness behavior as a new target for drug development. Trends Pharmacol Sci *13*, 24-28.

Kent, S., Kelley, K.W., and Dantzer, R. (1992c). Effects of lipopolysaccharide on food-motivated behavior in the rat are not blocked by an interleukin-1 receptor antagonist. Neurosci Lett *145*, 83-86.

Kettenmann, H., Hanisch, U.K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. Physiol Rev *91*, 461-553.

Kim, J.G., Suyama, S., Koch, M., Jin, S., Argente-Arizon, P., Argente, J., Liu, Z.W., Zimmer, M.R., Jeong, J.K., Szigeti-Buck, K.*, et al.* (2014). Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. Nat Neurosci *17*, 908-910.

Kim, K.W., Zhao, L., Donato, J., Jr., Kohno, D., Xu, Y., Elias, C.F., Lee, C., Parker, K.L., and Elmquist, J.K. (2011). Steroidogenic factor 1 directs programs regulating diet-induced thermogenesis and leptin action in the ventral medial hypothalamic nucleus. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 10673-10678.

Kim, M.S., Rossi, M., Abusnana, S., Sunter, D., Morgan, D.G., Small, C.J., Edwards, C.M., Heath, M.M., Stanley, S.A., Seal, L.J.*, et al.* (2000). Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. Diabetes *49*, 177-182.

Kirchgessner, T.G., Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., and Hotamisligil, G.S. (1997). Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes. J Clin Invest *100*, 2777-2782.

Kishimoto, T. (2010). IL-6: from its discovery to clinical applications. Int Immunol *22*, 347-352.

Kitamura, T., Feng, Y., Kitamura, Y.I., Chua, S.C., Jr., Xu, A.W., Barsh, G.S., Rossetti, L., and Accili, D. (2006). Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. Nat Med *12*, 534-540.

Kleinridders, A., Schenten, D., Konner, A.C., Belgardt, B.F., Mauer, J., Okamura, T., Wunderlich, F.T., Medzhitov, R., and Bruning, J.C. (2009). MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. Cell Metab *10*, 249-259.

Kokkotou, E., Jeon, J.Y., Wang, X., Marino, F.E., Carlson, M., Trombly, D.J., and Maratos-Flier, E. (2005). Mice with MCH ablation resist diet-induced obesity through strain-specific mechanisms. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *289*, R117-124.

Kong, D., Vong, L., Parton, L.E., Ye, C., Tong, Q., Hu, X., Choi, B., Bruning, J.C., and Lowell, B.B. (2010). Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves K(ATP) channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis. Cell Metab *12*, 545-552.

Kong, L.C., Tap, J., Aron-Wisnewsky, J., Pelloux, V., Basdevant, A., Bouillot, J.L., Zucker, J.D., Dore, J., and Clement, K. (2013). Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes. Am J Clin Nutr *98*, 16-24.

Kong, W., Stanley, S., Gardiner, J., Abbott, C., Murphy, K., Seth, A., Connoley, I., Ghatei, M., Stephens, D., and Bloom, S. (2003). A role for arcuate cocaine and amphetamine-regulated transcript in hyperphagia, thermogenesis, and cold adaptation. FASEB J *17*, 1688-1690.

Konner, A.C., Janoschek, R., Plum, L., Jordan, S.D., Rother, E., Ma, X., Xu, C., Enriori, P., Hampel, B., Barsh, G.S.*, et al.* (2007). Insulin action in AgRP-expressing neurons is required for suppression of hepatic glucose production. Cell Metab *5*, 438-449.

Konsman, J.P., and Dantzer, R. (2001). How the immune and nervous systems interact during disease-associated anorexia. Nutrition *17*, 664-668.

Konsman, J.P., Parnet, P., and Dantzer, R. (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. Trends Neurosci *25*, 154-159.

Konsman, J.P., Vigues, S., Mackerlova, L., Bristow, A., and Blomqvist, A. (2004). Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. J Comp Neurol *472*, 113-129.

Kozlowski, C., and Weimer, R.M. (2012). An automated method to quantify microglia morphology and application to monitor activation state longitudinally in vivo. PLoS One *7*, e31814.

Kringelbach, M.L., O'Doherty, J., Rolls, E.T., and Andrews, C. (2003). Activation of the human orbitofrontal cortex to a liquid food stimulus is correlated with its subjective pleasantness. Cereb Cortex *13*, 1064-1071.

Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N.*, et al.* (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. Nature *393*, 72-76.

Krolczyk, G., Zurowski, D., Sobocki, J., Slowiaczek, M.P., Laskiewicz, J., Matyja, A., Zaraska, K., Zaraska, W., and Thor, P.J. (2001). Effects of continuous microchip (MC) vagal neuromodulation on gastrointestinal function in rats. J Physiol Pharmacol *52*, 705-715.

Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G., and Gruters, A. (1998). Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. Nat Genet *19*, 155-157.

Kusano, K.F., Nakamura, K., Kusano, H., Nishii, N., Banba, K., Ikeda, T., Hashimoto, K., Yamamoto, M., Fujio, H., Miura, A.*, et al.* (2004). Significance of the level of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerosis. Circ J *68*, 671-676.

L

Langlet, F., Levin, B.E., Luquet, S., Mazzone, M., Messina, A., Dunn-Meynell, A.A., Balland, E., Lacombe, A., Mazur, D., Carmeliet, P.*, et al.* (2013). Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. Cell Metab *17*, 607-617.

Laviano, A., Gleason, J.R., Meguid, M.M., Yang, Z.J., Cangiano, C., and Rossi Fanelli, F. (2000). Effects of intra-VMN mianserin and IL-1ra on meal number in anorectic tumor-bearing rats. J Investig Med *48*, 40-48.

Laye, S., Gheusi, G., Cremona, S., Combe, C., Kelley, K., Dantzer, R., and Parnet, P. (2000). Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *279*, R93-98.

Le Thuc, O., Blondeau, N., Nahon, J.L., and Rovere, C. (2015). The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects. Ann N Y Acad Sci *1351*, 127-140.

Lebeaupin, C., Proics, E., de Bieville, C.H., Rousseau, D., Bonnafous, S., Patouraux, S., Adam, G., Lavallard, V.J., Rovere, C., Le Thuc, O.*, et al.* (2015). ER stress induces NLRP3 inflammasome activation and hepatocyte death. Cell Death Dis *6*, e1879.

Lebrun, P., and Van Obberghen, E. (2008). SOCS proteins causing trouble in insulin action. Acta Physiol (Oxf) *192*, 29-36.

Lee, D.A., Bedont, J.L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., Takiar, V., Charubhumi, V., Balordi, F., Takebayashi, H.*, et al.* (2012). Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. Nat Neurosci *15*, 700-702.

Lee, M., Kim, A., Chua, S.C., Jr., Obici, S., and Wardlaw, S.L. (2007). Transgenic MSH overexpression attenuates the metabolic effects of a high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab *293*, E121-131.

Lee, M.G., Hassani, O.K., and Jones, B.E. (2005). Discharge of identified orexin/hypocretin neurons across the sleep-waking cycle. J Neurosci *25*, 6716-6720.

Lee, T.H., Hoover, R.L., Williams, J.D., Sperling, R.I., Ravalese, J., 3rd, Spur, B.W., Robinson, D.R., Corey, E.J., Lewis, R.A., and Austen, K.F. (1985). Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. N Engl J Med *312*, 1217-1224.

Lee, Y.S., Challis, B.G., Thompson, D.A., Yeo, G.S., Keogh, J.M., Madonna, M.E., Wraight, V., Sims, M., Vatin, V., Meyre, D.*, et al.* (2006). A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. Cell Metab *3*, 135-140.

Leinninger, G.M., Jo, Y.H., Leshan, R.L., Louis, G.W., Yang, H., Barrera, J.G., Wilson, H., Opland, D.M., Faouzi, M.A., Gong, Y.*, et al.* (2009). Leptin acts via leptin receptor-expressing lateral hypothalamic neurons to modulate the mesolimbic dopamine system and suppress feeding. Cell Metab *10*, 89-98.

Leinninger, G.M., Opland, D.M., Jo, Y.H., Faouzi, M., Christensen, L., Cappellucci, L.A., Rhodes, C.J., Gnegy, M.E., Becker, J.B., Pothos, E.N.*, et al.* (2011). Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. Cell Metab *14*, 313-323.

Leloup, C., Casteilla, L., Carriere, A., Galinier, A., Benani, A., Carneiro, L., and Penicaud, L. (2011). Balancing mitochondrial redox signaling: a key point in metabolic regulation. Antioxid Redox Signal *14*, 519-530.

Leon-Cabrera, S., Solis-Lozano, L., Suarez-Alvarez, K., Gonzalez-Chavez, A., Bejar, Y.L., Robles-Diaz, G., and Escobedo, G. (2013). Hyperleptinemia is associated with parameters of low-grade systemic inflammation and metabolic dysfunction in obese human beings. Front Integr Neurosci *7*, 62.

Levin, B.E., Magnan, C., Dunn-Meynell, A., and Le Foll, C. (2011). Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how? Endocrinology *152*, 2552-2557.

Levy, J.A. (2009). The unexpected pleiotropic activities of RANTES. J Immunol *182*, 3945-3946.

Ley, R.E., Backhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D., and Gordon, J.I. (2005). Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 11070-11075.

Licinio, J., and Wong, M.L. (1997). Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. J Clin Invest *100*, 2941-2947.

Lin, S., Thomas, T.C., Storlien, L.H., and Huang, X.F. (2000). Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. Int J Obes Relat Metab Disord *24*, 639-646.

Liu, J., Divoux, A., Sun, J., Zhang, J., Clement, K., Glickman, J.N., Sukhova, G.K., Wolters, P.J., Du, J., Gorgun, C.Z.*, et al.* (2009). Genetic deficiency and pharmacological stabilization of mast cells reduce diet-induced obesity and diabetes in mice. Nat Med *15*, 940-945.

Lolis, E., and Murphy, J. (2007). The Structural Biology of Chemokines. In The Chemokine Receptors, J. Harrison, and N. Lukacs, eds. (Humana Press), pp. 9-30.

Lopez, M., Varela, L., Vazquez, M.J., Rodriguez-Cuenca, S., Gonzalez, C.R., Velagapudi, V.R., Morgan, D.A., Schoenmakers, E., Agassandian, K., Lage, R.*, et al.* (2010). Hypothalamic AMPK and fatty acid metabolism mediate thyroid regulation of energy balance. Nat Med *16*, 1001-1008.

Ludwig, D.S., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2001). Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. J Clin Invest *107*, 379-386.

Luquet, S., Perez, F.A., Hnasko, T.S., and Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. Science *310*, 683-685.

Luthin, D.R. (2007). Anti-obesity effects of small molecule melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) antagonists. Life Sci *81*, 423-440.

Lutz, T.A. (2012). Effects of amylin on eating and adiposity. Handb Exp Pharmacol, 231-250.

Lyons, W.E., Mamounas, L.A., Ricaurte, G.A., Coppola, V., Reid, S.W., Bora, S.H., Wihler, C., Koliatsos, V.E., and Tessarollo, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice develop aggressiveness and hyperphagia in conjunction with brain serotonergic abnormalities. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 15239-15244.

M

Macneil, D.J. (2013). The role of melanin-concentrating hormone and its receptors in energy homeostasis. Front Endocrinol (Lausanne) *4*, 49.

Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Housekeeping by chemokine scavenging. Blood *112*, 215-216.

Mantovani, A., Locati, M., Vecchi, A., Sozzani, S., and Allavena, P. (2001). Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. Trends Immunol *22*, 328-336.

Mantovani, G., Maccio, A., Lai, P., Massa, E., Ghiani, M., and Santona, M.C. (1998). Cytokine involvement in cancer anorexia/cachexia: role of megestrol acetate and medroxyprogesterone acetate on cytokine downregulation and improvement of clinical symptoms. Crit Rev Oncog *9*, 99-106.

Marcus, J.N., Aschkenasi, C.J., Lee, C.E., Chemelli, R.M., Saper, C.B., Yanagisawa, M., and Elmquist, J.K. (2001). Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. J Comp Neurol *435*, 6-25.

Maric, T., Woodside, B., and Luheshi, G.N. (2014). The effects of dietary saturated fat on basal hypothalamic neuroinflammation in rats. Brain Behav Immun *36*, 35-45.

Marks, J.L., Porte, D., Jr., Stahl, W.L., and Baskin, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. Endocrinology *127*, 3234-3236.

Marques, R.E., Guabiraba, R., Russo, R.C., and Teixeira, M.M. (2013). Targeting CCL5 in inflammation. Expert Opin Ther Targets *17*, 1439-1460.

Marsh, D.J., Weingarth, D.T., Novi, D.E., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Chen, A.S., Guan, X.M., Jiang, M.M., Feng, Y., Camacho, R.E.*, et al.* (2002). Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A *99*, 3240-3245.

Martinez de Morentin, P.B., Whittle, A.J., Ferno, J., Nogueiras, R., Dieguez, C., Vidal-Puig, A., and Lopez, M. (2012). Nicotine induces negative energy balance through hypothalamic AMP-activated protein kinase. Diabetes *61*, 807-817.

Matsuzawa-Nagata, N., Takamura, T., Ando, H., Nakamura, S., Kurita, S., Misu, H., Ota, T., Yokoyama, M., Honda, M., Miyamoto, K.*, et al.* (2008). Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. Metabolism *57*, 1071-1077.

Matthys, P., and Billiau, A. (1997). Cytokines and cachexia. Nutrition *13*, 763-770.

McCusker, R.H., and Kelley, K.W. (2013). Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. J Exp Biol *216*, 84-98.

McGowan, M.K., Andrews, K.M., Fenner, D., and Grossman, S.P. (1993). Chronic intrahypothalamic insulin infusion in the rat: behavioral specificity. Physiol Behav *54*, 1031-1034.

McNay, D.E., Briancon, N., Kokoeva, M.V., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. (2012). Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. J Clin Invest *122*, 142-152.

Meng, S.Z., Oka, A., and Takashima, S. (1999). Developmental expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the human cerebellum and brainstem. Brain Dev *21*, 30-35.

Mercer, A.J., Hentges, S.T., Meshul, C.K., and Low, M.J. (2013). Unraveling the central proopiomelanocortin neural circuits. Front Neurosci *7*, 19.

Milanski, M., Degasperi, G., Coope, A., Morari, J., Denis, R., Cintra, D.E., Tsukumo, D.M., Anhe, G., Amaral, M.E., Takahashi, H.K.*, et al.* (2009). Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. J Neurosci *29*, 359-370.

Mileykovskiy, B.Y., Kiyashchenko, L.I., and Siegel, J.M. (2005). Behavioral correlates of activity in identified hypocretin/orexin neurons. Neuron *46*, 787-798.

Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., Kim, Y.B., Lee, A., Xue, B., Mu, J., Foufelle, F., Ferre, P., Birnbaum, M.J.*, et al.* (2004). AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. Nature *428*, 569-574.

Mizuno, T.M., Kelley, K.A., Pasinetti, G.M., Roberts, J.L., and Mobbs, C.V. (2003). Transgenic neuronal expression of proopiomelanocortin attenuates hyperphagic response to fasting and reverses metabolic impairments in leptin-deficient obese mice. Diabetes *52*, 2675-2683.

Mizuno, T.M., and Mobbs, C.V. (1999). Hypothalamic agouti-related protein messenger ribonucleic acid is inhibited by leptin and stimulated by fasting. Endocrinology *140*, 814-817.

Moldawer, L.L., Rogy, M.A., and Lowry, S.F. (1992). The role of cytokines in cancer cachexia. JPEN J Parenter Enteral Nutr *16*, 43S-49S.

Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A.*, et al.* (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature *387*, 903-908.

Monteiro-Sepulveda, M., Touch, S., Mendes-Sa, C., Andre, S., Poitou, C., Allatif, O., Cotillard, A., Fohrer-Ting, H., Hubert, E.L., Remark, R.*, et al.* (2015). Jejunal T Cell Inflammation in Human Obesity Correlates with Decreased Enterocyte Insulin Signaling. Cell Metab *22*, 113-124.

Moraes, J.C., Coope, A., Morari, J., Cintra, D.E., Roman, E.A., Pauli, J.R., Romanatto, T., Carvalheira, J.B., Oliveira, A.L., Saad, M.J.*, et al.* (2009). High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. PLoS One *4*, e5045.

Moran, T.H., Baldessarini, A.R., Salorio, C.F., Lowery, T., and Schwartz, G.J. (1997). Vagal afferent and efferent contributions to the inhibition of food intake by cholecystokinin. Am J Physiol *272*, R1245-1251.

Moran, T.H., Katz, L.F., Plata-Salaman, C.R., and Schwartz, G.J. (1998). Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors. Am J Physiol *274*, R618-625.

Morselli, E., Fuente-Martin, E., Finan, B., Kim, M., Frank, A., Garcia-Caceres, C., Navas, C.R., Gordillo, R., Neinast, M., Kalainayakan, S.P.*, et al.* (2014). Hypothalamic PGC-1alpha protects against high-fat diet exposure by regulating ERalpha. Cell Rep *9*, 633-645.

Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., and Schwartz, M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. Nature *443*, 289-295.

Morton, G.J., Meek, T.H., and Schwartz, M.W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. Nature reviews Neuroscience *15*, 367-378.

Mundinger, T.O., Cummings, D.E., and Taborsky, G.J., Jr. (2006). Direct stimulation of ghrelin secretion by sympathetic nerves. Endocrinology *147*, 2893-2901.

Munzberg, H., Huo, L., Nillni, E.A., Hollenberg, A.N., and Bjorbaek, C. (2003). Role of signal transducer and activator of transcription 3 in regulation of hypothalamic proopiomelanocortin gene expression by leptin. Endocrinology *144*, 2121-2131.

Murphy, P.M. (2002). International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. Pharmacol Rev *54*, 227-229.

N

Nahon, J.L. (2006). The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. C R Biol *329*, 623-638; discussion 653-625.

Nakamura, T., Furuhashi, M., Li, P., Cao, H., Tuncman, G., Sonenberg, N., Gorgun, C.Z., and Hotamisligil, G.S. (2010). Double-stranded RNA-dependent protein kinase links pathogen sensing with stress and metabolic homeostasis. Cell *140*, 338-348.

Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., and Goto, K. (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. Brain Res *827*, 243-260.

Nesmelova, I.V., Sham, Y., Gao, J., and Mayo, K.H. (2008). CXC and CC chemokines form mixed heterodimers: association free energies from molecular dynamics simulations and experimental correlations. J Biol Chem *283*, 24155-24166.

Nguyen, A.D., Mitchell, N.F., Lin, S., Macia, L., Yulyaningsih, E., Baldock, P.A., Enriquez, R.F., Zhang, L., Shi, Y.C., Zolotukhin, S.*, et al.* (2012). Y1 and Y5 receptors are both required for the regulation of food intake and energy homeostasis in mice. PLoS One *7*, e40191.

Noguchi, Y., Yoshikawa, T., Matsumoto, A., Svaninger, G., and Gelin, J. (1996). Are cytokines possible mediators of cancer cachexia? Surg Today *26*, 467-475.

O

O'Connor, T., Borsig, L., and Heikenwalder, M. (2015). CCL2-CCR2 Signaling in Disease Pathogenesis. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets *15*, 105-118.

Odegaard, J.I., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goforth, M.H., Morel, C.R., Subramanian, V., Mukundan, L., Red Eagle, A., Vats, D., Brombacher, F., Ferrante, A.W.*, et al.* (2007). Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. Nature *447*, 1116-1120.

Ogimoto, K., Harris, M.K., Jr., and Wisse, B.E. (2006). MyD88 is a key mediator of anorexia, but not weight loss, induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 beta. Endocrinology *147*, 4445-4453.

Oh, I.S., Thaler, J.P., Ogimoto, K., Wisse, B.E., Morton, G.J., and Schwartz, M.W. (2010). Central administration of interleukin-4 exacerbates hypothalamic inflammation and weight gain during high-fat feeding. Am J Physiol Endocrinol Metab *299*, E47-53.

Ohmura, K., Ishimori, N., Ohmura, Y., Tokuhara, S., Nozawa, A., Horii, S., Andoh, Y., Fujii, S., Iwabuchi, K., Onoe, K.*, et al.* (2010). Natural killer T cells are involved in adipose tissues inflammation and glucose intolerance in diet-induced obese mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol *30*, 193-199.

Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. Annu Rev Physiol *72*, 219-246.

Oliveira, V., Marinho, R., Vitorino, D., Santos, G.A., Moraes, J.C., Dragano, N., Sartori-Cintra, A., Pereira, L., Catharino, R.R., da Silva, A.S.*, et al.* (2015). Diets Containing alpha-Linolenic (omega3) or Oleic (omega9) Fatty Acids Rescues Obese Mice From Insulin Resistance. Endocrinology *156*, 4033-4046.

Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y.K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I., and Barsh, G.S. (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. Science *278*, 135-138.

Olszewski, P.K., Shaw, T.J., Grace, M.K., Hoglund, C.E., Fredriksson, R., Schioth, H.B., and Levine, A.S. (2009). Complexity of neural mechanisms underlying overconsumption of sugar in scheduled feeding: involvement of opioids, orexin, oxytocin and NPY. Peptides *30*, 226-233.

P

Palmiter, R.D., Erickson, J.C., Hollopeter, G., Baraban, S.C., and Schwartz, M.W. (1998). Life without neuropeptide Y. Recent Prog Horm Res *53*, 163-199.

Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L.*, et al.* (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. Science *333*, 1456-1458.

Park, E.S., Yi, S.J., Kim, J.S., Lee, H.S., Lee, I.S., Seong, J.K., Jin, H.K., and Yoon, Y.S. (2004). Changes in orexin-A and neuropeptide Y expression in the hypothalamus of the fasted and high-fat diet fed rats. J Vet Sci *5*, 295-302.

Parker, K.L., Rice, D.A., Lala, D.S., Ikeda, Y., Luo, X., Wong, M., Bakke, M., Zhao, L., Frigeri, C., Hanley, N.A.*, et al.* (2002). Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. Recent Prog Horm Res *57*, 19-36.

Peyron, C., Sapin, E., Leger, L., Luppi, P.H., and Fort, P. (2009). Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. Peptides *30*, 2052-2059.

Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., and Kilduff, T.S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. J Neurosci *18*, 9996-10015.

Pissios, P. (2009). Animals models of MCH function and what they can tell us about its role in energy balance. Peptides *30*, 2040-2044.

Pissios, P., Bradley, R.L., and Maratos-Flier, E. (2006). Expanding the scales: The multiple roles of MCH in regulating energy balance and other biological functions. Endocr Rev *27*, 606-620.

Pissios, P., Trombly, D.J., Tzameli, I., and Maratos-Flier, E. (2003). Melanin-concentrating hormone receptor 1 activates extracellular signal-regulated kinase and synergizes with G(s)-coupled pathways. Endocrinology *144*, 3514-3523.

Plata-Salaman, C.R. (2000). Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome. Nutrition *16*, 1009-1012.

Plata-Salaman, C.R. (2001). Cytokines and feeding. Int J Obes Relat Metab Disord *25 Suppl 5*, S48-52.

Poggioli, R., Vergoni, A.V., and Bertolini, A. (1986). ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. Peptides *7*, 843-848.

Posey, K.A., Clegg, D.J., Printz, R.L., Byun, J., Morton, G.J., Vivekanandan-Giri, A., Pennathur, S., Baskin, D.G., Heinecke, J.W., Woods, S.C.*, et al.* (2009). Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. Am J Physiol Endocrinol Metab *296*, E1003-1012.

Presse, F., Sorokovsky, I., Max, J.P., Nicolaidis, S., and Nahon, J.L. (1996). Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat. Neuroscience *71*, 735-745.

Proudfoot, A.E., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N., and Kosco-Vilbois, M.H. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 1885-1890.

Purkayastha, S., Zhang, G., and Cai, D. (2011a). Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK-beta and NF-kappaB. Nat Med *17*, 883-887.

Purkayastha, S., Zhang, H., Zhang, G., Ahmed, Z., Wang, Y., and Cai, D. (2011b). Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 2939-2944.

Q

Qian, S., Chen, H., Weingarth, D., Trumbauer, M.E., Novi, D.E., Guan, X., Yu, H., Shen, Z., Feng, Y., Frazier, E.*, et al.* (2002). Neither agouti-related protein nor neuropeptide Y is critically required for the regulation of energy homeostasis in mice. Mol Cell Biol *22*, 5027-5035.

Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, R., Kanarek, R., and Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. Nature *380*, 243-247.

Quan, N., Whiteside, M., and Herkenham, M. (1998). Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. Neuroscience *83*, 281-293.

Quinones, M.P., Kalkonde, Y., Estrada, C.A., Jimenez, F., Ramirez, R., Mahimainathan, L., Mummidi, S., Choudhury, G.G., Martinez, H., Adams, L.*, et al.* (2008). Role of astrocytes and chemokine systems in acute TNFalpha induced demyelinating syndrome: CCR2-dependent signals promote astrocyte activation and survival via NF-kappaB and Akt. Mol Cell Neurosci *37*, 96-109.

R

Raiteri, M., Angelini, F., and Levi, G. (1974). A simple apparatus for studying the release of neurotransmitters from synaptosomes. Eur J Pharmacol *25*, 411-414.

Rankine, E.L., Hughes, P.M., Botham, M.S., Perry, V.H., and Felton, L.M. (2006). Brain cytokine synthesis induced by an intraparenchymal injection of LPS is reduced in MCP-1-deficient mice prior to leucocyte recruitment. The European journal of neuroscience *24*, 77-86.

Ransohoff, R.M., and Brown, M.A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. J Clin Invest *122*, 1164-1171.

Ransohoff, R.M., Hamilton, T.A., Tani, M., Stoler, M.H., Shick, H.E., Major, J.A., Estes, M.L., Thomas, D.M., and Tuohy, V.K. (1993). Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. FASEB J *7*, 592-600.

Reaux-Le Goazigo, A., Van Steenwinckel, J., Rostene, W., and Melik Parsadaniantz, S. (2013). Current status of chemokines in the adult CNS. Progress in neurobiology *104*, 67-92.

Reyes, T.M., and Sawchenko, P.E. (2002). Involvement of the arcuate nucleus of the hypothalamus in interleukin-1-induced anorexia. J Neurosci *22*, 5091-5099.

Reynolds, C.M., Draper, E., Keogh, B., Rahman, A., Moloney, A.P., Mills, K.H., Loscher, C.E., and Roche, H.M. (2009). A conjugated linoleic acid-enriched beef diet attenuates lipopolysaccharide-induced inflammation in mice in part through PPARgamma-mediated suppression of toll-like receptor 4. J Nutr *139*, 2351-2357.

Richard, D., and Baraboi, D. (2004). Circuitries involved in the control of energy homeostasis and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. Treat Endocrinol *3*, 269-277.

Risold, P.Y., Croizier, S., Legagneux, K., Brischoux, F., Fellmann, D., and Griffond, B. (2009). The development of the MCH system. Peptides *30*, 1969-1972.

Robertson, S.A., Leinninger, G.M., and Myers, M.G., Jr. (2008). Molecular and neural mediators of leptin action. Physiol Behav *94*, 637-642.

Rolls, E.T. (2005). Taste, olfactory, and food texture processing in the brain, and the control of food intake. Physiol Behav *85*, 45-56.

Romanatto, T., Cesquini, M., Amaral, M.E., Roman, E.A., Moraes, J.C., Torsoni, M.A., Cruz-Neto, A.P., and Velloso, L.A. (2007). TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient--effects on leptin and insulin signaling pathways. Peptides *28*, 1050-1058.

Romanatto, T., Roman, E.A., Arruda, A.P., Denis, R.G., Solon, C., Milanski, M., Moraes, J.C., Bonfleur, M.L., Degasperi, G.R., Picardi, P.K.*, et al.* (2009). Deletion of tumor necrosis factor-alpha receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. J Biol Chem *284*, 36213-36222.

Romeo, H.E., Tio, D.L., Rahman, S.U., Chiappelli, F., and Taylor, A.N. (2001). The glossopharyngeal nerve as a novel pathway in immune-to-brain communication: relevance to neuroimmune surveillance of the oral cavity. J Neuroimmunol *115*, 91-100.

Ropelle, E.R., Pauli, J.R., Zecchin, K.G., Ueno, M., de Souza, C.T., Morari, J., Faria, M.C., Velloso, L.A., Saad, M.J., and Carvalheira, J.B. (2007). A central role for neuronal adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in cancer-induced anorexia. Endocrinology *148*, 5220-5229.

Rostene, W., Dansereau, M.A., Godefroy, D., Van Steenwinckel, J., Reaux-Le Goazigo, A., Melik-Parsadaniantz, S., Apartis, E., Hunot, S., Beaudet, N., and Sarret, P. (2011). Neurochemokines: a menage a trois providing new insights on the functions of chemokines in the central nervous system. Journal of neurochemistry *118*, 680-694.

Rostene, W., Kitabgi, P., and Parsadaniantz, S.M. (2007). Chemokines: a new class of neuromodulator? Nature reviews Neuroscience *8*, 895-903.

Rothwell, N.J., and Hopkins, S.J. (1995). Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. Trends Neurosci *18*, 130-136.

Rui, L. (2013). Brain regulation of energy balance and body weight. Rev Endocr Metab Disord *14*, 387-407.

Ruud, J., Nilsson, A., Engstrom Ruud, L., Wang, W., Nilsberth, C., Iresjo, B.M., Lundholm, K., Engblom, D., and Blomqvist, A. (2013). Cancer-induced anorexia in tumor-bearing mice is dependent on cyclooxygenase-1. Brain Behav Immun *29*, 124-135.

S

Saberi, M., Woods, N.B., de Luca, C., Schenk, S., Lu, J.C., Bandyopadhyay, G., Verma, I.M., and Olefsky, J.M. (2009). Hematopoietic cell-specific deletion of toll-like receptor 4 ameliorates hepatic and adipose tissue insulin resistance in high-fat-fed mice. Cell Metab *10*, 419-429.

Sabio, G., Das, M., Mora, A., Zhang, Z., Jun, J.Y., Ko, H.J., Barrett, T., Kim, J.K., and Davis, R.J. (2008). A stress signaling pathway in adipose tissue regulates hepatic insulin resistance. Science *322*, 1539-1543.

Saghizadeh, M., Ong, J.M., Garvey, W.T., Henry, R.R., and Kern, P.A. (1996). The expression of TNF alpha by human muscle. Relationship to insulin resistance. J Clin Invest *97*, 1111-1116.

Sailer, A.W., Sano, H., Zeng, Z., McDonald, T.P., Pan, J., Pong, S.S., Feighner, S.D., Tan, C.P., Fukami, T., Iwaasa, H.*, et al.* (2001). Identification and characterization of a second melanin-concentrating hormone receptor, MCH-2R. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 7564-7569.

Saito, Y., Cheng, M., Leslie, F.M., and Civelli, O. (2001). Expression of the melanin-concentrating hormone (MCH) receptor mRNA in the rat brain. J Comp Neurol *435*, 26-40.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S.*, et al.* (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. Cell *92*, 573-585.

Sam, A.H., Troke, R.C., Tan, T.M., and Bewick, G.A. (2012). The role of the gut/brain axis in modulating food intake. Neuropharmacology *63*, 46-56.

Sanders, S.K., Crean, S.M., Boxer, P.A., Kellner, D., LaRosa, G.J., and Hunt, S.W., 3rd (2000). Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell. J Immunol *165*, 4877-4883.

Sarraf, P., Frederich, R.C., Turner, E.M., Ma, G., Jaskowiak, N.T., Rivet, D.J., 3rd, Flier, J.S., Lowell, B.B., Fraker, D.L., and Alexander, H.R. (1997). Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia. J Exp Med *185*, 171-175.

Sartipy, P., and Loskutoff, D.J. (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 7265-7270.

Savontaus, E., Breen, T.L., Kim, A., Yang, L.M., Chua, S.C., Jr., and Wardlaw, S.L. (2004). Metabolic effects of transgenic melanocyte-stimulating hormone overexpression in lean and obese mice. Endocrinology *145*, 3881-3891.

Scarlett, J.M., Jobst, E.E., Enriori, P.J., Bowe, D.D., Batra, A.K., Grant, W.F., Cowley, M.A., and Marks, D.L. (2007). Regulation of central melanocortin signaling by interleukin-1 beta. Endocrinology *148*, 4217-4225.

Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., Ransohoff, R.M., Greenberg, M.E., Barres, B.A., and Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. Neuron *74*, 691-705.

Schall, T.J., Bacon, K., Toy, K.J., and Goeddel, D.V. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. Nature *347*, 669-671.

Schall, T.J., Jongstra, J., Dyer, B.J., Jorgensen, J., Clayberger, C., Davis, M.M., and Krensky, A.M. (1988). A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. J Immunol *141*, 1018-1025.

Schele, E., Fekete, C., Egri, P., Fuzesi, T., Palkovits, M., Keller, E., Liposits, Z., Gereben, B., Karlsson-Lindahl, L., Shao, R.*, et al.* (2012). Interleukin-6 receptor alpha is co-localised with melanin-concentrating hormone in human and mouse hypothalamus. J Neuroendocrinol *24*, 930-943.

Schellenberg, A.E., Buist, R., Del Bigio, M.R., Toft-Hansen, H., Khorooshi, R., Owens, T., and Peeling, J. (2012). Blood-brain barrier disruption in CCL2 transgenic mice during pertussis toxin-induced brain inflammation. Fluids Barriers CNS *9*, 10.

Schiltz, J.C., and Sawchenko, P.E. (2002). Distinct brain vascular cell types manifest inducible cyclooxygenase expression as a function of the strength and nature of immune insults. J Neurosci *22*, 5606-5618.

Schneck, A.S., Iannelli, A., Patouraux, S., Rousseau, D., Bonnafous, S., Bailly-Maitre, B., Le Thuc, O., Rovere, C., Panaia-Ferrari, P., Anty, R.*, et al.* (2014). Effects of sleeve gastrectomy in high fat diet-induced obese mice: respective role of reduced caloric intake, white adipose tissue inflammation and changes in adipose tissue and ectopic fat depots. Surg Endosc *28*, 592-602.

Schneeberger, M., Gomis, R., and Claret, M. (2014). Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. J Endocrinol *220*, T25-46.

Schneider, E.R., Rada, P., Darby, R.D., Leibowitz, S.F., and Hoebel, B.G. (2007). Orexigenic peptides and alcohol intake: differential effects of orexin, galanin, and ghrelin. Alcohol Clin Exp Res *31*, 1858-1865.

Schumann, R.R., Belka, C., Reuter, D., Lamping, N., Kirschning, C.J., Weber, J.R., and Pfeil, D. (1998). Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells. Blood *91*, 577-584.

Schwartz, G.J., Salorio, C.F., Skoglund, C., and Moran, T.H. (1999). Gut vagal afferent lesions increase meal size but do not block gastric preload-induced feeding suppression. Am J Physiol *276*, R1623-1629.

Schwartz, M.W., Seeley, R.J., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P., and Baskin, D.G. (1997). Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. Diabetes *46*, 2119-2123.

Schwartz, M.W., Sipols, A.J., Marks, J.L., Sanacora, G., White, J.D., Scheurink, A., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Woods, S.C., Figlewicz, D.P.*, et al.* (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. Endocrinology *130*, 3608-3616.

Segal-Lieberman, G., Bradley, R.L., Kokkotou, E., Carlson, M., Trombly, D.J., Wang, X., Bates, S., Myers, M.G., Jr., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (2003). Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A *100*, 10085-10090.

Segreti, J., Gheusi, G., Dantzer, R., Kelley, K.W., and Johnson, R.W. (1997). Defect in interleukin-1beta secretion prevents sickness behavior in C3H/HeJ mice. Physiol Behav *61*, 873-878.

Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. Nat Immunol *7*, 311-317.

Sergeyev, V., Broberger, C., and Hokfelt, T. (2001). Effect of LPS administration on the expression of POMC, NPY, galanin, CART and MCH mRNAs in the rat hypothalamus. Brain Res Mol Brain Res *90*, 93-100.

Shapiro, A., Tumer, N., Gao, Y., Cheng, K.Y., and Scarpace, P.J. (2011). Prevention and reversal of diet-induced leptin resistance with a sugar-free diet despite high fat content. Br J Nutr *106*, 390-397.

Shearman, L.P., Camacho, R.E., Sloan Stribling, D., Zhou, D., Bednarek, M.A., Hreniuk, D.L., Feighner, S.D., Tan, C.P., Howard, A.D., Van der Ploeg, L.H.*, et al.* (2003). Chronic MCH-1 receptor modulation alters appetite, body weight and adiposity in rats. Eur J Pharmacol *475*, 37-47.

Shen, L., Tso, P., Wang, D.Q., Woods, S.C., Davidson, W.S., Sakai, R., and Liu, M. (2009). Up-regulation of apolipoprotein E by leptin in the hypothalamus of mice and rats. Physiol Behav *98*, 223-228.

Sherry, B.A., Gelin, J., Fong, Y., Marano, M., Wei, H., Cerami, A., Lowry, S.F., Lundholm, K.G., and Moldawer, L.L. (1989). Anticachectin/tumor necrosis factor-alpha antibodies attenuate development of cachexia in tumor models. FASEB J *3*, 1956-1962.

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

Shimada, M., Tritos, N.A., Lowell, B.B., Flier, J.S., and Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. Nature *396*, 670-674.

Shoelson, S.E., Lee, J., and Goldfine, A.B. (2006). Inflammation and insulin resistance. J Clin Invest *116*, 1793-1801.

Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., and Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. Front Cell Neurosci *7*, 6.

Simopoulos, A.P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. J Am Coll Nutr *21*, 495-505.

Simpson, J., Rezaie, P., Newcombe, J., Cuzner, M.L., Male, D., and Woodroofe, M.N. (2000). Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. J Neuroimmunol *108*, 192-200.

Simpson, J.E., Newcombe, J., Cuzner, M.L., and Woodroofe, M.N. (1998). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. J Neuroimmunol *84*, 238-249.

Sipols, A.J., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1995). Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. Diabetes *44*, 147-151.

Skelly, D.T., Hennessy, E., Dansereau, M.A., and Cunningham, C. (2013). A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of systemic LPS, IL-1beta, [corrected] TNF-alpha and IL-6 challenges in C57BL/6 mice. PLoS One *8*, e69123.

Small, C.J., Liu, Y.L., Stanley, S.A., Connoley, I.P., Kennedy, A., Stock, M.J., and Bloom, S.R. (2003). Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. Int J Obes Relat Metab Disord *27*, 530-533.

Smart, J.L., Tolle, V., and Low, M.J. (2006). Glucocorticoids exacerbate obesity and insulin resistance in neuron-specific proopiomelanocortin-deficient mice. J Clin Invest *116*, 495-505.

Smith, R.G., Palyha, O.C., Feighner, S.D., Tan, C.P., McKee, K.K., Hreniuk, D.L., Yang, L., Morriello, G., Nargund, R., Patchett, A.A.*, et al.* (1999). Growth hormone releasing substances: types and their receptors. Horm Res *51 Suppl 3*, 1-8.

Sofroniew, M.V. (2005). Reactive astrocytes in neural repair and protection. Neuroscientist *11*, 400-407.

Sohn, J.W., Elmquist, J.K., and Williams, K.W. (2013). Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. Trends Neurosci *36*, 504-512.

Song, L., and Pachter, J.S. (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. Microvasc Res *67*, 78-89.

Sozzani, S., Zhou, D., Locati, M., Rieppi, M., Proost, P., Magazin, M., Vita, N., van Damme, J., and Mantovani, A. (1994). Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3. Similarities and differences with MCP-1. J Immunol *152*, 3615-3622.

Spadaro, F., and Dunn, A.J. (1990). Intracerebroventricular administration of interleukin-1 to mice alters investigation of stimuli in a novel environment. Brain Behav Immun *4*, 308-322.

Stamatovic, S.M., Dimitrijevic, O.B., Keep, R.F., and Andjelkovic, A.V. (2006). Protein kinase Calpha-RhoA cross-talk in CCL2-induced alterations in brain endothelial permeability. J Biol Chem *281*, 8379-8388.

Stamatovic, S.M., Keep, R.F., Kunkel, S.L., and Andjelkovic, A.V. (2003). Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. J Cell Sci *116*, 4615-4628.

Stanley, B.G., Kyrkouli, S.E., Lampert, S., and Leibowitz, S.F. (1986). Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. Peptides *7*, 1189-1192.

Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Bue-Valleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H.M., Kriauciunas, A*., et al.* (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. Nature *377*, 530-532.

Sternberg, E.M. (1997). Neural-immune interactions in health and disease. J Clin Invest *100*, 2641-2647.

Sternson, S.M., and Atasoy, D. (2014). Agouti-related protein neuron circuits that regulate appetite. Neuroendocrinology *100*, 95-102.

Suzuki, K., Jayasena, C.N., and Bloom, S.R. (2012). Obesity and appetite control. Exp Diabetes Res *2012*, 824305.

Sweet, D.C., Levine, A.S., Billington, C.J., and Kotz, C.M. (1999). Feeding response to central orexins. Brain Res *821*, 535-538.

T

Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. Cell *58*, 573-581.

Takahashi, K., Lin, J.S., and Sakai, K. (2008). Neuronal activity of orexin and non-orexin waking-active neurons during wake-sleep states in the mouse. Neuroscience *153*, 860-870.

Tan, C.P., Sano, H., Iwaasa, H., Pan, J., Sailer, A.W., Hreniuk, D.L., Feighner, S.D., Palyha, O.C., Pong, S.S., Figueroa, D.J*., et al.* (2002). Melanin-concentrating hormone receptor subtypes 1 and 2: species-specific gene expression. Genomics *79*, 785-792.

Teaford, M.F., and Ungar, P.S. (2000). Diet and the evolution of the earliest human ancestors. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 13506-13511.

Thaler, J.P., Yi, C.X., Schur, E.A., Guyenet, S.J., Hwang, B.H., Dietrich, M.O., Zhao, X., Sarruf, D.A., Izgur, V., Maravilla, K.R*., et al.* (2012). Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. J Clin Invest *122*, 153-162.

Thelen, M., Munoz, L.M., Rodriguez-Frade, J.M., and Mellado, M. (2010). Chemokine receptor oligomerization: functional considerations. Curr Opin Pharmacol *10*, 38-43.

Thelen, M., and Stein, J.V. (2008). How chemokines invite leukocytes to dance. Nat Immunol *9*, 953-959.

Thibeault, I., Laflamme, N., and Rivest, S. (2001). Regulation of the gene encoding the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in the mouse and rat brain in response to circulating LPS and proinflammatory cytokines. J Comp Neurol *434*, 461-477.

Thompson, W.L., Karpus, W.J., and Van Eldik, L.J. (2008). MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. J Neuroinflammation *5*, 35.

Thorpe, A.J., and Kotz, C.M. (2005). Orexin A in the nucleus accumbens stimulates feeding and locomotor activity. Brain Res *1050*, 156-162.

Tisdale, M.J. (1997). Biology of cachexia. J Natl Cancer Inst *89*, 1763-1773.

Travagli, R.A., Hermann, G.E., Browning, K.N., and Rogers, R.C. (2006). Brainstem circuits regulating gastric function. Annu Rev Physiol *68*, 279-305.

Tschop, M., Smiley, D.L., and Heiman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. Nature *407*, 908-913.

Tsukumo, D.M., Carvalho-Filho, M.A., Carvalheira, J.B., Prada, P.O., Hirabara, S.M., Schenka, A.A., Araujo, E.P., Vassallo, J., Curi, R., Velloso, L.A*., et al.* (2007). Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. Diabetes *56*, 1986-1998.

Tsujino, N., Yamanaka, A., Ichiki, K., Muraki, Y., Kilduff, T.S., Yagami, K., Takahashi, S., Goto, K., and Sakurai, T. (2005). Cholecystokinin activates orexin/hypocretin neurons through the cholecystokinin A receptor. J Neurosci *25*, 7459-7469.

U

Ueta, Y., Hashimoto, H., Onuma, E., Takuwa, Y., and Ogata, E. (2007). Hypothalamic neuropeptides and appetite response in anorexia-cachexia animal. Endocr J *54*, 831-838.

Uysal, K.T., Wiesbrock, S.M., Marino, M.W., and Hotamisligil, G.S. (1997). Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. Nature *389*, 610-614.

V

Valdearcos, M., Robblee, M.M., Benjamin, D.I., Nomura, D.K., Xu, A.W., and Koliwad, S.K. (2014). Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. Cell Rep *9*, 2124-2138.

Vallerie, S.N., Furuhashi, M., Fucho, R., and Hotamisligil, G.S. (2008). A predominant role for parenchymal c-Jun amino terminal kinase (JNK) in the regulation of systemic insulin sensitivity. PLoS One *3*, e3151.

Van Coillie, E., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (1999). The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. Cytokine Growth Factor Rev *10*, 61-86.

van der Lely, A.J., Tschop, M., Heiman, M.L., and Ghigo, E. (2004). Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. Endocr Rev *25*, 426-457.

van der Meer, P., Ulrich, A.M., Gonzalez-Scarano, F., and Lavi, E. (2000). Immunohistochemical analysis of CCR2, CCR3, CCR5, and CXCR4 in the human brain: potential mechanisms for HIV dementia. Exp Mol Pathol *69*, 192-201.

Velloso, L.A., Araujo, E.P., and de Souza, C.T. (2008). Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. Neuroimmunomodulation *15*, 189-193.

Ventre, J., Doebber, T., Wu, M., MacNaul, K., Stevens, K., Pasparakis, M., Kollias, G., and Moller, D.E. (1997). Targeted disruption of the tumor necrosis factor-alpha gene: metabolic consequences in obese and nonobese mice. Diabetes *46*, 1526-1531.

Verret, L., Goutagny, R., Fort, P., Cagnon, L., Salvert, D., Leger, L., Boissard, R., Salin, P., Peyron, C., and Luppi, P.H. (2003). A role of melanin-concentrating hormone producing neurons in the central regulation of paradoxical sleep. BMC Neurosci *4*, 19.

Vitkovic, L., Konsman, J.P., Bockaert, J., Dantzer, R., Homburger, V., and Jacque, C. (2000). Cytokine signals propagate through the brain. Mol Psychiatry *5*, 604-615.

von Hundelshausen, P., Koenen, R.R., Sack, M., Mause, S.F., Adriaens, W., Proudfoot, A.E., Hackeng, T.M., and Weber, C. (2005). Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. Blood *105*, 924-930.

W

Wake, H., Moorhouse, A.J., Miyamoto, A., and Nabekura, J. (2013). Microglia: actively surveying and shaping neuronal circuit structure and function. Trends Neurosci *36*, 209-217.

Wallenius, V., Wallenius, K., Ahren, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S.L., Ohlsson, C., and Jansson, J.O. (2002). Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. Nat Med *8*, 75-79.

Wang, C., Billington, C.J., Levine, A.S., and Kotz, C.M. (2000). Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. Neuroreport *11*, 3251-3255.

Wang, X., Ge, A., Cheng, M., Guo, F., Zhao, M., Zhou, X., Liu, L., and Yang, N. (2012). Increased hypothalamic inflammation associated with the susceptibility to obesity in rats exposed to high-fat diet. Exp Diabetes Res *2012*, 847246.

Watkins, L.R., Wiertelak, E.P., Goehler, L.E., Mooney-Heiberger, K., Martinez, J., Furness, L., Smith, K.P., and Maier, S.F. (1994). Neurocircuitry of illness-induced hyperalgesia. Brain Res *639*, 283-299.

Weisberg, S.P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. J Clin Invest *116*, 115-124.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest *112*, 1796-1808.

Weissmann, L., Quaresma, P.G., Santos, A.C., de Matos, A.H., Pascoal, V.D., Zanotto, T.M., Castro, G., Guadagnini, D., da Silva, J.M., Velloso, L.A.*, et al.* (2014). IKKepsilon is key to induction of insulin resistance in the hypothalamus, and its inhibition reverses obesity. Diabetes *63*, 3334-3345.

White, G.E., Iqbal, A.J., and Greaves, D.R. (2013). CC chemokine receptors and chronic inflammation--therapeutic opportunities and pharmacological challenges. Pharmacol Rev *65*, 47-89.

Whittle, A.J., Carobbio, S., Martins, L., Slawik, M., Hondares, E., Vazquez, M.J., Morgan, D., Csikasz, R.I., Gallego, R., Rodriguez-Cuenca, S.*, et al.* (2012). BMP8B increases brown adipose tissue thermogenesis through both central and peripheral actions. Cell *149*, 871-885.

Wilhelmsson, U., Bushong, E.A., Price, D.L., Smarr, B.L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M.H., and Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 17513-17518.

Willesen, M.G., Kristensen, P., and Romer, J. (1999). Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. Neuroendocrinology *70*, 306-316.

Willie, J.T., Sinton, C.M., Maratos-Flier, E., and Yanagisawa, M. (2008). Abnormal response of melanin-concentrating hormone deficient mice to fasting: hyperactivity and rapid eye movement sleep suppression. Neuroscience *156*, 819-829.

Wirth, M.M., Olszewski, P.K., Yu, C., Levine, A.S., and Giraudo, S.Q. (2001). Paraventricular hypothalamic alpha-melanocyte-stimulating hormone and MTII reduce feeding without causing aversive effects. Peptides *22*, 129-134.

Wispelwey, B., Lesse, A.J., Hansen, E.J., and Scheld, W.M. (1988). Haemophilus influenzae lipopolysaccharide-induced blood brain barrier permeability during experimental meningitis in the rat. J Clin Invest *82*, 1339-1346.

Wisse, B.E., Ogimoto, K., Tang, J., Harris, M.K., Jr., Raines, E.W., and Schwartz, M.W. (2007). Evidence that lipopolysaccharide-induced anorexia depends upon central, rather than peripheral, inflammatory signals. Endocrinology *148*, 5230-5237.

Wisse, B.E., and Schwartz, M.W. (2009). Does Hypothalamic Inflammation Cause Obesity? Cell Metabolism *10*, 241-242.

Woods, S.C., Lotter, E.C., McKay, L.D., and Porte, D., Jr. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. Nature *282*, 503-505.

Wortley, K.E., Chang, G.Q., Davydova, Z., and Leibowitz, S.F. (2003). Peptides that regulate food intake: orexin gene expression is increased during states of hypertriglyceridemia. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *284*, R1454-1465.

Wortley, K.E., del Rincon, J.P., Murray, J.D., Garcia, K., Iida, K., Thorner, M.O., and Sleeman, M.W. (2005). Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. J Clin Invest *115*, 3573-3578.

Wu, H., Ghosh, S., Perrard, X.D., Feng, L., Garcia, G.E., Perrard, J.L., Sweeney, J.F., Peterson, L.E., Chan, L., Smith, C.W.*, et al.* (2007). T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. Circulation *115*, 1029-1038.

X

Xu, A.W., Kaelin, C.B., Morton, G.J., Ogimoto, K., Stanhope, K., Graham, J., Baskin, D.G., Havel, P., Schwartz, M.W., and Barsh, G.S. (2005a). Effects of hypothalamic neurodegeneration on energy balance. PLoS Biol *3*, e415.

Xu, A.W., Kaelin, C.B., Takeda, K., Akira, S., Schwartz, M.W., and Barsh, G.S. (2005b). PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. J Clin Invest *115*, 951-958.

Xu, B., Goulding, E.H., Zang, K., Cepoi, D., Cone, R.D., Jones, K.R., Tecott, L.H., and Reichardt, L.F. (2003a). Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. Nat Neurosci *6*, 736-742.

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

Y

Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1988). Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. Science *241*, 825-828.

Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M.B., and Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. Nat Med *5*, 1066-1070.

Yeo, G.S., Connie Hung, C.C., Rochford, J., Keogh, J., Gray, J., Sivaramakrishnan, S., O'Rahilly, S., and Farooqi, I.S. (2004). A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. Nat Neurosci *7*, 1187-1189.

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. J Biol Chem *281*, 30299-30304.

Z

Zhang, R., Dhillon, H., Yin, H., Yoshimura, A., Lowell, B.B., Maratos-Flier, E., and Flier, J.S. (2008a). Selective inactivation of Socs3 in SF1 neurons improves glucose homeostasis without affecting body weight. Endocrinology *149*, 5654-5661.

Zhang, X., Zhang, G., Zhang, H., Karin, M., Bai, H., and Cai, D. (2008c). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. Cell *135*, 61-73.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature *372*, 425-432.

Zheng, H., Patterson, L.M., Phifer, C.B., and Berthoud, H.R. (2005). Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol *289*, R247-258.

Zhou, D., Shen, Z., Strack, A.M., Marsh, D.J., and Shearman, L.P. (2005). Enhanced running wheel activity of both Mch1r- and Pmch-deficient mice. Regul Pept *124*, 53-63.

Zhu, Y., Yamanaka, A., Kunii, K., Tsujino, N., Goto, K., and Sakurai, T. (2002). Orexin-mediated feeding behavior involves both leptin-sensitive and -insensitive pathways. Physiol Behav *77*, 251-257.

Zigman, J.M., Nakano, Y., Coppari, R., Balthasar, N., Marcus, J.N., Lee, C.E., Jones, J.E., Deysher, A.E., Waxman, A.R., White, R.D*., et al.* (2005). Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. J Clin Invest *115*, 3564-3572.

Zumbach, M.S., Boehme, M.W., Wahl, P., Stremmel, W., Ziegler, R., and Nawroth, P.P. (1997). Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans. J Clin Endocrinol Metab *82*, 4080-4082.

CC BY NC

Résumé

L'hypothalamus est une aire cérébrale clé dans la régulation de l'homéostasie énergétique qui contrôle notamment la prise alimentaire et les dépenses énergétiques. Pour cela, l'hypothalamus intègre des signaux humoraux, neuraux ainsi que des informations directement données par les différents nutriments. Les neurones et les cellules gliales hypothalamiques agissent de concert pour réguler dans le temps et l'espace les fonctions métaboliques de l'hypothalamus. Aussi il pourrait exister un lien causal entre inflammation hypothalamique et les dérégulations du comportement alimentaire, comme la perte de poids ou l'obésité. Cette neuroinflammation perturberait l'activité cellulaire ainsi que la synthèse et/ou la sécrétion de multiples neurotransmetteurs/médiateurs, dérégulant l'homéostasie énergétique.

Les objectifs de cette thèse portaient sur le rôle de l'inflammation hypothalamique dans le développement d'une perte ou d'un gain de poids excessifs. Nous avons cherché à identifier les relais moléculaires entre l'inflammation centrale ou systémique et les systèmes neuropeptidergiques de l'hypothalamus impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique, en nous concentrant sur les chimiokines.

D'une part, nous avons identifié la chimiokine CCL2 et son récepteur CCR2 comme des éléments de signalisation essentiels dans la perte de poids associée à une inflammation aigue chez la souris induite par l'injection centrale de lipopolysaccharide bactérien. L'activation de CCR2 exercerait des effets inhibiteurs directs sur les neurones hypothalamiques exprimant la MCH, peptide connu pour ses effets orexigènes, qui contribueraient à la perte de poids induite par l'injection de lipopolysaccharide ou de CCL2.

D'autre part, nous nous sommes intéressés à la réponse inflammatoire dans l'hypothalamus suite à une consommation de régimes hyperlipidiques, entraînant, à terme, un gain de poids voire une obésité. Nous avions trois objectifs : 1) identifier une chimiokine pouvant lier inflammation hypothalamique et augmentation de la prise alimentaire et/ou du poids ; 2) déterminer si la nature des lipides contenus dans le régime hyperlipidique peut influencer le développement de l'obésité, et 3) identifier l'impact de la consommation d'un régime hyperlipidique à très court-terme, sur la plasticité gliale dans l'hypothalamus.

Nous avons trouvé, dans des modèles murins d'obésité nutritionnelle, que 1) la chimiokine CCL5 favoriserait la prise de poids, possiblement en augmentant l'activité des neurones hypothalamiques à MCH ; 2) modifier la nature des lipides composant un régime hyperlipidique a un impact sur la cinétique de développement de l'obésité, en lien avec des changements du profil inflammatoire et 3) la consommation excessive de lipides peut induire une astrogliose et une microgliose très précoces dans l'hypothalamus médio-basal. En conclusion, la consommation excessive de lipides, notamment saturés, peut entraîner une inflammation centrale, qui elle-même, pourrait contribuer à l'obésité en activant des réseaux de neuropeptides hypothalamiques.

L'ensemble de nos résultats qui identifient les chimiokines comme cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement des dérégulations du comportement alimentaire, souligne l'intérêt de cibler l'inflammation hypothalamique dans ces pathologies.

Mots-clés : neuroinflammation, perte de poids, obésité, comportement alimentaire, hypothalamus, chimiokines, neuropeptides, régimes hyperlipidiques.