

Université de Montréal

**Impact de l'haploinsuffisance du gène Sim1 sur le développement
et la fonction du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus**

Par

Sabine Michaëlle Duplan

Département de physiologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiæ Doctor (Ph.D)

en Sciences Neurologiques

Décembre 2008

© Sabine Michaëlle Duplan, 2008

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

**Cette thèse intitulée :
Impact de l'haploinsuffisance du gène Sim1 sur le développement
et la fonction du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus**

**Présenté par :
Sabine Michaëlle Duplan**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Laurent Descarries	Président-rapporteur
Dr Jacques L. Michaud	Directeur de recherche
Dre Chéri L. Deal	Membre du jury
Dre Marie-France Langlois	Examineur externe
Dr John F. Kalaska	Représentant de la FES

Thèse acceptée le : août 2009

À...

Dieu, Marie et l'Enfant Jésus, ma foi, ma force et mon courage

Ma famille présente et dans les cieux

Et tous ceux qui croient en moi...

RÉSUMÉ

L'obésité provient d'un déséquilibre de l'homéostasie énergétique, c'est-à-dire une augmentation des apports caloriques et/ou une diminution des dépenses énergétiques. Plusieurs données, autant anatomiques que physiologiques, démontrent que l'hypothalamus est un régulateur critique de l'appétit et des dépenses énergétiques. En particulier, le noyau paraventriculaire (noyau PV) de l'hypothalamus intègre plusieurs signaux provenant du système nerveux central (SNC) et/ou de la périphérie, afin de contrôler l'homéostasie énergétique via des projections axonales sur les neurones pré-ganglionnaires du système autonome situé dans le tronc cérébral et la moelle épinière.

Plusieurs facteurs de transcription, impliqués dans le développement du noyau PV, ont été identifiés. Le facteur de transcription SIM1, qui est produit par virtuellement tous les neurones du noyau PV, est requis pour le développement du noyau PV. En effet, lors d'une étude antérieure, nous avons montré que le noyau PV ne se développe pas chez les souris homozygotes pour un allèle nul de *Sim1*. Ces souris meurent à la naissance, probablement à cause des anomalies du noyau PV. Par contre, les souris hétérozygotes survivent, mais développent une obésité précoce. De façon intéressante, le noyau PV des souris *Sim1*^{+/-} est hypodéveloppé, contenant 24% moins de cellules. Ces données suggèrent fortement que ces anomalies du développement pourraient perturber le fonctionnement du noyau PV et contribuer au développement du phénotype d'obésité.

Dans ce contexte, nous avons entrepris des travaux expérimentaux ayant pour but d'étudier l'impact de l'haploinsuffisance de *Sim1* sur : **1)** le développement du noyau PV et de ses projections neuronales efférentes; **2)** l'homéostasie énergétique; et **3)** les voies neuronales physiologiques contrôlant l'homéostasie énergétique chez les souris *Sim1*^{+/-}.

A cette fin, nous avons utilisé : **1)** des injections stéréotaxiques combinées à des techniques d'immunohistochimie afin de déterminer l'impact de l'haploinsuffisance de *Sim1* sur le développement du noyau PV et de ses projections neuronales efférentes; **2)** le paradigme des apports caloriques pairés, afin de

déterminer l'impact de l'haploinsuffisance de *Sim1* sur l'homéostasie énergétique; et **3)** une approche pharmacologique, c'est-à-dire l'administration intracérébroventriculaire (i.c.v.) et/ou intra-péritonéale (i.p.) de peptides anorexigènes, la mélanotane II (MTII), la leptine et la cholécystokinine (CCK), afin de déterminer l'impact de l'haploinsuffisance de *Sim1* sur les voies neuronales contrôlant l'homéostasie énergétique.

Dans un premier temps, nous avons constaté une diminution de 61% et de 65% de l'expression de l'ARN messager (ARNm) de l'*ocytocine* (*Ot*) et de l'*arginine-vasopressine* (*Vp*), respectivement, chez les embryons *Sim1*^{+/-} de 18.5 jours (E18.5). De plus, le nombre de cellules produisant l'OT et la VP est apparu diminué de 84% et 41%, respectivement, chez les souris *Sim1*^{+/-} adultes. L'analyse du marquage axonal rétrograde des efférences du noyau PV vers le tronc cérébral, en particulier ses projections sur le noyau tractus solitaire (NTS) aussi que le noyau dorsal moteur du nerf vague (X) (DMV), a permis de démontrer une diminution de 74% de ces efférences. Cependant, la composition moléculaire de ces projections neuronales reste inconnue. Nos résultats indiquent que l'haploinsuffisance de *Sim1* : **i)** perturbe spécifiquement le développement des cellules produisant l'OT et la VP; et **ii)** abolit le développement d'une portion importante des projections du noyau PV sur le tronc cérébral, et notamment ses projections sur le NTS et le DMV. Ces observations soulèvent donc la possibilité que ces anomalies du développement du noyau PV contribuent au phénotype d'hyperphagie des souris *Sim1*^{+/-}.

En second lieu, nous avons observé que la croissance pondérale des souris *Sim1*^{+/-} et des souris *Sim1*^{+/+} n'était pas significativement différente lorsque la quantité de calories présentée aux souris *Sim1*^{+/-} était la même que celle consommée par les souris *Sim1*^{+/+}. De plus, l'analyse qualitative et quantitative des tissus adipeux blancs et des tissus adipeux bruns n'a démontré aucune différence significative en ce qui a trait à la taille et à la masse de ces tissus chez les deux groupes. Finalement, au terme de ces expériences, les souris *Sim1*^{+/-}-pairées n'étaient pas différentes des souris *Sim1*^{+/+} en ce qui a trait à leur insulïnémie et leur contenu en triglycérides du foie et des masses adipeuses, alors que tous ces paramètres étaient augmentés chez les souris *Sim1*^{+/-} nourries ad libitum. Ces résultats laissent croire que l'hyperphagie, et non une diminution des dépenses

énergétiques, est la cause principale de l'obésité des souris *Sim1*^{+/-}. Par conséquent, ces résultats suggèrent que : *i)* l'haploinsuffisance de *Sim1* est associée à une augmentation de l'apport calorique sans toutefois moduler les dépenses énergétiques; *ii)* l'existence d'au moins deux voies neuronales issues du noyau PV : l'une qui régule la prise alimentaire et l'autre la thermogénèse; et *iii)* l'haploinsuffisance de *Sim1* affecte spécifiquement la voie neuronale qui régule la prise alimentaire.

En dernier lieu, nous avons montré que l'injection de MTII, de leptine ainsi que de CCK induit une diminution significative de la consommation calorique des souris des deux génotypes, *Sim1*^{+/+} et *Sim1*^{+/-}. De fait, la consommation calorique cumulative des souris *Sim1*^{+/-} et *Sim1*^{+/+} est diminuée de 37% et de 51%, respectivement, durant les 4 heures suivant l'administration i.p. de MTII comparativement à l'administration d'une solution saline. Lors de l'administration i.c.v. de la leptine, la consommation calorique cumulative des souris *Sim1*^{+/-} et *Sim1*^{+/+} est diminuée de 47% et de 32%, respectivement. Finalement, l'injection i.p. de CCK diminue la consommation calorique des souris *Sim1*^{+/-} et *Sim1*^{+/+} de 52% et de 36%, respectivement. L'ensemble des résultats suggère ici que l'haploinsuffisance de *Sim1* diminue l'activité de certaines voies neuronales régulant l'homéostasie énergétique, et particulièrement de celles qui contrôlent la prise alimentaire.

En résumé, ces travaux ont montré que l'haploinsuffisance de *Sim1* affecte plusieurs processus du développement au sein du noyau PV. Ces anomalies du développement peuvent conduire à des dysfonctions de certains processus physiologiques distincts régulés par le noyau PV, et notamment de la prise alimentaire, et contribuer ainsi au phénotype d'obésité.

Les souris hétérozygotes pour le gène *Sim1* représentent donc un modèle animal unique, où l'hyperphagie, et non les dépenses énergétiques, est la principale cause de l'obésité. En conséquence, ces souris pourraient représenter un modèle expérimental intéressant pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires en contrôle de la prise alimentaire.

ABSTRACT

Obesity arises from imbalance of the energy homeostasis processes. Multiple anatomical and physiological evidence demonstrate the involvement of the hypothalamus in the regulation of energy homeostasis, i.e. appetite and energy expenditure. In particular, the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus plays a critical role in these important homeostatic processes. The PVN integrates multiple signals that come from the central nervous system and/or the periphery to control energy homeostasis. It regulates these processes through projections to the dorsal vagal complex (DVC), which includes the dorsal motor nucleus of the vagus (X) (DMV) and the adjacent nucleus of the solitary tract (NST), located in the brainstem.

A cascade of transcription factors involved in the specification of the PVN neurons has been described. One component of this cascade, the bHLH-PAS transcription factor *SIM1*, is required for the development of all neurons of the PVN. Mice homozygous for null alleles of *Sim1* die shortly after birth, presumably because of the lack of PVN. In contrast, *Sim1* heterozygous mice survive but show early-onset obesity. Interestingly, the number of PVN cells is reduced by 24% in *Sim1*^{+/-} mice, suggesting that developmental defects may cause PVN dysfunction and, thus, contribute to the obesity phenotype.

In order to explore this hypothesis, we studied the impact of *Sim1* haploinsufficiency on: **1)** the development of the PVN and its efferent axonal projections; **2)** energy homeostasis; and **3)** neuronal pathways regulating energy homeostasis.

We used: **1)** stereotaxic injections and immunological techniques to determine the impact of *Sim1* haploinsufficiency on PVN, and its efferent axonal projections, development; **2)** the pair-feeding paradigm to determine the impact of *Sim1* haploinsufficiency on energy homeostasis; and **3)** intracerebroventricular (i.c.v.) and intraperitoneal (i.p.) injections of pharmacological agents, melanotan II (MTII), leptin

and cholecystokinin (CCK), to determine the impact of *Sim1* haploinsufficiency on the neuronal pathways regulating energy homeostasis.

First, we noted that the expression of *oxytocin (Ot)* and *argenin-vasopressin (Vp)* mRNA is reduced by 61% and 65%, respectively, in the PVN of *Sim1*^{+/-} E18.5 embryos. Furthermore, the number of OT- and VP-producing cells was found to be decreased by 84% and 41%, respectively, in *Sim1*^{+/-} adult mice. Analysis of the retrograde axonal labelling of PVN neurons after stereotaxic injection of latex beads into the DVC of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice, showed a 74% reduction of PVN neurons projecting to the DVC. However, the molecular composition of the cells affected by a decrease of *Sim1* remains unknown. These results indicate that *Sim1* haploinsufficiency: **i)** specifically interferes with the development of OT- and VP-producing cells; and **ii)** abolishes the development of a subset of parvocellular neurons that project to the DVC. These observations therefore raise the possibility that developmental defects contribute to the obesity phenotype of *Sim1*^{+/-} mice.

Second, we observed that pair-fed *Sim1*^{+/-} mice do not gain more weight than littermate controls from 4 to 16 weeks of age. Moreover, qualitative and quantitative analyses showed significant increases of lean and fat mass, with hyperplasia of white adipose tissue and hypertrophy of brown adipose tissue, in *Sim1*^{+/-} mice, but not in pair-fed animals. Additionally, at 16 weeks of age, insulin levels as well as liver and adipose tissue triglyceride content were not significantly different between *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} pair-fed, but were significantly increased in *Sim1*^{+/-} fed ad libitum. These results suggest that hyperphagia is the main if not the sole contributor to the obesity of *Sim1*^{+/-} mice. They indicate that: **i)** *Sim1* haploinsufficiency affects mainly food intake with no effect on energy expenditure; **ii)** food intake and energy expenditure are regulated by divergent pathways within the PVN; and **iii)** *Sim1* haploinsufficiency specifically affects the feeding pathway without interfering with the thermogenesis pathway.

Third, we found that, in both mice genotype, injection of MTII, leptin or CCK induces a significant decrease in cumulative food intake. In fact, MTII i.p. injection decreases cumulative food intake of *Sim1*^{+/-} and *Sim1*^{+/+} mice by 37% and 51% respectively, when compared to saline injection. Leptin i.c.v. injection reduces

cumulative food intake by 47% and 32% in *Sim1*^{+/-} and *Sim1*^{+/+} mice, respectively. Finally, CCK i.p. injection decreases food intake of *Sim1*^{+/-} and *Sim1*^{+/+} mice by 52% and 36%, respectively. All in all, the results of these latter studies suggest that *Sim1* haploinsufficiency diminishes the activity of neuronal pathways regulating energy homeostasis, in particular of pathways controlling food intake.

In conclusion, our work has shown that *Sim1* haploinsufficiency affects several developmental processes of the PVN. These developmental defects may cause the dysfunction of physiological processes regulated by the PVN, including the control of food intake, and thus contribute to the hyperphagic obesity phenotype.

Sim1 heterozygous mice represent an interesting animal model of obesity in which hyperphagia is the main, if not the sole mechanism of their obesity. These mice could therefore represent a unique opportunity to investigate cellular and molecular mechanisms in control of food intake.

Table des Matières

Page titre	1
Identification du jury	2
Dédicace	3
Résumé	4
Abstract	7
Table des matières	10
Liste des tableaux	15
Liste des figures	16
Abréviations	18
Remerciements	20
PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION GÉNÉRALE	21
INTRODUCTION	22
HOMÉOSTASIE ÉNERGÉTIQUE	23
1. Prise alimentaire	24
1.1. Neuro-anatomie	24
1.1.1 Hypothalamus	24
1.1.1.1 Noyau arqué.....	27
1.1.1.2 Noyau paraventriculaire.....	28
1.1.1.2.1 Glande hypophysaire.....	30
1.1.1.2.2 Système nerveux autonome.....	31
1.1.1.3 Noyau ventromédian.....	32
1.1.1.4 Noyau dorsomédian.....	33
1.1.1.5 Aire hypothalamique latérale.....	33
1.1.2 Tronc cérébral	34
1.1.2.1 Noyau du tractus solitaire.....	37
1.1.2.2 Noyau dorsal moteur du nerf vague (X).....	38
1.1.3 Développement des circuits neuronaux hypothalamiques	39
1.2. Régulation de la prise alimentaire	41
1.2.1 Régulation à court terme	42
1.2.1.1 Voies neuronales.....	42

1.2.1.2	Signaux nerveux.....	43
1.2.1.3	Facteurs humoraux à court terme.....	44
1.2.1.3.1	Cholécystokinine.....	44
1.2.1.3.2	Peptide YY.....	47
1.2.1.3.3	Ghreline.....	51
1.2.2	Régulation à long terme.....	54
1.2.2.1	Voies neuronales.....	54
1.2.2.2	Facteurs humoraux à long terme.....	55
1.2.2.2.1	Insuline.....	56
1.2.2.2.2	Leptine.....	58
1.2.2.2.3	Adiponectine.....	64
1.2.3	Interaction : contrôle à court et à long termes.....	67
1.3.	Systèmes effecteurs de la prise alimentaire et neuromédiateurs.....	70
1.3.1	Système hypothalamique anabolique.....	70
1.3.2	Système hypothalamique catabolique.....	70
1.3.3	Interaction : système anabolique et catabolique.....	71
2.	Dépenses énergétiques.....	73
2.1	Neuro-anatomie de la dépense énergétique.....	75
2.2	Système effecteurs de la dépense énergétique et neuromédiateurs.....	78
2.2.1	Système hypothalamique anabolique.....	79
2.2.2	Système hypothalamique catabolique.....	79
	LES GÈNES SINGLE-MINDED.....	81
1.	Définition générale.....	81
2.	Fonction du gène <i>Sim1</i>	83
2.1	<i>Sim1</i> et le développement.....	83
2.1.1	Développement des noyaux aPV, PV et SO.....	83
2.1.2	Développement des corps mammillaires (CMs).....	84
2.2	<i>Sim1</i> et la régulation de la prise alimentaire.....	85
2.2.1	Les anomalies du développement de l'hypothalamus.....	85
2.2.2	Rôles physiologiques de la protéine SIM1.....	86
3.	Fonctions du gène <i>Sim2</i>	87
3.1	<i>Sim2</i> et le développement.....	87

PROJET.....	88
1. Hypothèse et objectifs.....	88
DEUXIÈME CHAPITRE : PREMIER ARTICLE.....	90
Impact of <i>Sim1</i> gene dosage on the development of the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus.....	91
Abstract.....	92
Introduction.....	93
Materials and Methods.....	96
Mice.....	96
<i>In situ</i> hybridization and immunohistochemistry.....	97
Chronic dehydration.....	99
Retrograde labelling.....	100
Statistics.....	101
Results.....	101
Decrease of vasopressin- and oxytocin-producing cells in the PVN and SON of <i>Sim1</i> ^{+/-} embryos and mice.....	101
Impact of <i>Sim1</i> haploinsufficiency on tolerance to dehydration.....	103
Decrease of PVN cells projecting to the brainstem in <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	106
Discussion.....	107
Gene dosage and hypothalamus development.....	108
<i>Sim1</i> haploinsufficiency and the control of fluid balance.....	109
<i>Sim1</i> haploinsufficiency and the control of food intake.....	111
Conclusion.....	112
Acknowledgements.....	112
Legends.....	114
Reference list.....	118
Figures.....	123
TROISIÈME CHAPITRE: DEUXIÈME ARTICLE.....	130
<i>Sim1</i> haploinsufficiency specifically affects food intake.....	131
Abstract.....	132
Introduction.....	133
Materials and Methods.....	135

Mice.....	135
Pair-feeding.....	135
Meal pattern analysis.....	135
Biochemical and histological analyses.....	136
Microinjection and feeding assays.....	136
Intraperitoneal injection.....	137
Statistics.....	138
Results.....	139
Penetrance of <i>Sim1</i> ⁻ allele on three backgrounds.....	139
Pair-feeding of <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	139
Meal pattern of <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	141
Effect of leptin administration on the food intake of <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	141
Effect of MTH administration on food intake of <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	142
Effect of cholecystokinin administration on the food intake of <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	142
Discussion.....	144
<i>Sim1</i> and the melanocortin pathway.....	144
Meal termination in <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	145
References.....	147
Table.....	151
Legends.....	152
Figures.....	154
QUATRIÈME CHAPITRE: CONCLUSIONS ET DISCUSSION GÉNÉRALES.....	161
1. Haploinsuffisance de <i>Sim1</i> et la structure du noyau PV.....	162
1.1 Développement du noyau PV.....	162
1.2 Développement des voies neuronales efférentes du noyau PV qui régulent la prise alimentaire.....	164
1.2.1 Voie neuronale ocytocinergique.....	164
1.2.1.1 Un problème technique ?.....	165
1.2.1.2 Une différence inter-espèces ?.....	165
2. Haploinsuffisance de <i>Sim1</i> et les fonctions physiologiques du noyau PV : homéostasie énergétique.....	166

2.1 L'haploinsuffisance de <i>Sim1</i> affecte principalement la prise alimentaire.....	166
2.2 Haploinsuffisance de <i>Sim1</i> et les voies neuronales qui régulent la prise alimentaire.....	167
2.2.1 Régulation à court terme	168
2.2.2 Régulation à long terme	170
3. Haploinsuffisance de <i>Sim1</i> et l'hyperphagie.....	173
3.1 Mécanisme développemental : anomalies du développement du noyau PV.....	173
3.2 Mécanisme physiologique : dysfonctions physiologiques de la protéine SIM1	174
Bibliographie générale.....	177
ANNEXE 1 : ARTICLE DE REVISION.....	206
Looking for trouble : A search for developmental defects of the hypothalamus.....	207
Outline.....	208
Abstract.....	209
Introduction.....	210
Patterning of the hypothalamus by extrinsic signals.....	210
Transcriptional control of cell-type specification in the hypothalamus.....	211
Physiological relevance of transcriptional regulators of hypothalamus development.....	214
Establishment of circuitries.....	215
Imprinting and hypothalamic development.....	217
Conclusion.....	219
References.....	220
Legends.....	227
Figures.....	229

Liste des tableaux

TROISIÈME CHAPITRE : DEUXIÈME ARTICLE

Table 1: Plasma insulin and glucose levels in <i>Sim1^{+/+}</i> , <i>Sim1^{+/-}</i> pair-fed and <i>Sim1^{+/-}</i> males.....	151
--	-----

Liste des Figures

PREMIER CHAPITRE : INTRODUCTION

Figure 1: Représentation schématique de l'hypothalamus et de ses noyaux.....	26
Figure 2: Structure et projections axonales efférentes du noyau PV chez le rat.....	29
Figure 3: Structure du complexe dorsal moteur du nerf vague (X) chez le rat adulte.....	36
Figure 4: Représentation schématique des voies neuronales de la régulation, à court et long termes, de la prise alimentaire.....	43
Figure 5: Modèle neuro-anatomique de l'interaction entre les systèmes effecteurs de la prise alimentaire.....	69
Figure 6: Représentation schématique des circuits neuronaux qui relie l'hypothalamus au TAB.....	77

DEUXIÈME CHAPITRE : PREMIER ARTICLE

Figure 1: Decrease of <i>Ot</i> and <i>Avp</i> expression in the PVN and SON of E18.5 <i>Sim1</i> ^{+/-} embryos.....	123
Figure 2: Decrease of OT and AVP production of in the PVN of <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	124
Figure 3: Decrease of OT and AVP production of in the SON of <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	125
Figure 4: Impact of chronic dehydration on food intake, blood osmolality and blood sodium levels in <i>Sim1</i> ^{+/+} mice and <i>Sim1</i> ^{+/-} mice	121
Figure 5: Expression of <i>Ot</i> and <i>Avp</i> in dehydrated <i>Sim1</i> ^{+/+} and <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	124
Figure 6: Retrograde labelling of PVN neurons projecting to the DVC in <i>Sim1</i> ^{+/+} mice and <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	125
Figure 7: Quantification of PVN neurons projecting to the DVC in <i>Sim1</i> ^{+/+} mice and <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	126

TROISIÈME CHAPITRE: DEUXIÈME ARTICLE

Figure 1: The <i>Sim1</i> ⁻ allele is penetrant on three distinct backgrounds.....	151
Figure 2: Pair feeding of <i>Sim1</i> ^{+/-} mice.....	152
Figure 3: Body fat and lean mass of <i>Sim1</i> ^{+/+} , <i>Sim1</i> ^{+/-} -pair-fed and <i>Sim1</i> ^{+/-} mice....	153
Figure 4: Nocturnal and diurnal meal pattern of <i>Sim1</i> ^{+/+} and <i>Sim1</i> ^{+/-} male mice....	154
Figure 5: Intracerebroventricular injection of leptin suppresses cumulative	

food intake and body weight of CD57/129SV *Sim1*^{+/-} and *Sim1*^{+/-} male mice.....155

Figure 6: Intraperitoneal injection of MTII suppresses cumulative food intake of CD1 and C57/129SV *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice.....156

Figure 7: CCK-8 suppresses food intake of C57/129SV *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice.....157

QUATRIÈME CHAPITRE : CONCLUSIONS ET DISCUSSION GÉNÉRALES

Figure 1 : Modèle d'un circuit neuronal et moléculaire régulant la prise alimentaire.....176

ANNEXE 1: ARTICLE DE REVISION

Figure 1: Structural and functional relationship between hypothalamic nuclei.....229

Figure 2: Transcriptional regulation of anterior hypothalamic development.....230

Figure 3: Transcriptional regulation of arcuate nucleus development.....231

Abréviations

AgRP	Agouti (ou agouti-related peptide)
α-MSH	l'hormone de la stimulation du mélanocyte alpha
AP	area postrema
aPV	noyau periventriculaire antérieur
Arc	noyau arqué
ARNm	ARN messenger
BHE	barrière-hémato-encéphalique
CART	cocaine- and amphetamine-related transcript
CCK	cholécystokinine
CM	corps mammillaire
CRH	substance libératrice de la corticotropine
DM	noyau dorsomédian de l'hypothalamus
DMV	noyau dorsal moteur du nerf vague (X)
DVC	complexe dorsal moteur du nerf vague (X)
GH	hormone de croissance
GHS-R	récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance
HL	l'aire hypothalamique latérale
i.c.v.	intra cérébroventriculaire
i.p.	intra péritonéale
IRS-2	substrat-2 du récepteur à l'insuline
IRS-PI3K	insulin receptor substrate phosphoinositol-3 kinase
i.v.	intraveineuse
MAPK	kinase mitogène activée
MBF	medial forebrain bundle
MCH	neurohormone mélanine
MTEG	mammillo-tegmentale
MTII	mélanotan II
MTT	mammillo-thalamique
NPY	neuropeptide Y
NTS	noyau tractus du solitaire
OB-R	récepteur de la leptine
OT	ocytocine

PLC	phospholipase C
POMC	pro-opiomélanocortine
PV	noyau paraventriculaire de l'hypothalamus
PYY	peptide YY
SIM	single-minded
SNA	système nerveux autonome
SNC	système nerveux central
SNS	système nerveux autonome sympathique
SO	noyau supra-optique
SS	somatostatine
TAB	tissu adipeux brun
TRH	substance libératrice de la thyrotropine
UCP1	uncoupling protein 1
VM	noyau ventromédian de l'hypothalamus
VP	arginine-vasopressine
VPR	virus pseudorabies

Remerciements

Merci à....

Dieu, mon guide spirituel

et à....

**Tous ceux et celles qui ont été présent
Et m'ont aidé à cheminer tout au long
De cette étape de ma vie...**

**PREMIER CHAPITRE :
INTRODUCTION GÉNÉRALE**

INTRODUCTION

L'obésité est une maladie chronique caractérisée par un excès pondéral dû à une surcharge du tissu adipeux. De façon générale, l'obésité résulte d'un déséquilibre de l'homéostasie énergétique, c'est-à-dire d'une augmentation des apports caloriques et/ou d'une diminution des dépenses énergétiques.

L'hypothalamus est un régulateur critique de nombreux processus homéostatiques qui sont essentiels pour la survie des vertébrés. En particulier, le noyau paraventriculaire (noyau PV) de l'hypothalamus est un régulateur important de l'homéostasie énergétique, c'est-à-dire de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques. Le noyau PV contrôle l'homéostasie énergétique via ses projections neuronales aux neurones pré-ganglionnaires du système nerveux autonome situés dans le tronc cérébral et la moelle épinière. Plusieurs observations indiquent que des anomalies du développement de l'hypothalamus ont le potentiel de perturber les processus homéostatiques régulés par l'hypothalamus de façon permanente. Par conséquent, les erreurs de développement du noyau PV seraient une cause importante, mais peu explorée, de l'obésité.

Le facteur de transcription SIM1, qui est produit par tous les neurones du noyau PV, est requis pour le développement de ce noyau. De fait, les souris homozygotes pour un allèle nul de *Sim1* meurent à la naissance, probablement à cause des anomalies du noyau PV. Cependant, les souris hétérozygotes survivent, mais développent une obésité précoce. L'haploinsuffisance de *Sim1* cause aussi une obésité sévère chez l'homme. Le mécanisme par lequel l'haploinsuffisance de *Sim1* affecte l'homéostasie énergétique est encore inconnu. Toutefois, nos données —que le noyau PV des souris *Sim1*^{+/-} est hypodéveloppé, contenant 24% moins de cellules— suggèrent que des anomalies du développement du noyau PV pourraient engendrer un déséquilibre de l'homéostasie énergétique.

HOMÉOSTASIE ÉNERGÉTIQUE

L'homéostasie réfère au maintien à leur valeur normale des différentes composantes physiologiques de l'individu telles que la température, le tonus cardiovasculaire, la composition sanguine ainsi que la masse corporelle. Le maintien du poids corporel résulte de l'équilibre entre les apports et les dépenses d'énergie. Cet équilibre est atteint grâce à un système de régulation de l'homéostasie énergétique qui implique tous les aspects métaboliques, autonomiques, endocriniens et non cognitifs de la régulation de l'équilibre énergétique. Ce système de régulation de l'homéostasie énergétique est hautement sophistiqué. Cela explique pourquoi le poids corporel d'un individu demeure relativement stable au cours des ans. Le clonage récent de plusieurs gènes dits «d'obésité» a permis d'une part d'établir les bases d'un système cohérent mais extrêmement complexe de régulation de l'homéostasie énergétique (Bell et al., 2005); et d'autre part de conclure que les deux paramètres du maintien de l'homéostasie énergétique, c'est-à-dire la prise alimentaire et la dépense énergétique, participent de manière équitable à cet équilibre. Par conséquent, contrairement aux idées reçues, l'obésité n'est pas uniquement la conséquence d'une alimentation excessive, mais résulte d'un déséquilibre chronique et à long terme entre l'ingestion de calories et la dépense énergétique.

Brièvement, l'homéostasie énergétique est régulée selon un modèle de rétrocontrôle dans lequel de multiples signaux afférents provenant des réserves d'énergie (tissu adipeux, muscle, foie) et du système gastro-intestinal informent le cerveau sur le statut nutritionnel et métabolique de l'organisme. L'intégration et le traitement des signaux afférents par le système nerveux central (SNC) impliquent la mise en jeu de plusieurs systèmes de neurotransmetteurs. Ces neurotransmetteurs permettent l'adaptation de la prise alimentaire et l'adaptation du métabolisme grâce à la modulation du système nerveux autonome (SNA) et de l'axe hypothalamo-hypophysaires endocriniens. Dans ce schéma intégré de la régulation de l'homéostasie énergétique, l'hypothalamus, le tronc cérébral, la moelle épinière, de même que le nerf vague (X), jouent un rôle essentiel. Chacune de ces régions possède son propre réseau neuronal capable de moduler l'homéostasie énergétique de façon indépendante. Cependant, ces régions sont interconnectées et organisées

en circuits neuronaux hiérarchisés comportant des neurones « capteurs » recevant les signaux énergétiques afférents, des neurones « intégrateurs » réalisant la synthèse des différents signaux et des neurones « effecteurs », qui commandent de manière plus directe la prise alimentaire et la dépense énergétique.

1. Prise alimentaire

1.1 Neuro-anatomie

Les régions du SNC impliquées dans le processus physiologique de la prise alimentaire sont principalement, et non exclusivement, l'hypothalamus, le tronc cérébral et la moelle épinière.

1.1.1 Hypothalamus

L'hypothalamus est une vieille structure cérébrale appartenant au diencephale. L'hypothalamus est situé dorsalement à l'hypophyse et occupe la partie ventrale du diencephale des deux côtés du troisième ventricule (Swanson, 1987; Simerly, 2004).

Un schéma général de l'organisation structurale de l'hypothalamus a été proposé par Crosby et Woodburne dans les années 1940 (Crosby & Woodburne, 1940). Ces auteurs ont décrit l'hypothalamus en trois régions longitudinales: la région périventriculaire, la région médiale et la région latérale, auxquelles des fonctions globales ont été assignées. Par exemple, le rôle d'ensemble de la région périventriculaire est de détecter les signaux en provenance de la circulation sanguine et du liquide céphalorachidien ainsi que d'organiser et de réguler le système endocrinien (Crosby & Woodburne, 1940 ; Berthoud ; 2002). Étant donné la complexité de l'organisation de la zone médiale, LeGros Clark a divisé l'hypothalamus en quatre niveaux antéro-postérieurs : le pré-optique, l'antérieur, le tubéral, et le mammillaire (Le Gros Clark, 1938). En superposant les quatre niveaux de LeGros Clark aux trois régions longitudinales de Crosby et Woodburne, l'hypothalamus est maintenant décrit comme une structure cérébrale ayant douze compartiments contenant plus de quarante noyaux identifiables par histologie, et qui peuvent être à leur tour divisés en sous noyaux (Berthoud, 2002; Simerly, 2004). Malgré la complexité de cette structure cérébrale, des études physiologiques et

génétiqes ont permis d'attribuer certaines fonctions à plusieurs de ces nombreux noyaux.

La position centrale qu'occupe l'hypothalamus, ainsi que ses multiples connexions bilatérales avec plusieurs régions du SNC, font en sorte que l'hypothalamus est impliqué dans plusieurs processus physiologiques importants comme la reproduction, la régulation thermique, le stress, la pression artérielle, les comportements agressifs et défensifs, la défense immunitaire, l'homéostasie énergétique et l'équilibre hydrique (Berthoud, 2002).

Le rôle de l'hypothalamus dans le contrôle de l'appétit a été démontré dans les années 1940-1950 par Hetherington et Ranson (1940), ainsi que Anand et Brobeck (1951). A l'aide de stimulations électro-physiologiques et de lésions électrolytiques de noyaux et sous noyaux spécifiques de l'hypothalamus, ces auteurs ont démontré que des lésions bilatérales de la région hypothalamique ventrobasale, particulièrement des noyaux arcué (Arc), paraventriculaire (PV), ventromédial (VM) et dorsomédial (DM), induisaient une hyperphagie ainsi qu'une obésité chez le rat (Hetherington & Ranson, 1940 ; Gold, 1973 ; Friedman & Stricker, 1976). Par contre, des effets inverses étaient induits, c'est-à-dire une hypophagie et une incapacité à s'abreuver par suite de lésions bilatérales des aires hypothalamiques latérales (HL) (Anand & Brobeck, 1951). Ces travaux ont permis, dans un premier temps, d'établir le concept de la classique théorie des deux centres hypothalamiques : le centre de la satiété et le centre de l'appétit (Stella, 1954). Le centre de la satiété, qui inhibe la prise alimentaire, comprend les noyaux Arc, PV, VM et DM ; le centre de l'appétit, qui stimule la prise alimentaire, est localisé dans l'hypothalamus latéral. Dans un deuxième temps, ces travaux ont permis d'établir les bases neuro-anatomiques, neuro-cellulaires et neuro-moléculaires de l'homéostasie énergétique. (voir figure 1)

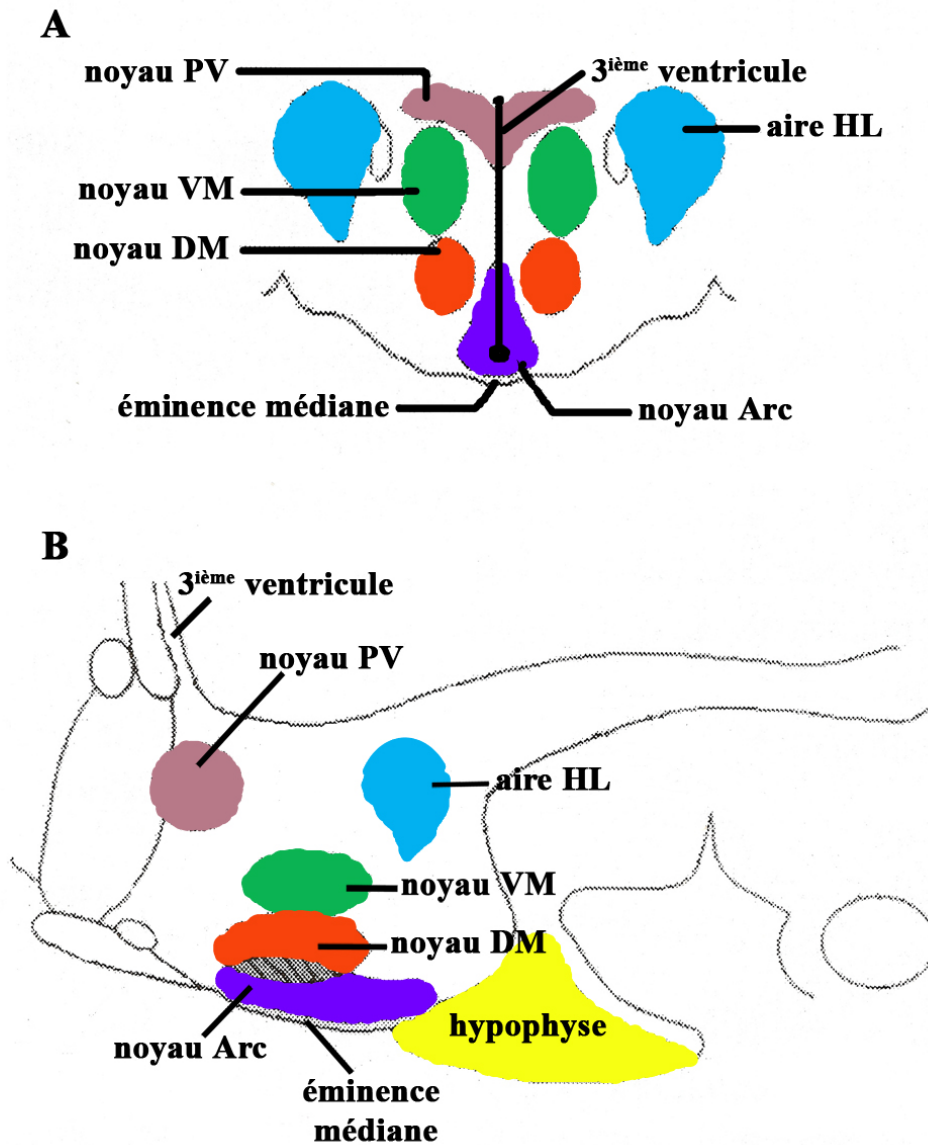


Figure 1 : Représentation schématique de l'hypothalamus et de ses noyaux. Vue coronale (**A**) et sagittale (**B**) de l'hypothalamus du rat adulte. Terminologie des noyaux : *aire HL* aire hypothalamique latérale, *noyau Arc* noyau arqué, *noyau DM* noyau dorsomédial, *noyau PV* noyau paraventriculaire, *noyau VM* noyau ventromédial. Adapté de Williams et al., 2001.

1.1.1.1 Noyau arqué (Arc)

Le noyau arqué, qui occupe presque la moitié de l'hypothalamus, est situé à la base du troisième ventricule juste au dessus de l'éminence médiane (Williams et al., 2001). Cette position du noyau Arc lui permet de former avec l'éminence médiane une région circumventriculaire où la barrière hémato-encéphalique (BHE) est plus perméable, ce qui permet à certaines hormones anorexigènes, telles la leptine et l'insuline, d'avoir accès à cette région hypothalamique (Broadwell & Brightman, 1976; Williams et al., 2001).

Le noyau Arc est divisé en deux régions cyto-architecturales distinctes : la région dorsolatérale et la région ventromédiale (Williams et al., 2001; Simerly, 2004). La région dorsolatérale contient des cellules de taille moyenne, qui co-synthétisent les neuropeptides anorexigènes pro-opiomélanocortine (POMC) et cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART). La région ventromédiale est composée de petites cellules qui co-synthétisent les neuropeptides orexigènes neuropeptide Y (NPY) et peptide Agouti (AgRP) (Williams et al., 2001; Berthoud, 2002).

Les projections hypothalamiques du noyau Arc sont abondantes, bidirectionnelles et surtout concentrées à la région périventriculaire de l'hypothalamus. Les plus denses atteignent et proviennent principalement des noyaux PV, DM et HL, tous impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Williams et al., 2001; Berthoud, 2002; Simerly, 2004).

Les projections extra-hypothalamiques du noyau Arc sont dispersées, bidirectionnelles, directes et/ou indirectes. S'agissant de la régulation de la prise alimentaire, le noyau Arc émet et reçoit des projections axonales du tronc cérébral principalement au noyau tractus du solitaire (NTS) (Elmqvist et al., 1998; Berthoud, 2002).

1.1.1.2 Noyau paraventriculaire (PV)

Le noyau paraventriculaire est considéré comme un microcosme dans l'hypothalamus, en ce sens que ses différents groupes de neurones sont impliqués dans plusieurs fonctions neuro-endocrines et autonomiques. Le noyau PV est facilement identifiable en histologie, car il forme une structure triangulaire de chaque côté du troisième ventricule. Chez le rat, à la suite d'études de cytologie architecturale et de connectivité, Swanson et Kuypers (1980) ont divisé le noyau PV en huit groupes cellulaires (Swanson & Kuypers, 1980). Trois de ces groupes sont composés principalement, mais pas exclusivement, de neurones magnocellulaires dont les corps cellulaires mesurent entre 20 et 35 μm de diamètre. Les cinq autres groupes sont composés principalement de neurones parvocellulaires, dont le diamètre des corps cellulaires mesure entre 12 et 26 μm (Swanson & Kuypers, 1980 ; Sofroniew & Schrell, 1981). Les neurones magnocellulaires se projettent essentiellement sur l'hypophyse postérieure alors que les neurones parvocellulaires se projettent ou bien à l'éminence médiane ou bien sur les neurones pré-ganglionnaires autonomiques du tronc cérébral et de la moelle épinière (Swanson & Kuypers, 1980 ; Swanson et al., 1980). (voir figure 2)

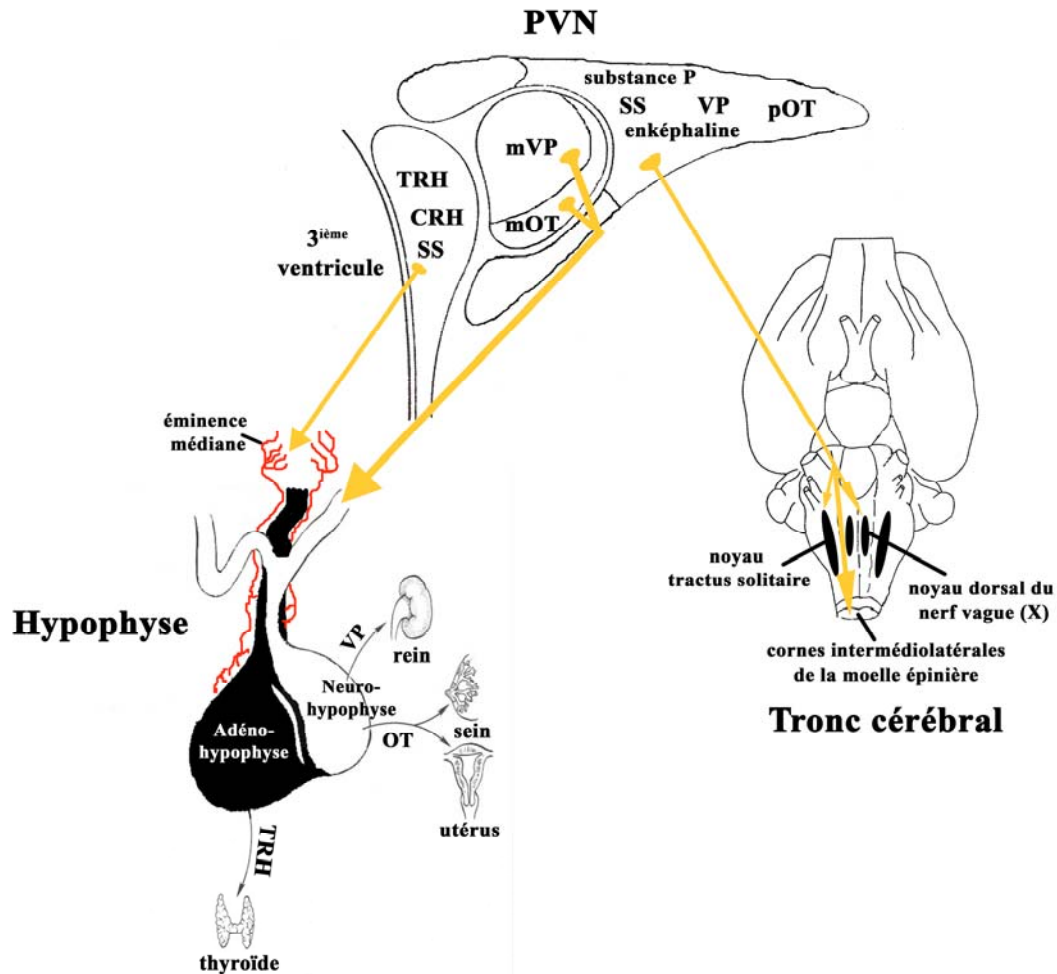


Figure 2 : Structure et projections axonales efférentes du noyau PV chez le rat. Les neurones magnocellulaires se projettent sur la neuro-hypophyse, tandis qu'une population de neurones parvocellulaires se projette à l'éminence médiane. Une autre population de neurones parvocellulaires se projette sur le tronc cérébral, particulièrement sur les noyaux du tractus solitaire, dorsal du nerf vague (X) et les cornes intermédiolatérales de la moelle épinière. *CRH*, substance libératrice de la corticotropine; *mOT*, neurones magnocellulaires ocytocinergiques; *mVP*, neurones magnocellulaires arginine-vasopressinergiques; *pOT*, neurones parvocellulaires ocytocinergiques; *OT*, ocytocine; *SS*, somatostatine; *TRH*, substance libératrice de la thyrotropine; *VP*, arginine-vasopressine. Adapté de : Swanson & Sawchenko, 1983.

1.1.1.2.1 Glande hypophysaire

Le noyau PV module le système neuro-endocrinien via ses projections sur l'hypophyse. L'hypophyse est située ventralement au cerveau, à la jonction méso-dencéphalique. Cette glande endocrinienne est formée de deux parties : une partie neurale, le neurohypophyse ; et une partie glandulaire, l'adénohypophyse (Armstrong, 2004).

Neurohypophyse/l'hypophyse postérieure :

Les neurones magnocellulaires se projettent directement sur l'hypophyse postérieure, formant ainsi le système hypothalamo-neurohypophysaire (Swanson & Kuyper, 1980 ; Swanson, 1987). Ces neurones synthétisent les neurohormones arginine-vasopressine (VP) et ocytocine (OT) (Swanson, 1987). L'expression de la VP et de l'OT est mutuellement exclusive, définissant deux groupes distincts de neurones magnocellulaires (Swaab et al., 1975 ; Vandesande & Dierickx, 1975). Toutefois, il a été démontré qu'un sous-groupe des neurones ocytocinergiques magnocellulaires exprime aussi la neurohormone de la substance libératrice de la corticotropine (CRH) (Sawchenko et al., 1984). Toutes ces neurohormones sont directement sécrétées dans la circulation sanguine et sont par la suite acheminés vers leurs organes cibles où elles interagissent avec leurs récepteurs respectifs et régulent divers processus physiologiques tels que : la lactation, la contraction utérine, les nausées, les distensions gastriques, l'équilibre hydrique ainsi que la pression artérielle (Swanson, 1987).

Adénohypophyse/hypophyse antérieure :

Un sous groupe de neurones parvocellulaires se projette vers la couche externe de l'éminence médiane. L'éminence médiane contient un fin plexus capillaire, le système porte, autour duquel s'enroulent les axones des neurones parvocellulaires. Ces neurones synthétisent et sécrètent dans le système porte plusieurs neurohormones incluant la substance libératrice de la thyrotropine (TRH), la CRH et la somatostatine (SS), qui sont par la suite acheminés vers l'hypophyse antérieure. La fonction principale de ces neurohormones est de moduler la sécrétion de certaines hormones hypophysaires, comme la corticotropine et la thyrothropine (Swanson & Sawchenko, 1980; Swanson, 1987 ; Armstrong, 2004).

1.1.1.2.2 Système nerveux autonome

Le noyau PV module le SNA parasympathique et sympathique via ses projections sur les neurones pré-ganglionnaires du tronc cérébral et de la moelle épinière. Plusieurs études utilisant des techniques de marquage rétrograde ont démontré que ces projections du noyau PV au tronc cérébral et à la moelle épinière sont soit des projections directes, au sens où différentes populations parvocellulaires se projettent directement sur les neurones pré-ganglionnaires du tronc cérébral et les neurones pré-ganglionnaires de la moelle épinière ; soit des projections collatérales, au sens où une même population de neurones parvocellulaires se projette via des collatérales sur les deux régions (Swanson & Sawchenko, 1980).

C'est principalement par ces projections neuronales que le noyau PV régule la prise alimentaire.

Tronc cérébral :

Une sous-population de neurones parvocellulaires se projette sur le tronc cérébral caudal, et plus particulièrement sur le NTS, le noyau dorsal moteur du nerf vague (X) (DMV), et l'area postrema (AP), un organe circumventriculaire (Swanson & Sawchenko, 1980 ; Swanson, 1987). Ces noyaux sont bien connus pour leur implication dans la régulation de la prise alimentaire.

S'agissant de la régulation de la prise alimentaire, Sawchenko et Swanson (1982) ainsi que Voorn et Buijs (1983) ont combiné les techniques d'hybridation in situ, d'immunohistologie et de traceurs rétrogrades, pour démontrer que les neurones parvocellulaires du noyau PV, qui se projettent sur le tronc cérébral, contiennent une grande variété de neurohormones et de neuropeptides, incluant l'OT, la VP, la SS, l'enképhaline et la substance P (Sawchenko & Swanson, 1982 ; Voorn & Buijs, 1983). Ces auteurs ont aussi constaté que les projections neuronales ocytocinergiques étaient fortement majoritaires, dépassant, par exemple, les projections vasopressinergiques par un ratio de 4 pour 1 (Sofroniew & Schrell, 1981 ; Sawchenko & Swanson, 1982 ; Voorn & Buijs, 1983). Ces résultats ont été corroborés par Rinaman (1998), dont une étude du développement post-natal de la maturation des projections ocytocinergiques du noyau PV a montré que les afférentes ocytocinergiques du NTS et du DMV, chez le rat adulte, proviennent

exclusivement des neurones parvocellulaires ocytocinergiques du noyau PV. De plus ces projections se terminent dans la région médiale du NTS plus précisément dans les sous-noyaux commissural, gelatinosus et médial, ainsi que dans les régions latérales du DMV (Rinaman, 1998). Ces noyaux sont spécifiquement impliqués dans la réception et l'intégration d'informations sensorielles et motrices en rapport avec les systèmes gastrique, intestinal et hépatique.

Moelle épinière :

Une sous-population de neurones parvocellulaires se projette sur les cornes intermédiolatérales de la moelle épinière (Swanson et al., 1980; Swanson & Kuyper, 1980 ; Sawchenko & Swanson, 1982). Ces efférences terminent principalement dans le segment thoracolombaire de la corne intermédiolatérale où sont situés les neurones moteurs pré-ganglionnaires de l'innervation sympathiques de l'estomac, le foie, les intestins et le pancréas (Sawchenko & Swanson, 1982 ; Swanson, 1987 ; la Fleur et al., 2000 ; Buijs et al., 2001).

Tout comme les projections du noyau PV sur le tronc cérébral, ses projections à la moelle épinière contiennent une grande variété de neurohormones et de neuropeptides dont la dynorphine, l'enképhaline, l'OT et la VP, parmi lesquelles la VP et l'OT sont prédominantes. Il a été clairement démontré que ces afférences viscérales ocytocinergiques et vasopressinergiques proviennent exclusivement du noyau PV (Hallbeck & Blomqvist, 1999 ; Hallbeck et al., 2001).

1.1.1.3 Noyau ventromédian (VM)

Le noyau ventromédian est l'un des plus gros noyaux de l'hypothalamus (Williams et al., 2001; Simerly, 2004). Il se divise en deux parties : une partie dorsomédiane et une partie ventromédiane, dont les projections efférentes semblent différentes (Saper et al., 1976; Swanson, 1987; Simerly, 2004), une hypothèse qui reste à confirmer.

Le noyau VM est connecté de façon bidirectionnelle aux noyaux PV et DM, à l'aire HL, ainsi qu'à divers noyaux du tronc cérébral, incluant le NTS et le DMV (Swanson, 1987 ; Williams et al., 2001 ; Simerly, 2004). Il a été démontré que les

afférences du noyau DM sont les plus denses et se terminent principalement dans la région dorsomédiane de ce noyau (Swanson, 1987).

1.1.1.4 Noyau dorsomédial (DM)

Le noyau dorsomédian est situé immédiatement au dessus du noyau VM. Tout comme le noyau VM, l'implication du noyau DM dans la régulation des processus d'ingestion provient de l'observation que ce noyau possède plusieurs connexions réciproques, directes et/ou indirectes, avec d'autres régions impliquées dans la régulation de la prise alimentaire (Simerly, 2004). En effet, le noyau DM reçoit de multiples afférences du tronc cérébral, particulièrement du NTS, en plus d'en recevoir d'autres en provenance de plusieurs noyaux hypothalamiques comme le noyau PV, le VM et l'aire HL (Swanson, 1987 ; Williams et al., 2001, Saper, 2004 ; Simerly, 2004).

Il a été démontré que le noyau DM se projette de façon réciproque sur ces différentes régions du SNC. Cependant, ce sont les régions parvocellulaires du noyau PV qui reçoivent la plus dense innervation (Simerly, 2004). Il est aussi connu que les projections du noyau DM sur le tronc cérébral se terminent de façon dispersée dans le NTS, le DMV, ainsi que dans diverses régions non identifiées de la moelle épinière (Swanson, 1987). Finalement, en rapport avec la régulation de la prise alimentaire, il faut souligner que Köhler et ses collègues (1984) ont démontré, à l'aide d'injections de marqueurs rétrogrades dans la moelle épinière, que ces afférences contiennent aussi l'hormone de stimulation du mélanocyte alpha (α -MSH) (Köhler et al., 1984). Ce peptide est un neuromédiateur catabolique important, impliqué dans l'une des voies neuronales les mieux caractérisées de la régulation de la prise alimentaire, la voie neuronale de la mélanocortine.

1.1.1.5 Aire hypothalamique latérale (HL)

L'aire hypothalamique latérale est une région vaguement définie et hétérogène composée de plusieurs noyaux distincts (Berthoud, 2002). Même si cette région est connue comme le centre de la faim, l'identification de ses afférences et efférences est difficile. La raison principale de cette difficulté est le fait que l'aire HL est traversée par le faisceau prosencéphalique median (MFB) (Berthoud, 2002 ;

Simerly, 2004). Le MFB contient des axones en provenance de nombreux noyaux cellulaires différents. De ce fait, les résultats d'études utilisant des traceurs rétrogrades, sont difficiles à interpréter, en raison du marquage possible d'axones « en passage » (Veening et al., 1982 ; Simerly, 2004).

Cependant, des études utilisant des traceurs antérogrades laissent croire que l'aire HL a un vaste territoire de projections efférentes. En effet, l'aire HL se projette sur le cortex cérébral, l'hippocampe, l'amygdale, les ganglions de la base, le thalamus, la région médiale et periventriculaire de l'hypothalamus, plusieurs noyaux du tronc cérébral et à la moelle épinière (Berthoud, 2002). En rapport avec la régulation de la prise alimentaire, Elias et ses collègues (1999) ont démontré qu'en provenance de l'hypothalamus lui-même, l'aire HL reçoit très peu d'afférences des noyaux PV, DM et VM, mais reçoit une forte densité d'afférences du noyau Arc (Elias et al., 1999). De plus, il a été démontré que les connexions entre l'aire HL et le tronc cérébral sont réciproques (Berthoud, 2002 ; Simerly, 2004).

L'aire HL est composée d'au moins deux populations de neurones (Williams et al., 2001 ; Berthoud, 2002 ; Saper, 2004) dont une qui se projette sur de nombreuses régions du SNC et contient la neurohormone mélanine (MCH). Cette neurohormone joue vraisemblablement un rôle physiologique important dans la régulation de la prise alimentaire. En effet, chez la souris, l'invalidation de ce gène, ou du gène d'une des isoformes de ses récepteurs, provoque une hypophagie et un certain degré de maigreur (Shimada et al., 1998 ; Marsh et al., 2002). De façon opposée, une surexpression de ce neuropeptide provoque une obésité (Ludwig et al., 2001). L'autre population de neurones co-exprime les neuropeptides orexine-A et la dynorphine. Cette population se projette particulièrement sur le tronc cérébral et la moelle épinière (Williams et al., 2001 ; Berthoud, 2002 ; Saper, 2004).

1.1.2 Tronc cérébral

Comme pour l'hypothalamus, des régions spécifiques localisées dans le tronc cérébral au niveau de l'AP sont connues pour leur implication dans le contrôle de la prise alimentaire. Ces régions sont : le NTS et le DMV. Ces régions sont

communément appelées le complexe dorsal moteur du nerf vague (X) (DVC). (voir figure 3)

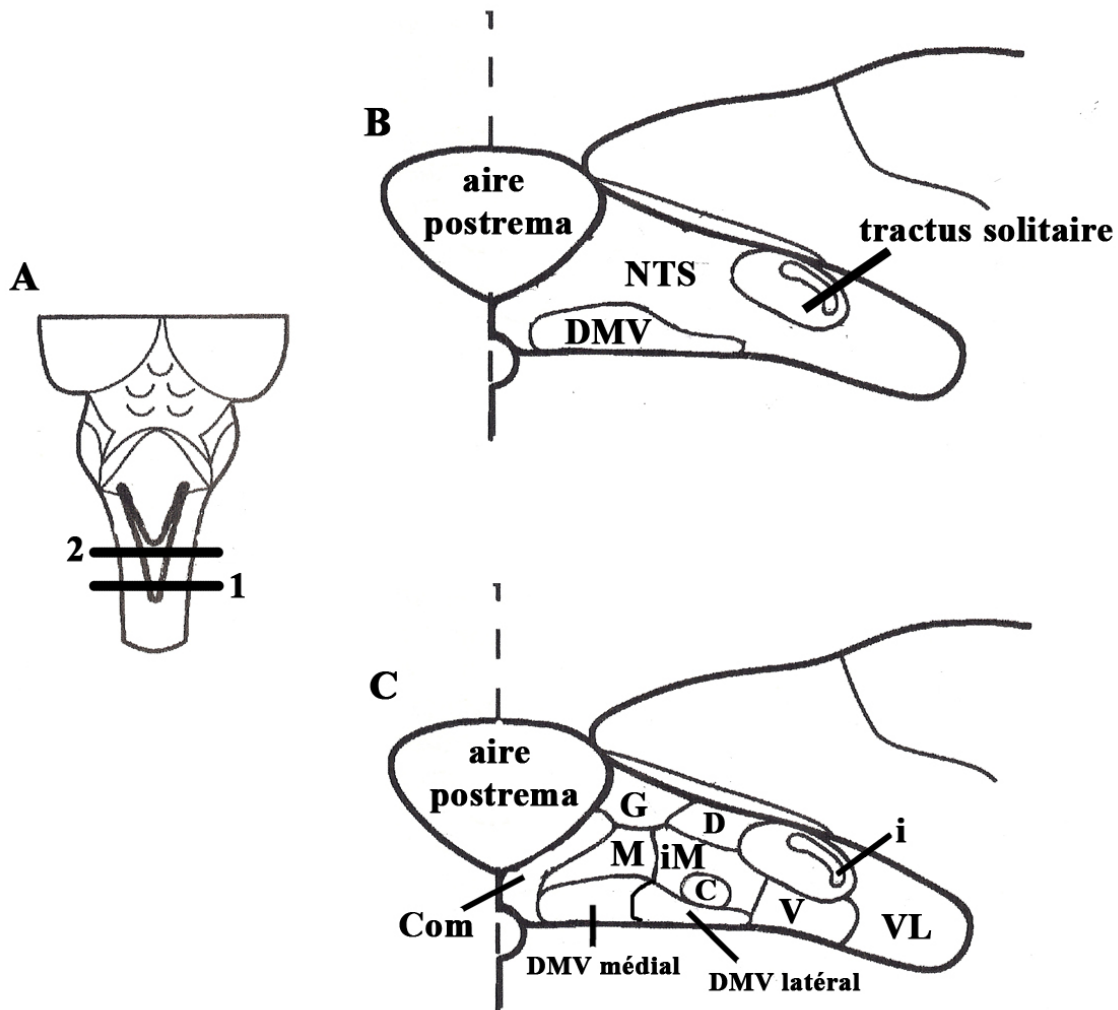


Figure 3 : Structure du complexe dorsal moteur du nerf vague (X) (DVC) chez le rat adulte. (A) Vue dorsale du tronc cérébral dont le cervelet a été enlevé. Les lignes 1 et 2 indiquent la région du DVC située à la hauteur de l'area postrema. (B) Vue coronale du DVC. Le DVC est composé de deux noyaux : le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau dorsal moteur du nerf vague (X) (DMV). (C) Vue coronale des sous-noyaux du NTS et du DMV. Terminologie des sous-noyaux : C, sous noyau central; Com sous noyau commissural; D, sous noyau dorsal; G, sous noyau gelatinosus; i, sous noyau interstitiel; iM, sous noyau intermédiaire; M, sous noyau médial; V, sous noyau ventral; VL, sous noyau ventrolatéral; DMV latéral, sous noyau latéral du nerf dorsal moteur du nerf vague (X); DMV médial, sous noyau médial du nerf dorsal moteur du nerf vague (X). Adapté de Zhang & Ashwell, 2001b.

1.1.2.1 Noyau du tractus solitaire (NTS)

Le noyau du tractus solitaire est l'un des plus importants noyaux sensoriels du SNC, qui reçoit les afférences des nerfs crâniens V, VII, IX et X, du tronc cérébral, ainsi que du télencéphale (Swanson 1987 ; Zhang & Ashwell, 2001a ; Saper, 2004). Le NTS est non seulement un centre de relais, mais aussi un centre intégrateur pour plusieurs fonctions autonomiques, tel que : la respiration, la régulation cardiovasculaire et la régulation de la prise alimentaire. Le NTS est situé dans la partie dorsale du bulbe rachidien (medulla oblongata) et divisé en neuf sous-noyaux : le sous-noyau commissural (Com), le sous-noyau gelatinosus (G), le sous-noyau médial (M), le sous-noyau ventrolatéral (VL), le sous noyau-ventral (V), le sous-noyau dorsal (D), le sous noyau-intermédiaire (iM), le sous-noyau interstitiel (i) et le sous-noyau central (C), qui sont disposés en colonnes longitudinales le long de l'axe rostrocaudal (Sawchenko, 1983 ; Zhang & Ashwell, 2001b). Un schéma de la cytoarchitecture du NTS, chez le rat, est présenté dans la figure 3. Certaines fonctions ont été attribuées à certains de ces sous-noyaux (Zhang & Ashwell, 2001b). Par exemple, pour ce qui est de la régulation de la prise alimentaire, il a été démontré que les afférences sensorielles du nerf vague (X), localisées dans les viscères gastriques, se terminent principalement dans la division médiale du NTS, c'est-à-dire dans les sous-noyaux Com, G, M, iM, i et C (Altschuler et al., 1992). Il a aussi été démontré que les sous-noyaux D, Com et M transmettent des informations sensorielles en lien avec le processus de digestion. Par exemple, la distension répétitive de l'estomac et/ou des intestins, induite expérimentalement à des vitesses et des volumes qui imitent les mouvements physiologiques naturels de l'appareil digestif lors de l'ingestion d'aliments, activent l'expression du gène *c-fos*, un marqueur précoce de l'activation neuronale, dans les sous-noyaux Com et M (Zhang & Ashwell, 2001b).

En plus de recevoir les afférences sensorielles du nerf vague (X), le NTS reçoit aussi des projections afférentes directes de plusieurs noyaux hypothalamiques, incluant les noyaux Arc, PV, DM, VM et de l'aire HL. Ces connexions entre l'hypothalamus et le NTS sont bidirectionnelles (Palkovits et al., 1980 ; Sawchenko, 1983 ; Saper, 2004). Il a été proposé que ces projections neuronales modulent la sensibilité des neurones du tronc cérébral aux facteurs

humoraux impliqués dans la régulation à long terme de la prise alimentaire (Rinaman, 2006). L'une de ces projections les mieux connues pour son rôle dans la régulation de la prise alimentaire est la voie afférente PVN-NTS.

Il faut aussi savoir que les neurones du NTS se projettent sur le DMV et l'AP, pour former un circuit local réflexe qui régule la prise alimentaire à court terme (Sawchenko, 1983 ; Berthoud, 2002 ; Saper, 2004).

1.1.2.2 Noyau dorsal moteur du nerf vague (X) (DMV)

Le noyau dorsal moteur du nerf vague (X), situé ventralement au NTS dans le tronc cérébral, est le principal noyau moteur du nerf vague (X). Le DMV contient les neurones moteurs pré-ganglionnaires parasympathiques qui innervent les neurones post-ganglionnaires abdominaux associés à l'estomac, l'intestin grêle, le colon, le pancréas et le foie (Altschuler et al., 1992; Rinaman & Levitt, 1993). Le DMV est composé de cinq colonnes longitudinales, qui correspondent aux cinq branches sous diaphragmatiques du nerf vague (X), c'est-à-dire la branche droite du nerf gastrique, la branche gauche du nerf gastrique, la branche coeliaque, la branche accessoire du coeliaque et la branche hépatique. Les deux colonnes longitudinales situées près de la ligne médiane forment le noyau DMV médial et correspondent aux efférences gastriques du nerf vague (X). Les deux colonnes longitudinales éloignées de la ligne médiane forment le DMV latéral et correspondent aux branches sous diaphragmatiques coeliaque et accessoire coeliaque du nerf vague. Finalement, la cinquième colonne longitudinale correspond à la branche sous diaphragmatique hépatique (Fox & Powley, 1985 ; Norgren & Smith, 1988 ; Altschuler et al., 1991).

A l'instar du NTS, les colonnes du DMV présentent une organisation viscérotopique (Altschuler et al., 1991 ; Rinaman & Levitt, 1993). En effet, le DMV a une organisation médiolatérale qui correspond à la position rostrocaudale des viscères du système digestif. Par exemple, l'estomac et le duodénum sont représentés dans le noyau DMV médial ; tandis que le jéjunum, l'iléum et le colon ascendant sont représentés dans le noyau DMV latéral (Altschuler et al., 1991 ; Rinaman & Levitt, 1993).

Au sujet de la régulation de la prise alimentaire, il a été démontré que les dendrites des neurones moteurs du DMV s'étendent dans des régions spécifiques du NTS, tel que les sous-noyaux G, Com et M. Ces sous-noyaux sont des sites primaires de terminaison des afférentes sensorielles du système digestif (Shapiro & Misselis, 1985 ; Rinaman et al., 1989 ; Altschuler et al., 1992). Ce contact direct entre ces axones afférents sensoriels et les dendrites des neurones moteurs suggère que le système sensoriel module l'activité des neurones moteurs.

1.1.3 Développement des circuits neuronaux hypothalamiques

Même si des études combinant marquage antérograde et rétrograde à des techniques d'immunologie ont permis de localiser et de caractériser les circuits neuronaux entre l'hypothalamus, le tronc cérébral et les viscères abdominaux impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, très peu de données expérimentales concernent les facteurs impliqués dans le développement et la mise en place de ces circuits.

Toutefois, au cours de la dernière décennie, l'importance de la leptine dans le développement et la mise en place de certains de ces circuits a été reconnue. En effet, Bourret et ses collègues (2004) ont démontré que certains circuits hypothalamiques, plus précisément les projections axonales du noyau Arc sur les noyaux PV, DM et l'aire HL, se développent durant les deux premières semaines de vie chez le rongeur et que la leptine est requise comme signal trophique pour stimuler la croissance des axones des neurones du noyau Arc vers ces autres noyaux hypothalamiques (Bourret et al., 2004a). De fait, la densité des axones du noyau Arc se projetant sur les noyaux PV, DM et l'aire HL est diminuée chez les souris déficientes en leptine (souris *ob/ob*) au cours des deux premières semaines de vie et le reste chez l'adulte. Toutefois, l'injection de leptine durant ces deux premières semaines de vie, mais pas chez la souris adulte, augmente le nombre de projections efférentes du noyau Arc chez les souris *ob/ob* et diminue la prise alimentaire à long terme (Bourret et al., 2004a ; 2004b). Ces données suggèrent que l'obésité associée à une déficience en leptine pourrait impliquer une composante développementale.

Cette hypothèse est corroborée par le fait que les rats et les souris dont la mère a reçu une diète hypocalorique durant la gestation sont à haut risque de développer de l'obésité lorsque confrontés ultérieurement à une diète riche en gras, comme si la malnutrition maternelle programmait l'animal à vivre dans la disette (Lucas, 1998). Toutefois, différents protocoles expérimentaux d'injection de leptine durant les deux premières semaines de vie peuvent corriger l'effet de cette programmation fœtale sur la régulation de l'équilibre énergétique (Vickers et al., 2005 ; Yura et al., 2005). Ces observations renforcent l'idée que le taux de leptine durant cette phase du développement représente un déterminant essentiel du devenir énergétique de l'animal. Cependant, si ses données suggèrent que la leptine agit dans l'hypothalamus pour reprogrammer les animaux dont les mères ont consommé une diète hypocalorique, aucune donnée n'existe à savoir si cet effet met en jeu l'action de la leptine sur la croissance des axones du noyau Arc.

D'autres données récentes suggèrent que le développement des projections axonales bidirectionnelles entre le noyau PV et les noyaux NTS et le DMV, et notamment celui des efférences parvocellulaires ocytocinergiques du noyau PV et des afférences catécholaminergiques du noyau PV, est aussi stimulé par la leptine durant cette même période de vie. Plusieurs observations chez les rongeurs supportent cette hypothèse. Tout d'abord, l'ARN messager (ARNm) de même que le récepteur de la leptine, sont exprimés dans les noyaux PV, NTS et DMV. En second lieu, tout comme les axones efférents du noyau Arc, les projections axonales entre le noyau PV et le NTS et DMV se développent durant la période embryonnaire, sont établies à la naissance et continuent de croître durant les deux et trois premières semaines de vie (Rinaman 1998; 2001). De façon intéressante, il a été démontré que les projections ocytocinergiques médient, en partie, l'effet de la leptine sur la prise alimentaire (Blevins et al., 2004). De plus, Rinaman et ses collègues (2005) ont démontré que ces mêmes projections axonales sont requises pour que se manifeste l'effet anorexigène de la déshydratation (Rinaman et al., 2005). Tout comme l'absence d'effet anorexigène observé chez les souris *ob/ob* par suite de l'administration de leptine durant les deux premières semaines de vie, la réponse anorexigène par suite d'une déshydratation n'est observée qu'après cette période, possiblement à cause de l'immaturation des projections en question (Rinaman et al., 2005).

1.2 Régulation de la prise alimentaire

La régulation de la prise alimentaire est associée à deux systèmes de contrôle : le contrôle à court terme et le contrôle à long terme. Ce concept de double contrôle a été proposé par Gerard Smith (1996), par suite de l'analyse des travaux de Grill et Norgren (1978) sur le comportement alimentaire des rats décérébrés. Ces derniers ont constaté que même si le rat décérébré, avec une transection complète entre le tronc cérébral et le télencéphale, est capable de s'alimenter lorsqu'on place de la nourriture dans sa bouche et/ou dans son système digestif, il est incapable d'ajuster la quantité de ce qu'il consomme après un jeûne de 24 heures (Grill & Norgren, 1978a ; 1978b). En effet, l'animal décérébré répond de manière adéquate aux signaux de satiété mais est incapable d'ajuster la taille de son repas en fonction de ses réserves énergétiques. Par conséquent, en 1996, Gerard Smith suggéra une théorie : « The theory of Direct and Indirect control of meal size » (Smith, 1996; 2000a). Cette théorie postule que le tronc cérébral caudal reçoit des signaux directs et/ou de court terme --provenant des systèmes gastrique, intestinal et hépatique-- qui informent du statut alimentaire immédiat de l'individu; et que l'hypothalamus reçoit des signaux indirects et/ou à long terme --provenant principalement des réserves adipeuses-- qui informent du statut des réserves énergétiques adipeuses de l'organisme. Par conséquent, les circuits neuronaux situés dans le tronc cérébral ont la capacité de réguler, de manière indépendante, les mécanismes primaires de la faim et de la satiété, c'est-à-dire le début et la fin d'un repas, tandis que les circuits neuronaux de l'hypothalamus intègrent et interprètent les signaux adipeux pour maintenir la stabilité des réserves énergétiques de l'organisme. Ce modèle déduit aussi l'existence d'une interaction entre le contrôle à court et long terme, afin de générer une réponse alimentaire permettant le maintien de la stabilité pondérale. Les circuits neuronaux hypothalamiques, qui sont sensibles aux signaux adipeux, ont la capacité de moduler l'activité des circuits neuronaux du tronc cérébral, lesquels induisent les phénomènes de rassasiement et de satiété (Smith, 1996 ; 2000a). De ce fait, à cette double régulation de court et de long termes correspondent manifestement des signaux afférents humoraux distincts, qui donnent un bilan complet du statut alimentaire et énergétique de l'organisme; et des circuits neuronaux distincts, qui, cependant, agissent de concert afin d'assurer l'homéostasie énergétique (Harold, 2004 ; Anubhuti, 2006 ; Dhillon, 2007).

1.2.1 Système de contrôle à court terme

Le contrôle de la prise alimentaire à court terme est associé au statut nutritionnel immédiat de l'organisme. Par conséquent, cette régulation détermine le début et la fin d'un repas, c'est-à-dire la taille du repas. La régulation de la prise alimentaire à court terme se manifeste par des prises alimentaires discontinues au cours d'une journée. Celles-ci résultent théoriquement de la succession de la sensation de faim, qui conduit à rechercher les aliments et à les consommer, du processus de rassasiement, qui provoque l'interruption de la prise d'aliments, puis de l'état de satiété, qui explique l'absence de prise alimentaire dans les intervalles interprandiaux. L'homéostasie énergétique n'est apparemment pas contrôlée très strictement à court terme puisqu'il existe, chez tout individu, une grande variabilité de prise alimentaire et de dépense énergétique d'une journée à l'autre.

Des circuits neuronaux, ainsi que des signaux afférents nerveux et des facteurs humoraux, sont associés au système de contrôle de la prise alimentaire à court terme.

1.2.1.1 Voies neuronales

Le circuit neuronal du contrôle à court terme comprend principalement deux noyaux, le NTS et le DMV ainsi que les fibres nerveuses afférentes et efférentes du nerf vague (X) localisées dans les viscères abdominaux, c'est-à-dire dans l'estomac, l'intestin grêle, le colon, la vésicule biliaire, le foie et le pancréas. Un schéma de ce circuit neuronal est illustré à la figure 4.

Le mécanisme fonctionnel du contrôle à court terme consiste en des signaux afférents nerveux et humoraux en provenance des viscères abdominaux jusqu'au NTS, suivi de l'interprétation, par le NTS, et de la conversion, par le DMV, de ces activités en commandes motrices envoyées aux organes périphériques (Schwartz, 2000 ; Smith, 2000b).

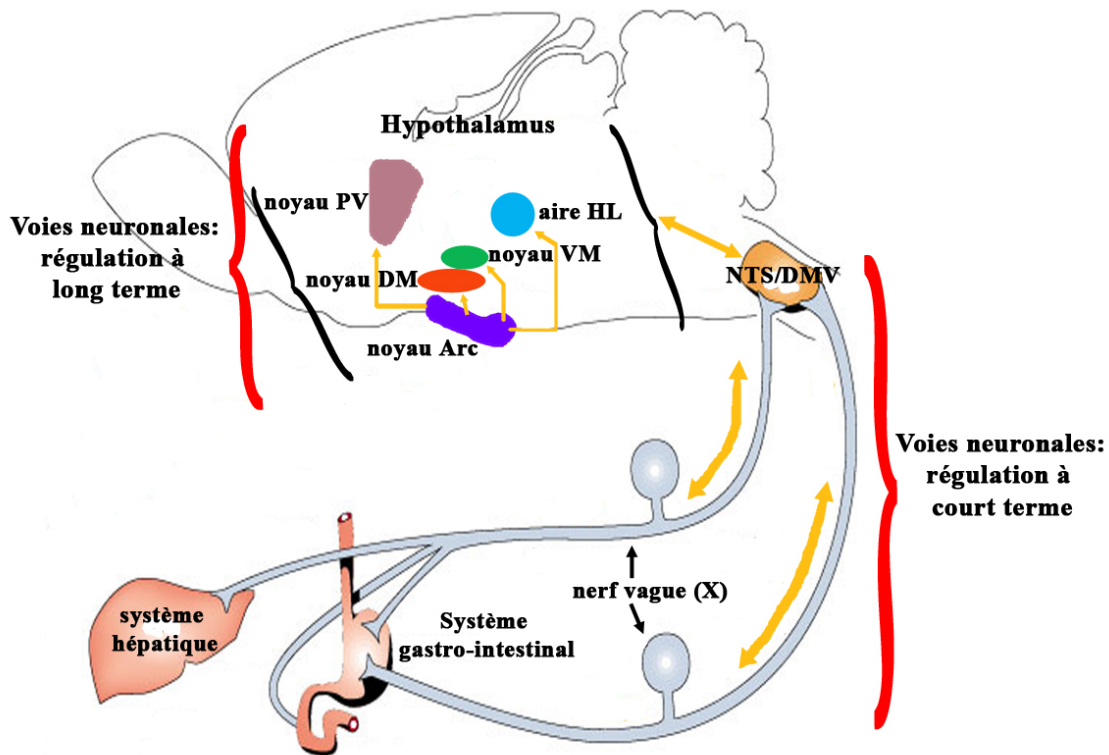


Figure 4. Représentation schématique des voies neuronales de la régulation, à court et à long termes, de la prise alimentaire. Adapté de Schwartz et al., 2000.

1.2.1.2 Signaux nerveux

De multiples signaux sensoriels sont véhiculés par le nerf vague (X) et sont, pour la plupart, inhibiteurs de la prise alimentaire. Ces signaux sensoriels sont à la fois mécaniques et chimiques et sont initiés par: 1) des mécanorécepteurs gastriques indiquant l'état de réplétion gastrique; 2) des chémorécepteurs gastriques et intestinaux indiquant la présence de nutriments dans le tube digestif; et 3) des signaux nerveux d'origine hépatique indiquant la métabolisation de substrats énergétiques (Havel, 2001).

1.2.1.3 Facteurs humoraux à court terme

Les facteurs humoraux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire à court terme sont des facteurs qui informent du statut nutritionnel immédiat de l'organisme. Par conséquent, ces facteurs humoraux sont produits principalement par le système digestif et sécrétés immédiatement avant et après le début d'un repas, afin de contrôler la taille du présent repas. À l'exception de la ghreline, ces facteurs sont, pour la plus part, inhibiteurs de la prise alimentaire immédiate. Par conséquent, ils induisent l'état de satiété. L'effet satiétogène de ces facteurs humoraux lors de la prise alimentaire est rapide, immédiat et de courte durée. Les principaux facteurs humoraux du contrôle de la prise alimentaire à court terme sont : la cholécystokinine (CCK), le peptide YY (PYY) et la ghreline.

1.2.1.3.1 Cholécystokinine (CCK)

La cholécystokinine est le prototype des peptides de la satiété et demeure le peptide du système digestif le plus étudié. On retrouve la CCK dans le SNC ainsi que dans plusieurs organes du système digestif.

Dans le SNC, la CCK est largement exprimée dans les neurones du cortex, de l'amygdala, de l'hippocampe, du thalamus, de l'hypothalamus, des ganglions de la base et du tronc cérébral (Beinfeld & Palkovits, 1981 ; Crawley & Corwin, 1994 ; Noble et al., 1999). La CCK est présente à la fois dans les corps cellulaires et dans les axones des cellules nerveuses où elle semble agir comme neurotransmetteur et neuromodulateur. En ce sens, plusieurs études ont démontré une association entre une perturbation de la voie centrale de la CCK et certains désordres neuropsychiatriques, tels que l'anxiété, la schizophrénie et les désordres alimentaires boulimie et anorexie (Crawley & Corwin, 1994 ; Noble et al., 1999).

Dans le système digestif, la CCK se retrouve aussi bien dans les cellules entéroendocrines des muqueuses de l'intestin, principalement dans le duodénum et le jéjunum, que dans les nerfs entériques de l'iléon et du colon (Polak et al., 1975 ; Buffa et al., 1976 ; Larsson & Rehfeld, 1978 ; Crawley & Corwin, 1994 ; Noble et al., 1999). Il existe plusieurs isoformes de CCK, qui dérivent tous d'un peptide précurseur, la pré-procholécystokinine, par suite de réactions protéolytiques. Ces

modifications post-traductionnelles sont spécifiques à chaque organe, ce qui entraîne un patron d'expression des diverses isoformes bio-actives qui diffère d'un organe à l'autre. Par exemple, les cellules entéroendocrine-I sécrètent principalement les isoformes CCK-33 et CCK-8; tandis que l'isoforme CCK-8 prédomine dans le SNC (Rehfeld et al., 2003 ; Strader & Woods, 2005). Dans l'intestin, la sécrétion de la CCK est stimulée principalement par la présence d'acides gras, de protéines, ainsi que de leurs divers produits de digestions dans le canal intraluminal de l'intestin (Liddle et al., 1995 ; McLaughlin et al., 1999 ; Matzinger et al., 2000).

La sécrétion de la CCK induit de multiples actions physiologiques du système gastrointestinal, incluant la stimulation de la sécrétion de la bile et des enzymes pancréatiques, la contraction de la vésicule biliaire, l'inhibition de la vidange gastrique, ainsi que l'altération de la motilité des intestins (Crawley & Corwin, 1994 ; Grider, 1994 ; Noble et al., 1999 ; Rehfeld et al., 2003 ; Strader et Woods, 2005). La plupart de ces actions sont causées par l'action endocrine de la CCK qui circule dans le sang. Elles ont pour but d'optimiser la digestion et l'absorption des macronutriments, particulièrement celles des protéines et les acides gras (Rehfeld et al., 2003 ; Strader et Woods, 2005).

La CCK agit aussi de façon paracrine en activant les fibres afférentes sensorielles du nerf vague (X). Cette voie neuronale, une fois activée, envoie directement au tronc cérébral un signal de rétrocontrôle négatif qui induit la sensation de satiété, par conséquent l'arrêt de consommation. Cette action paracrine de la CCK est démontrée par le fait que l'effet inhibiteur de la CCK sur la prise alimentaire est éliminé à la suite d'une vagotomie sous diaphragmatique et/ou de la destruction sélective des petites fibres afférentes sensorielles, dépourvues de myéline, du nerf vague (X), par un traitement à la capsaïcine (Ritter & Ladenheim, 1985 ; Smith et al., 1985 ; South & Ritter, 1988 ; Mercer et al., 1992 ; Moran et al., 1997). De même, les dommages au NTS, qui reçoit directement les afférences sensorielles du nerf vague (X), altèrent l'effet inhibiteur de la CCK sur la prise alimentaire (Edwards et al., 1986).

Les récepteurs qui reconnaissent la CCK appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G (Herranz, 2003). Deux sous-types de récepteurs ont été identifiés : le CCK_A (pour Alimentary)

ou CCK-1 et le CCK_B (pour Brain) ou CCK-2 (Crawley & Corwin, 1994 ; Nobel et al., 1999 ; Herranz, 2003). Les récepteurs CCK_A se retrouvent principalement et à forte densité dans le système digestif (pancréas, vésicule biliaire, muqueuse gastrique, sphincter pylorique, sphincter d'Oddi et sphincter de l'oesophage), où ils sont responsable de la régulation des divers processus digestifs. De plus, ils sont présents dans des régions spécifiques du système nerveux périphérique, c'est-à-dire sur les afférences sensorielles du nerf vague (X), et dans le SNC, particulièrement dans le NTS et le noyau DM, où ils induisent l'effet de satiété de la CCK (Garlicki et al., 1990 ; Crawley & Corwin, 1994 ; Nobel et al., 1999 ; Herranz, 2003). Les récepteurs CCK_B sont, quand à eux, retrouvés essentiellement dans le SNC (Crawley & Corwin, 1994 ; Nobel et al., 1999 ; Herranz, 2003). Il a été démontré que c'est principalement par ces récepteurs que la CCK induit ses effets anxiogène, nociceptif et neuroprotecteur (Crawley & Corwin, 1994 ; Nobel et al., 1999).

Même si l'existence de la CCK remonte à la fin des années 1920, lorsque Ivy et Oldberg (1928) ont observé que des extraits de muqueuse intestinale de colon de cochon provoquaient des contractions de la vésicule biliaire chez le chien, ce n'est que dans les années 1970 que l'implication de la CCK dans la régulation de la prise alimentaire a été proposée (Ivy & Oldberg, 1928 ; Gibbs et al., 1973). En 1973, Gibbs et ses collègues ont démontré que l'injection exogène de CCK de cochon partiellement purifiée ou de CCK-8 synthétique dans la cavité péritonéale chez la rat, diminue leur appétit (Gibbs et al., 1973). Il a de plus été démontré que le phénotype produit, à la suite de l'injection de ce peptide était similaire à un phénotype de satiété naturellement induit chez les animaux à la fin de chaque repas (Antin et al., 1975). Ces observations ont conduit à proposer que le rôle de la CCK dans la régulation de la prise alimentaire soit d'accélérer le processus de satiété en diminuant la taille et la durée du repas. Cette hypothèse a été étayée par l'observation que l'injection intra-cérébrale de CCK diminue aussi la taille du repas (Gibbs & Smith, 1977 ; Zhang et al., 1986 ; Asin et al., 1992) et que l'effet inverse, c'est-à-dire une augmentation de la taille du repas, est observé après l'injection d'antagonistes spécifiques au récepteur CCK_A (Hewson et al., 1988 ; Moran et al., 1992; 1993 ; Corp et al., 1997).

Récemment, des études comportementales ont démontré que la CCK appartient spécifiquement à la catégorie des signaux hormonaux à court terme. Ceci est illustré par le fait que, chez le rat, l'injection répétée à long terme ou même intermittente de CCK n'a aucun effet sur la masse pondérale (Crawley & Beinfeld, 1983; West et al., 1984 ; 1987; Lukaszewsky & Praissman, 1988). Quand la taille de chaque repas est réduite par l'action de la CCK, les animaux compensent en augmentant la fréquence des repas (West et al., 1984 ; 1987). Par conséquent, l'apport calorique moyen journalier ainsi que la masse pondérale de ces animaux demeurent relativement stables pour ne pas dire inchangés (West et al., 1984 ; Lukaszewski & Praissman, 1988). De plus, la CCK doit être injectée peu avant ou après le début initial du repas afin de produire son effet inhibiteur sur la prise alimentaire. En fait, si l'injection de CCK a lieu plus de 15 minutes avant le moment initial du repas, l'effet inhibiteur de la CCK n'est pas observé (Gibbs et al., 1973).

Finalement, la CCK joue possiblement un rôle comme médiateur de l'interaction entre la régulation de la prise alimentaire à court et à long termes par son action directe dans le tronc cérébral, particulièrement dans le NTS. Cette hypothèse est corroborée par plusieurs observations. Tout d'abord, des connexions neuronales bidirectionnelles existent entre le NTS et divers noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire à long terme. En second lieu, il a été démontré que l'injection intra-péritonéale (i.p.) de CCK induit, d'une part, l'activation du gène *c-fos*, un marqueur précoce de l'activation neuronale, dans le NTS et le noyau PV de souris, et d'autre part, comme effet physiologique, une réduction de la durée et de la taille du repas (Li & Rowland, 1995; Barrachina et al., 1997; Wang et al., 1998b; Edmond et al., 1999). Finalement, il a été démontré que l'une des populations neuronales activées par l'injection i.p. de CCK exprime le *POMC*. La voie hypothalamique de la mélanocortine est aussi impliquée dans la régulation de la prise alimentaire à long terme (REFS).

1.2.1.3.2 Peptide YY (PYY)

Le peptide YY est un peptide de 36 acides aminés qui appartient à la famille des polypeptides pancréatiques. Ce peptide est synthétisé par les cellules intestinales L du segment distal de l'intestin. Après l'ingestion d'un repas, PYY est

sécrété dans la circulation sanguine et les concentrations plasmatiques sont proportionnelles aux valeurs caloriques du repas consommé. Par exemple, un repas riche en matières grasses induit une plus grande sécrétion de PYY qu'un repas riche en protéines et/ou en hydrates de carbones. Il existe deux formes principales de PYY : PYY₁₋₃₆ et PYY₃₋₃₆. Le PYY₃₋₃₆ est la forme active que l'on retrouve dans les cellules endocrines de la muqueuse intestinale ainsi que dans la circulation sanguine (McGowan & Bloom, 2004 ; Le Roux & Bloom, 2005). Le PYY médie ces fonctions physiologiques via des récepteurs appartenant à la famille de récepteurs Y. Plusieurs isoformes de récepteurs Y –Y1R-Y5R—ont été identifiées et sont exprimés dans l'hypothalamus, le tronc cérébral et le nerf vague (X) (Browning & Travagli, 2003 ; Cox & Randish, 2004 ; Abbott et al., 2005b ; Koda et al., 2005). Même si la forme PYY₁₋₃₆ est capable de se lier à toutes les isoformes de récepteurs Y, la forme active, PYY₃₋₃₆ se lie préférentiellement, avec une plus grande affinité, à l'isoforme Y2R. Il a même été démontré que c'est via son interaction avec l'isoforme Y2R que PYY₃₋₃₆ médie son effet anorexigène. De fait, l'action anorexigène du PYY₃₋₃₆ est absente chez les souris invalides pour le gène du récepteur Y2R (Batterhan et al., 2002). De plus, chez le rat, la co-injection de PYY₃₋₃₆ avec un antagoniste du récepteur Y2R dans le noyau Arc bloque l'effet inhibiteur de ce peptide sur la prise alimentaire (Abbott et al., 2005a ; Scott et al., 2005).

Le PYY exerce plusieurs effets sur le système digestif, tel que : favoriser l'absorption de liquides et d'électrolytes et inhiber la sécrétion gastrique, la sécrétion pancréatique, les contractions de la vésicule biliaire et la vidange gastrique, ce qui favorise l'absorption et la digestion des nutriments. En plus de ces effets physiologiques, PYY joue aussi un rôle dans la régulation de la prise alimentaire comme facteur de satiété pour favoriser la terminaison d'un repas et possiblement comme facteur d'adiposité pour diminuer la masse pondérale (Le Roux & Bloom, 2005).

En ce qui concerne la régulation de la prise alimentaire, PYY influence principalement la régulation à court terme. En effet, chez les rats non obèses ainsi que chez les souris et les humains obèses et non obèses, il a été démontré que l'injection intraveineuse (i.v.) et i.p. de PYY₃₋₃₆ inhibe la prise alimentaire (Batterham et al., 2002 ; 2003 ; Challis et al., 2004 ; Halatchev et al., 2004 ; Pittner et al., 2004).

Par exemple, chez la souris, il a été démontré que l'injection i.p. de PYY₃₋₃₆ réduit la prise alimentaire de 20 à 45% sur une période de 3 à 4 heures par suite d'un jeûne et/ou lors de la phase nocturne du cycle nuit-jour (Halatchev et al., 2004). Chez l'humain, une réduction de 30% est observée, et l'effet du peptide se maintient sur une période de 12 heures (Batterham et al., 2003). Il est à noter que cet effet physiologique est observé chez les animaux complètement acclimatés aux procédures expérimentales. Chez l'animal non acclimaté, l'effet de stress semble masquer l'effet anorexigène du peptide (Batterham et al., 2002 ; Halatchev et al., 2004).

Certaines études chez les rats obèses et non obèses ainsi que certains modèles de souris obèses ont démontré que l'injection chronique i.v. et/ou i.p. de PYY₃₋₃₆ pouvait aussi induire une diminution de la masse pondérale (Batterham et al., 2002 ; Pittner et al., 2004). Ce résultat est controversé car d'autres groupes de chercheurs n'ont pas réussi à le reproduire (Challis et al., 2004 ; Tschöp et al., 2004). Par exemple, Challis et ses collègues (2004) n'ont pas observé de diminution de la masse pondérale chez des souris sauvages de même que chez des souris invalides pour le gène *POMC*, souris *POMC*^{-/-}, traitées de façon chronique avec le PYY₃₋₃₆ (Challis et al., 2004). De façon similaire, Tschöp et ses collègues (2004) n'ont pas été capable de reproduire les résultats de Batterham et ses collègues (2002), c'est-à-dire une diminution de la prise alimentaire de même qu'une diminution de la masse pondérale, par suite de l'administration chronique de PYY₃₋₃₆ dans plusieurs modèles de rongeurs (Tschöp et al., 2004). Récemment, toutefois Chelikani et ses collègues (2006) ont démontré que l'effet inhibiteur de PYY₃₋₃₆ sur la masse pondérale est observé seulement quand les intervalles d'injection de PYY₃₋₃₆ sont rapprochés de façon à éviter un effet de rebond compensatoire du système de régulation de la prise alimentaire pour rééquilibrer l'homéostasie énergétique (Chelikani et al., 2006). Chez la souris invalides pour le gène *PYY*, souris *PYY*^{-/-}, qui est hyperphagique et obèse, il a été démontré que l'administration chronique de PYY₃₋₃₆ corrige le phénotype d'obésité observé, et diminue, entre autres, la masse pondérale (Batterham et al., 2006).

Le PYY semble induire ces effets inhibiteurs sur la régulation de la prise alimentaire en interférant à plusieurs niveaux du circuit neuronal qui régule la prise alimentaire.

Diverses données suggèrent que le PYY₃₋₃₆ agit dans le noyau Arc via les récepteurs Y2R pour moduler l'expression de la NPY, un puissant neurotransmetteur orexigène impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. Dans un premier temps, il a été démontré que l'injection de PYY₃₋₃₆ spécifiquement et directement dans le noyau Arc diminue la prise alimentaire durant sa phase nocturne de même que par suite d'un jeûne chez les rongeurs (Batterham et al., 2002). Deuxièmement, il a été démontré que l'expression de la protéine c-FOS est augmentée dans le noyau Arc après l'injection i.p. de PYY₃₋₃₆ (Batterham et al., 2002 ; Halatchev et al., 2004). Ces effets sont fort probablement médiés via les auto-récepteurs pré-synaptiques inhibiteurs Y2R présents sur les neurones exprimant la NPY dans le noyau Arc. Cette hypothèse est corroborée par l'absence d'inhibition de la prise alimentaire chez les souris invalides pour le gène du récepteur *Y2R*, souris *Y2R*^{-/-}, après l'injection i.p. de PYY₃₋₃₆. Finalement, il a été démontré que les effets anorexigènes de PYY₃₋₃₆ sont médiés principalement via l'inhibition de l'activité des neurones exprimant NPY dans le noyau Arc. Des études ex vivo sur des explants d'hypothalamus ont démontré que le traitement de ces explants avec un agoniste spécifique pour le récepteur Y2R inhibe la sécrétion de NPY, tout en induisant la sécrétion de l' α -MSH, un neurotransmetteur anorexigène critique impliqué dans la régulation de la prise alimentaire (Batterham et al., 2002). De plus, Challis et ses collègues (2003) ont démontré que l'expression de l'ARNm pour le gène *POMC*, le gène précurseur de l' α -MSH, est augmentée dans l'hypothalamus de souris injectées avec le PYY₃₋₃₆, tandis que l'expression de l'ARNm de *NPY* est diminuée (Batterham et al., 2002 ; Challis et al., 2003). Même si ces observations suggèrent que PYY₃₋₃₆ médie ses effets anorexigènes, d'une part en stimulant les neurones anorexigènes *POMC* et d'autre part en inhibant les neurones orexigènes *NPY* du noyau Arc, il semble que l'effet stimulateur de PYY₃₋₃₆ sur les neurones *POMC* n'est pas requis (Challis et al., 2004 ; Halatchev et al., 2004). Aussi, les souris *POMC*^{-/-} ainsi que les souris invalides pour le gène du récepteur de l'isoforme 4 de la mélanocortine (*MC4R*), souris *MC4R*^{-/-}, tout comme les souris sauvages, sont

sensibles aux effets anorexigènes de PYY₃₋₃₆ (Challis et al., 2004; Halatchev et al., 2004)

Récemment, il a été proposé que l'action inhibitrice de PYY₃₋₃₆ sur la prise alimentaire soit aussi médiée via le nerf vague (X) et le tronc cérébral, principalement dans le NTS. Plusieurs données supportent cette hypothèse. Tout d'abord, il a été démontré que les récepteurs Y2R sont exprimés dans les corps cellulaires des fibres nerveuses afférentes du nerf vague (X) et transportés dans les terminaux afférents de ce nerf (Zhang et al., 1997 ; Koda et al., 2005). En second lieu, il a été démontré que les effets inhibiteurs de PYY₃₋₃₆ sur la prise alimentaire sont abolis chez les rats ayant subi une vagotomie bilatérale sous diaphragmatique ou une transection bilatérale complète entre le tronc cérébral et l'hypothalamus (Abbott et al., 2005b ; Koda et al., 2005). De plus, chez les rats avec vagotomie bilatérale sous diaphragmatique on n'observe plus d'expression de la protéine c-FOS dans le noyau Arc par suite de l'injection i.p. de PYY₃₋₃₆ (Koda et al., 2005). Ces observations suggèrent que la voie neuronale, nerf vague (X) ↔ tronc cérébral ↔ hypothalamus, est importante pour médier les effets inhibiteurs de PYY₃₋₃₆ sur la prise alimentaire.

1.2.1.3.3 Ghrelina

La ghrelina est la seule hormone circulante identifiée jusqu'à présent dont l'administration systémique stimule la prise alimentaire. Ce peptide de 28 acides aminés est produit et sécrété principalement par les glandes oxyntiques du fundus gastrique (Kojima et al., 1999). Toutefois, la ghrelina est aussi synthétisée dans le placenta, les reins, le cœur, la glande thyroïde, l'hypophyse et l'hypothalamus (Anubhuti, 2006). La ghrelina est un ligand endogène des récepteurs des sécrétagogues de l'hormone de croissance (GH), (GHS-R). De fait, la ghrelina a été initialement caractérisée comme l'un des facteurs de contrôle de la sécrétion de GH (Kojima et al., 1999). Les récepteurs GHS-R appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G et sont principalement exprimés dans l'hypophyse (Guan et al., 1997). Toutefois, l'expression de ces récepteurs est aussi observée dans l'hypothalamus, en particulier le noyau Arc, dans le nerf vague (X), l'intestin, l'estomac, le cœur, les poumons et les tissus adipeux (Guan et al., 1997 ; Muccioli et al., 2002 ; Sakata et al., 2003).

La ghrelina, en plus de son effet comme sécrétagogue de la GH, participe aussi à plusieurs autres fonctions physiologiques, telles que la reproduction, le sommeil, le métabolisme des lipides et du glucose, la motilité et la sécrétion gastrique, ainsi que la régulation de la prise alimentaire (Anubhuti, 2006).

Il a été démontré que la ghrelina est un orexigène, c'est-à-dire un facteur humoral responsable de la sensation de faim et de l'initiation de la prise alimentaire. Chez le rat ainsi que chez l'humain, la concentration sanguine de la ghrelina est élevée en période de jeûne ou augmente rapidement avant la consommation d'un repas et diminue par suite de la prise du repas (Tschöp et al., 2000 ; Cummings et al., 2001 ; 2002). De plus, il a été observé que le niveau plasmatique de ce peptide est diminué chez les personnes obèses et élevé chez les patients ayant un trouble alimentaire tel l'anorexie (Anubhuti, 2006), ainsi que chez les personnes qui suivent un régime alimentaire amaigrissant (Cummings et al., 2002).

La ghrelina est un orexigène très puissant. En effet, plusieurs études expérimentales et cliniques ont démontré que son administration i.p., intracérébroventriculaire (i.c.v) ou i.v. induit chez le rongeur et l'humain la consommation immédiate d'un plus gros repas (Tschöp et al., 2000 ; Nakazato et al., 2001 ; Wren et al., 2001a ; 2001b). Chez l'humain, cet effet est aussi accompagné d'une sensation de faim (Wren et al., 2001a). Ce rôle physiologique de la ghrelina est confirmé par l'observation que la pré-injection d'anticorps anti-ghrelina inhibe de façon significative la prise alimentaire chez le rat durant la phase nocturne du cycle nuit-jour ou par suite d'un jeûne (Nakazato et al., 2001).

En plus de son effet stimulateur sur la prise alimentaire à court terme, la ghrelina joue aussi un rôle sur la régulation à long terme. L'administration chronique i.p. ou i.c.v. de ghrelina provoque une prise de poids chez les rongeurs (Tschöp et al., 2000 ; Nakazato et al., 2001 ; Wren et al., 2001b). Cette augmentation de la masse pondérale est causée par une augmentation de la masse adipeuse due à une réduction de son utilisation comme réserve énergétique (Tschöp et al., 2000).

Chez les rongeurs, les effets stimulateurs de la ghreline sur la prise alimentaire sont médiés à la fois par les circuits neuronaux hypothalamiques et par les circuits neuronaux qui relient le système digestif au tronc cérébral. Plusieurs données suggèrent que le noyau Arc, en tant que région hypothalamique régulant la prise alimentaire à long terme, est impliqué dans les effets orexigène de la ghreline. Dans le SNC, les récepteurs GHS-R sont abondamment exprimés dans l'hypothalamus, particulièrement dans le noyau Arc (Muccioli et al., 2002) et l'effet stimulateur de la ghreline sur la prise alimentaire est plus prononcé lorsque ce peptide est injecté dans le noyau Arc (Wren et al., 2001b). De plus, l'inactivation sélective des récepteurs GHS-R du noyau Arc par des ARNm antisens atténue l'effet stimulateur de la ghreline sur la prise alimentaire (Shuto et al., 2002). Ces effets de la ghreline semblent être médiés via l'activation des neurones du noyau Arc qui co-synthétisent les neurotransmetteurs orexigènes NPY et AgRP. De fait, il a été démontré que l'injection i.p. de la ghreline induit l'expression des protéines c-FOS et Erg-1, deux marqueurs de l'activation neuronale, dans ces neurones du noyau Arc (Hewson & Dickson, 2000). De plus, il a été observé que l'injection i.c.v. de ghreline augmente l'expression de l'ARNm des peptides NPY et AgRP spécifiquement dans ce noyau (Kamegai et al., 2000 ; Shintani et al., 2001 ; Wang et al., 2002). Finalement, des études ont démontré que l'effet orexigène de la ghreline est supprimé lorsque l'on co-injecte la ghreline avec soit un antagoniste du récepteur NPY Y1, soit un anticorps anti-NPY, soit un anticorps anti-AgRP (Nakazato et al., 2001 ; Shintani et al., 2001). De plus, la co-injection de la ghreline avec l'antagoniste du récepteur NPY Y1 abolit aussi l'augmentation de l'expression de l'ARNm du gène *NPY* dans l'hypothalamus (Asawaka et al., 2001).

Récemment, des études ont démontré que les effets stimulateurs de la ghreline sur la prise alimentaire pouvaient être en partie médiés par le nerf vague (X). Tout d'abord, la présence d'ARNm pour le récepteur GHS-R dans les corps cellulaires, ainsi que de la protéine dans les terminaisons afférentes du nerf vague (X) a été observé (Date et al., 2002 ; Sakata et al., 2003). En second lieu, des études électrophysiologiques ont démontrées que les activités électriques du nerf vague (X) sont diminuées par suite de l'injection i.v. de ghreline (Asakawa et al., 2001 ; Date et al., 2002). De plus, l'effet stimulateur de la ghreline sur la prise alimentaire (Asakawa et al., 2001 ; Date et al., 2002) de même que l'augmentation de l'expression de

l'ARNm du gène *NPY* dans l'hypothalamus (Asakawa et al., 2001) sont abolis par suite de l'injection i.p. ou i.c.v. de ghreline chez des animaux avec vagotomie complète ou élimination sélective des fibres afférentes du nerf vague (X) par capsaïcine. D'autant plus, l'expression de la protéine c-FOS n'est plus induite dans le noyau Arc de ces animaux (Date et al., 2002). Par contre, les effets de la ghreline, augmentation de la prise alimentaire et augmentation de l'expression de l'ARNm du gène *NPY*, sont observés chez ces mêmes animaux lorsque le peptide est injecté par voie i.c.v. (Date et al., 2002).

1.2.2 Système de contrôle à long terme

Le contrôle de la prise alimentaire à long terme est associé à la quantité des réserves énergétiques de l'organisme, c'est-à-dire à la masse pondérale adipeuse. La régulation de la prise alimentaire à long terme se manifeste par une relative stabilité sur de longues périodes (à l'échelle de semaine et de mois) des réserves d'énergie de l'organisme et donc du poids corporel. Ce système de contrôle à long terme est prépondérant par rapport aux phénomènes de contrôle à court terme. Ainsi, alors que la prise alimentaire fluctue de façon notable d'un jour à l'autre, la consommation calorique journalière moyenne (évaluée sur des périodes de l'ordre de la semaine ou du mois) est remarquablement constante chez un individu donné. Par exemple, chez l'homme ou l'animal de poids normal soumis à une période de restriction ou de suralimentation imposée, le retour à une alimentation libre permet de ramener rapidement le poids à sa valeur initiale, grâce à une adaptation spontanée de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques.

Tout comme le système de contrôle à court terme, le système de contrôle de la prise alimentaire à long terme implique des réseaux de circuits neuronaux et des facteurs humoraux périphériques.

1.2.2.1 Voies neuronales

Les structures neuro-anatomiques impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire à long terme sont situées dans l'hypothalamus et impliquent des voies neuronales qui signalent soit la satiété soit la faim, selon l'état des réserves

adipeuses. Les noyaux hypothalamiques impliqués dans ces phénomènes physiologiques sont principalement les noyaux Arc, PV, DM, VM et l'aire HL.

Les voies neuronales de signalisation de la satiété comprennent un réseau axonal dont le point de départ est le noyau Arc, lequel se projette vers les autres noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, c'est-à-dire les noyaux PV, VM et DM. Les voies de signalisation pour le contrôle de la faim prennent aussi origine dans le noyau Arc, mais se projettent, pour leur part, sur divers noyaux de l'aire HL, bien connue comme étant le centre de la faim. Un schéma de ces circuits neuronaux est illustré dans la figure 4.

Le contrôle de la prise alimentaire à long terme fonctionne selon un mécanisme de rétrocontrôle négatif classique. Ce mécanisme consiste en la production de facteurs humoraux, tels que l'insuline et la leptine, qui indiquent la quantité d'adiposité de l'organisme. Ces facteurs parviennent au noyau Arc par voie sanguine, puis traversent la BHE, pour ensuite activer les voies neuronales telles que noyau Arc ↔ noyau PV et/ou noyau Arc ↔ aire HL. Cette suite d'évènements permet l'adaptation de la prise alimentaire ainsi que des dépenses énergétiques aux besoins de l'organisme.

1.2.2.2 Facteurs humoraux à long terme

Les signaux humoraux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire à long terme sont des facteurs reflétant le statut des réserves énergétiques stockées dans le tissu adipeux blanc. Ces facteurs humoraux sont produits entre autre par certaines glandes endocrines tel le pancréas, et aussi par le tissu adipeux blanc. Ils sont sécrétés et circulent en proportion directe ou inverse de la masse adipeuse, traversent la BHE, et agissent dans l'hypothalamus, afin que celui-ci adapte la prise alimentaire et la dépense énergétique.

Tout comme les facteurs humoraux à court terme, les facteurs humoraux à long terme, à l'exception de l'adiponectine, ont un effet inhibiteur sur la prise alimentaire. Toutefois, leur action satiétogène est de plus longue durée et n'induit pas d'effet compensatoire tel une augmentation du nombre de repas lors d'une

réduction de la taille des repas. Par conséquent, l'action de ces facteurs est de maintenir et/ou de réduire la masse pondérale.

Les principaux facteurs humoraux du contrôle de la prise alimentaire à long terme sont : l'insuline, la leptine et l'adiponectine.

1.2.2.2.1 Insuline

L'insuline est le premier facteur humoral, signalant l'adiposité, qui a été identifié. Cette hormone est synthétisée par les cellules bêtas des ilots de Langerhans du pancréas et sécrétée de façon aiguë lors d'une augmentation de la concentration du glucose dans le sang. Même si les fonctions primaires de l'insuline sont la régulation du taux plasmatique et l'utilisation du glucose par divers organes périphériques (Woods et al., 2006), il a été démontré que l'insuline agit aussi comme anorexigène et adipogène dans le SNC. De fait, même si l'insuline n'est pas produite dans le SNC, elle est transportée dans le SNC (Schwartz et al., 1990 ; 1991 ; Baura et al., 1993) par un mécanisme, saturable à forte concentration d'insuline (Schwartz et al., 1991 ; Baura et al., 1993), qui implique les récepteurs à insuline présents sur les cellules endothéliales de la BHE (Baura et al., 1993). De plus, il a été montré que la quantité d'insuline sécrétée, soit à l'état basal et/ou en réponse à une augmentation de la glycémie, est directement proportionnelle au degré d'adiposité (Bagdale et al., 1967 ; Woods et al., 1974 ; Polonsky et al., 1988) et principalement proportionnelle à la masse des tissus adipeux blanc viscéraux (Wajchenberg, 2000). Comparativement aux individus minces, les individus obèses ont des niveaux d'insuline élevés, même à l'état basal (Bagdale et al., 1967). Cette observation est valable chez plusieurs espèces (Polonsky et al., 1988).

Ces fonctions de l'insuline dans le SNC sont assurées par la présence de récepteurs dans chacune des régions du SNC impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et de la masse pondérale. En particulier, les récepteurs à l'insuline sont fortement exprimés dans le bulbe olfactif et le noyau Arc. D'autres régions de l'hypothalamus où ces récepteurs sont aussi retrouvés incluent les noyaux PV, DM, suprachiasmatique ainsi que la région hypothalamique périventriculaire (Anubhuti, 2006). Finalement, il a été démontré chez le babouin (Woods et al., 1979) et chez le

rat (Brief & Davis, 1984 ; Air et al., 2002), que l'administration i.c.v. d'insuline de façon chronique et/ou aigue induit une diminution de la prise alimentaire et de la masse pondérale. De façon inverse, la diminution de l'activité de l'insuline dans le SNC, soit par la pré-injection d'anticorps anti-insuline dans l'hypothalamus ventral et/ou l'interruption de l'activité du récepteur à l'insuline spécifiquement dans les cellules neuronales, atténue les effets anorexigènes et adipogènes de cette hormone (Strubbe & Mein, 1977 ; McGowan et al., 1992 ; Brüning et al., 2000). De façon intéressante, il semble que l'insuline agisse davantage comme adipogène, c'est-à-dire comme facteur humoral qui régule la masse pondérale, qu'en tant qu'anorexigène, c'est-à-dire comme facteur humoral qui réduit la prise alimentaire. Ceci est illustré par l'étude de Chavez et ses collègues (1995), qui ont administré pendant trois jours des injections i.c.v. d'insuline à des rats non à jeun ou à jeun. Ces auteurs ont démontré que, même si l'injection d'insuline chez les rats non à jeun induisait une diminution de la prise alimentaire et de la masse pondérale, chez les rats à jeun, lors de la ré-alimentation, et malgré l'injection d'insuline, les animaux devenaient hyperphagiques et augmentaient leur masse pondérale. Toutefois, vers le 6^{ième} jour de l'expérience, la masse pondérale des deux groupes d'animaux devenait similaire (Chavez et al., 1995). Ces observations suggèrent que l'insuline ne cause pas nécessairement une diminution de la prise alimentaire, mais régule de façon plus rigide la masse pondérale.

Les récepteurs de l'insuline appartiennent à la famille des récepteurs à tyrosine kinase. L'interaction de cette hormone avec le domaine extracellulaire de ces récepteurs active au moins trois voies de signalisation intracellulaires : la voie de la protéine phospholipase C (PLC), la voie de l'«insulin receptor substrate phosphoinositol-3 kinase» (IRS-PI3K) et la voie de la protéine kinase mitogène activée (MAPK) (Gerozissis, 2003). Dans le SNC, l'insuline agit au moins via la voie de signalisation IRS-PI3K. Niswender et ses collègues (2003) ont démontré que la pré-injection i.c.v. d'inhibiteurs spécifiques à la protéine PI3K bloque les effets inhibiteurs de l'insuline sur la prise alimentaire ainsi que sur la masse pondérale (Niswender et al., 2003). Ceci est probablement médié via l'interaction entre la protéine PI3K et la protéine substrat-2 du récepteur à l'insuline (IRS-2). De fait, l'ARNm du gène *IRS-2* est fortement exprimé dans le noyau Arc (Torsoni et al., 2003 ; Kubota et al., 2004). De plus, il a été démontré que l'injection en périphérie

d'insuline active la phosphorylation de la protéine IRS-2 dans l'hypothalamus (Torsoni et al., 2003). Finalement, les souris knock-out pour le gène *IRS-2* développent une obésité sévère associée à une hyperphagie et une augmentation de la masse pondérale (Burks et al., 2000 ; Kubota et al., 2004). Ce phénotype peut être renversé par l'insertion du gène *IRS-2* spécifiquement dans le SNC (Lin et al., 2004).

L'insuline médie ses effets anorexigène et adipogène en activant et en inhibant respectivement les circuits neuronaux cataboliques et anaboliques dans le noyau Arc. De fait, plusieurs observations suggèrent que l'action de l'insuline est médié via les neurones exprimant la NPY et les neurones exprimant la POMC dans le noyau Arc. Tout d'abord, les récepteurs à l'insuline sont exprimés par les neurones qui synthétisent soit la POMC ou le NPY (Benoit et al., 2002 ; Obici et al., 2002). En second lieu, une augmentation de l'expression de l'ARNm du gène *NPY* et une diminution de l'expression de l'ARNm du gène *POMC* ont été observées chez les rats dont le niveau d'insuline est diminué, c'est-à-dire des rats diabétiques et/ou à jeun (Schwartz et al., 1992 ; Sipols et al., 1995 ; Air et al., 2002 ; Benoit et al., 2002). Des effets inverses sur l'expression de ces gènes dans l'hypothalamus ont été observés par suite de l'injection i.c.v. d'insuline. De plus, la diminution de l'expression du récepteur à l'insuline spécifiquement dans la région médiale du noyau Arc, région où les neurones qui synthétisent le NPY sont localisés, par l'injection d'un ARNm antisens, induit une augmentation d'ARNm du gène *NPY* (Obici et al., 2002). Finalement, une augmentation de l'expression de l'ARNm du gène *POMC* observé par suite de l'injection i.c.v. d'insuline est complètement bloqué par l'administration préalable d'un antagoniste de la POMC (Benoit et al., 2002).

1.2.2.2.2 Leptine

La leptine, une hormone de 16kDa, a été découverte en 1994 par Friedman et ses collègues (Zhang et al., 1994). Cette hormone est principalement synthétisée par les cellules adipeuses. Cependant, elle est aussi synthétisée, mais à plus faible concentration, par les cellules adipeuses brunes (chez les rongeurs), l'estomac, le placenta, les muscles squelettiques, les glandes mammaires et certains organes fœtaux tel que le cœur, les os, le cartilage et le cerveau (Harrold, 2004 ; Anubhuti,

2006). Comme l'insuline, la leptine est transportée du plasma au SNC par un mécanisme saturable (Banks et al., 1996), qui implique les récepteurs de la leptine et particulièrement leurs isoformes courtes, présentes sur les cellules endothéliales de la BHE (Anubhuti, 2006). La leptine est impliquée dans plusieurs processus physiologiques comme l'angiogenèse, l'hématopoïèse, le développement des os et du SNC, l'apoptose, la régulation du métabolisme des lipides et du glucose, la reproduction, ainsi que la régulation de l'homéostasie énergétique.

Les récepteurs de la leptine appartiennent à la famille des récepteurs à l'interleukine-6 de la classe 1 des cytokines, qui utilisent la voie de signalisation de transduction Janus kinases-signal transducer and activator of transcription (JAK-STAT). Par épissage alternatif, au moins cinq isoformes (OB-Ra—OB-Re) différentes de ce récepteur sont produites, que l'on divise en trois classes : les isoformes longues (OB-Rb), courtes (OB-Ra, -b, et -c) et secrétées (OB-Re). Le récepteur OB-Rb, qui diffère des autres isoformes par un long domaine intracellulaire, est l'isoforme qui induit les effets de la leptine sur la prise alimentaire et la masse adipeuse (Harrold, 2004 ; Anubhuti, 2006). De fait, les souris diabétiques (*db/db*) sont porteuses de mutations autosomiques récessives pour le gène du récepteur de la leptine (Chua et al., 1996). Ces mutations entraînent la synthèse d'un récepteur tronqué dans les domaines transmembranaire et intracellulaire, sans toutefois affecter la synthèse des autres isoformes (Chen et al., 1996). Par conséquent, les souris *db/db* démontrent un phénotype d'obésité qui est similaire à celui des souris *db^{J3}/db^{J3}*, lesquelles sont déficientes pour toutes les isoformes des récepteurs de la leptine (Kowalski et al., 2001). De plus, l'expression d'un transgène spécifique pour le récepteur OB-Rb chez les souris *db/db* et *db^{J3}/db^{J3}* corrige plusieurs anomalies du phénotype d'obésité de ces souris, dont l'hyperphagie, la diminution des dépenses énergétiques et, par conséquent, l'augmentation de la masse pondérale (Kowalski et al., 2001; Chua et al., 2004).

Le récepteur OB-Rb active au moins deux voies de signalisation intracellulaire pour induire les effets de la leptine : la voie JAK-STAT et la voie IRS-PI3K (Dhillon, 2007). Les souris *db/db* sont incapables de signalisation intracellulaire via la voie JAK-STAT (Lee et al., 1996 ; Vaisse et al., 1996). De plus, chez le rat et la souris sauvage, de même que chez la souris *ob/ob*, l'injection i.v. de leptine induit une

phosphorylation de la protéine STAT3 dans l'hypothalamus médiobasal (Vaisse et al., 1996 ; Niswender et al., 2001). Chez le rat, cette réponse est aussi accompagnée d'une augmentation de l'association de la protéine PI3K avec l'IRS-2 (Niswender et al., 2001). Ces effets ne sont pas observés chez les souris *db/db* par suite de l'injection i.v. de leptine, même à de très forte concentration (Vaisse et al., 1996). Par ailleurs, chez le rat, la co-injection i.c.v. de cilostamide, un inhibiteur de la phosphodiesterase 3 (PDE3), et de la leptine, bloque la phosphorylation de la protéine STAT3 dans l'hypothalamus en plus de bloquer l'effet inhibiteur de la leptine sur la prise alimentaire et l'adiposité (Zhao et al., 2002). Cet effet anorexigène de la leptine sur la prise alimentaire est aussi aboli lors de la co-injection i.c.v. d'inhibiteurs spécifiques de l'activité de la protéine PI3K et de leptine (Niswender et al., 2001).

L'une des fonctions de la leptine est de maintenir l'homéostasie énergétique, au sens de maintenir la stabilité des réserves énergétiques. La leptine exerce cette fonction en ajustant la quantité de nourriture consommée de même que la quantité d'énergie dépensée en fonction des réserves adipeuses. Il s'agit du facteur humoral qui indique le niveau des réserves adipeuse et qui agit selon un mécanisme de rétrocontrôle négatif classique (Ahima et al., 1996). Cette capacité de la leptine est corroborée par plusieurs observations.

Tout d'abord, les concentrations plasmatiques de la leptine sont directement proportionnelles à la quantité des réserves adipeuses (Woods & Seeley, 2000 ; Anubhuti, 2006 ; Dhillon, 2007), particulièrement de la masse adipeuse blanche sous-cutanée (Masuzaki et al., 1995 ; Woods & Seeley, 2000). De fait, les humains et les rongeurs de faible masse pondérale ont un faible niveau plasmatique de leptine, tandis que les humains et les rongeurs de plus forte masse pondérale ont un niveau plasmatique plus élevé de leptine (Maffei et al., 1995). De plus, une diminution de la masse pondérale est associée à une diminution du taux plasmatique de la leptine, tandis que l'effet inverse est observé lors d'une augmentation de la masse pondérale (Maffei et al., 1995). Toutefois, malgré cette étroite corrélation, les concentrations plasmatiques de la leptine fluctuent indépendamment des changements modérés de la masse corporelle. Par exemple, les taux plasmatiques de leptine sont fortement réduits par le jeûne, avant même une perte de poids ; tandis que la prise alimentaire provoque une augmentation retardée de la leptine (Korbonits et al., 1997). Ces

variations aiguës du taux plasmatique de la leptine, non dépendante de l'adiposité démontrent, en partie, l'interaction entre la régulation à court et à long terme de la prise alimentaire ; où la régulation à long terme intervient relativement tôt afin de maintenir l'homéostasie énergétique avant qu'une perte significative des réserves adipeuses ne survienne.

En second lieu, les taux plasmatiques de la leptine ne sont pas rapidement augmentés par la prise d'un repas (Maffei et al., 1995 ; Korbonits et al., 1997 ; Friedman & Hallas, 1988). Par conséquent, contrairement à la CCK, la leptine ne peut pas agir comme facteur humoral qui signale le statut nutritionnel immédiat de l'organisme et induire la sensation de rassasiement et l'arrêt de consommation.

Troisièmement, l'administration chronique de leptine par voie i.p. et/ou i.c.v. induit chez les rongeurs une diminution de la prise alimentaire, une réduction du poids causée principalement par une réduction de la masse adipeuse et une augmentation des dépenses énergétiques (Campfield et al., 1995 ; Halaas et al., 1995 ; 1997 ; Pellemounter et al., 1995 ; Stephens et al., 1995). De plus, chez les animaux à jeun, l'injection i.v. et i.c.v. de leptine, induit aussi une diminution de la prise alimentaire (Campfield et al., 1995) et n'altère pas la perte de poids par suite d'un jeûne (Ahima et al., 1996).

Finalement, l'importance de la leptine comme facteur humoral de régulation de l'homéostasie énergétique est confirmée par les modèles génétiques de rongeurs ayant un défaut du système de signalisation de la leptine. De fait, les souris *ob/ob* de même que les souris *db/db* développent une obésité précoce et massive avec prise alimentaire excessive et une dépense énergétique réduite (Coleman, 1978 ; Robinson et al., 2000). Le traitement des souris *ob/ob* par la leptine, par voie i.c.v. et/ou i.p., corrige l'ensemble de ces anomalies phénotypiques (Campfield et al., 1995 ; Halaas et al., 1995 ; 1997 ; Pellemounter et al., 1995 ; Stephens et al., 1995 ; Weigle et al., 1995). Il est à noter que l'injection de leptine par voie i.c.v. est la plus efficace (Stephens et al., 1995).

Même si les récepteurs OB-Rb sont exprimés dans plusieurs organes périphériques ainsi que dans le SNC, des études génétiques (Cohen et al., 2001) et

de pharmacologie ont démontré que les effets anorexigènes et adipogènes de la leptine sont entièrement médiés via les récepteurs OB-Rb du SNC. Ces récepteurs OB-Rb sont fortement exprimés dans plusieurs régions du SNC incluant la région médiobasale de l'hypothalamus et le tronc cérébral. Dans l'hypothalamus, le récepteur OB-Rb est principalement retrouvé dans les noyaux Arc, DM et VM, mais aussi, en densité plus faible, dans le noyau PV et dans l'aire HL. Le noyau Arc est la région de l'hypothalamus où l'action anorexigène et adipogène de la leptine a été le plus étudié. De fait, l'ablation du noyau Arc perturbe le mécanisme de rétrocontrôle négatif de la leptine. Ce mécanisme est aussi atténué lorsqu'on élimine spécifiquement les récepteurs OB-Rb exprimés par les neurones du noyau Arc qui synthétisent la POMC (Balthasar et al., 2004). Ces souris transgéniques deviennent alors obèses (Balthasar et al., 2004). De plus, il a été démontré que les souris *ob/ob* sont résistantes à l'action anorexigène de l'injection i.c.v. de leptine par suite d'une destruction de ce noyau par le glutamate de monosodium (Takeda et al., 2002). Finalement, chez les rats Koletsky (*fa(k)/fa(k)*), l'homologue des souris *db/db*, la synthèse de récepteur OB-Rb, par thérapie génique, dans le noyau Arc et non dans l'aire HL, atténue le phénotype d'obésité (Morton et al., 2003).

Dans le noyau Arc, la leptine inhibe la prise alimentaire et contrôle la masse pondérale en régulant de façon antagoniste au moins deux populations de neurones : les neurones qui expriment les neuropeptides orexigènes NPY/AgRP et les neurones qui expriment les neuropeptides anorexigènes POMC/CART (Cowley et al., 2001). De fait, il a été démontré que ces deux types de neurones expriment aussi l'ARNm du récepteur OB-Rb (Mercer et al., 1996 ; Cheung et al., 1997 ; Komer et al., 2001). De plus, chez les souris *ob/ob*, *db/db*, chez les rats Zucker (*fa/fa*), ainsi que chez des rongeurs à jeun, il a été observé que l'expression de l'ARNm des gènes *NPY* et *AgRP* est augmentée, tandis que l'expression de l'ARNm du gène *POMC* est diminuée dans le noyau Arc (Stephens et al., 1995 ; Komer et al., 2001). Ces effets sur l'expression de *NPY* et *POMC* dans le noyau Arc sont renversés par l'injection i.p. de leptine (Stephens et al., 1995 ; Schwartz et al., 1997 ; Thornton et al., 1997 ; Mizuno et al., 1998). Il a été aussi démontré que l'injection i.p. de leptine induit l'expression de la protéine c-FOS dans les neurones POMC/CART. Toutefois, l'expression de la protéine c-FOS n'est pas augmentée dans les neurones NPY/AgRP (Elias et al., 1999 ; 2000). De plus, lorsque l'on inactive le gène du *NPY*

chez les souris *ob/ob*, le phénotype d'obésité observé chez ces animaux est fortement atténué en raison d'une réduction de la consommation alimentaire avec diminution de la masse pondérale (Erickson et al., 1996). Ces observations suggèrent fortement que les effets anorexigène et adipogène de la leptine sont médiés via l'inhibition de la synthèse de neuropeptides orexigènes et la stimulation de la synthèse de neuropeptides anorexigènes.

Même si plusieurs données désignent le noyau Arc et ses neurones POMC/CART en particulier comme principale composante de la voie neuronale via laquelle la leptine exerce ces effets sur la prise alimentaire, certaines données démontrent que le noyau Arc n'est pas l'unique région du SNC où cette hormone agit. Les neurones du noyau ARC qui expriment les récepteurs OB-Rb dans le noyau Arc ne représentent que 20% des neurones du SNC qui expriment ce récepteur (Elmqvist et al., 1998). De plus, la délétion des récepteurs OB-Rb des neurones POMC/CART du noyau Arc induit chez ces animaux une obésité modérée, qui ne représente qu'environ 20% du degré d'obésité observé chez les souris *db/db* (Balthasar et al., 2004).

Récemment, il a été démontré que le noyau VM est une autre région hypothalamique sensible à la leptine (Dhillon et al., 2006). De fait, les neurones qui expriment le facteur stéroïdogénique-1 (SF-1), un facteur de transcription exprimé exclusivement dans le noyau VM (Takeda et al., 2002), expriment aussi le récepteur OB-Rb. Dhillon et ses collègues (2006) ont démontré que des souris chez lesquelles le récepteur OB-Rb est supprimé spécifiquement dans les neurones du noyau VM développent une obésité modérée similaire à l'obésité observée chez les souris dont le récepteur OB-Rb est supprimé spécifiquement dans les neurones POMC du noyau Arc. De plus, ces auteurs ont démontré que la perte des récepteurs OB-Rb, à la fois dans les neurones SF-1 et les neurones POMC avait un effet additif sur la masse pondérale. Finalement, ils ont observé que l'augmentation de la masse pondérale n'était pas associée à une augmentation de la prise alimentaire (Dhillon et al., 2006). Ces observations suggèrent fortement que les noyaux Arc et VM médient tous deux les effets adipogènes de la leptine.

Finalement, Grill et ses collègues (2002) ont démontré que les effets anorexigène et adipogène de la leptine peuvent aussi être médiés via le tronc cérébral, particulièrement via le DVC. L'étude de ces auteurs a révélé la présence du récepteur OB-Rb dans plusieurs noyaux du tronc cérébral impliqués dans la régulation et la modulation des fonctions digestives, tels le NTS, le DMV et l'AP. En outre, ces auteurs ont observés que l'injection de leptine directement dans le DVC du rat, induit une diminution de la prise alimentaire et de la masse pondérale. Ils ont finalement noté que les effets anorexigène et adipogène de la leptine par suite de son injection dans le DVC étaient similaires à ceux observés lors de son injection dans le 4^{ième} ventricule et/ou les ventricules latéraux (Grill et al., 2002).

1.2.2.3 Adiponectine

L'adiponectine est un polypeptide de 30 kDa (ou ACRP30 pour adipocyte complement related protein of 30 kDa), sécrété exclusivement par le tissu adipeux blanc et principalement le tissu adipeux blanc viscéral (Scherer et al., 1995). Contrairement à la leptine, l'adiponectine est sécrétée en proportion inverse à la masse adipeuse. Par exemple, les concentrations plasmatiques d'adiponectine sont diminuées chez les animaux et les humains obèses et augmentées lors de la perte de poids (Kadowaki & Yamauchi, 2005).

L'adiponectine est surtout connue comme facteur humoral d'adiposité, qui régule l'homéostasie énergétique via ses actions directes sur les organes périphériques tels les muscles squelettiques et le foie. Ce peptide agit principalement comme régulateur des processus métaboliques induits par l'insuline. L'adiponectine accomplit cette fonction en augmentant la sensibilité des cellules musculaires et hépatiques aux actions de l'insuline (Cancello et al., 2004). De fait, une corrélation entre la résistance à l'insuline et une diminution des concentrations plasmatiques de l'adiponectine a été observée (Kubota et al., 2002; Maeda et al., 2002). De plus, l'administration d'adiponectine diminue le niveau plasmatique de glucose, diminue la néoglucogenèse hépatique et améliore la résistance à l'insuline chez les souris ayant une perturbation du métabolisme du glucose (Fry et al., 2007). Les récepteurs de l'adiponectine, AdipoR1 et AdipoR2, sont exprimés de façon ubiquitaire. Chez les souris *ob/ob* et *db/db*, il a été démontré que l'expression de ces récepteurs est

diminuée dans le foie. Cependant, la restauration de l'expression de l'AdipoR1 ou de l'AdipoR2 dans les hépatocytes des souris *db/db* améliore de façon significative la résistance à l'insuline de même que le diabète de ces animaux (Yamauchi et al., 2007).

Récemment, il a été proposé que l'action de l'adiponectine sur la régulation de l'homéostasie énergétique soit aussi médiée via le SNC. Qi et ses collègues (2004) ont démontré que l'injection i.c.v. d'adiponectine, tout comme l'injection i.p. (Fruebis et al., 2001), induit chez la souris une diminution de la masse pondérale (Qi et al., 2004). Cet effet est causé principalement par une augmentation de la dépense énergétique, c'est-à-dire une augmentation de la consommation d'oxygène et une augmentation de la thermogenèse (Qi et al., 2004). Depuis, plusieurs autres données ont corroboré cette hypothèse. Tout d'abord, l'adiponectine est présente dans le liquide céphalo-rachidien (Qi et al., 2004; Kos et al., 2007). En second lieu, les concentrations d'adiponectine dans le liquide céphalorachidien augmentent par suite de l'injection i.v. d'adiponectine (Qi et al., 2004). Finalement, on a observé la présence de récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 sur les cellules endothéliales de la BHE (Spranger et al., 2006), de l'hypothalamus et de l'AP (Fry et al., 2006). Dans l'hypothalamus, il a été démontré que le récepteur AdipoR1 et le récepteur de la leptine sont co-localisés dans les mêmes neurones du noyau Arc (Kubota et al., 2007). Ces faits suggèrent qu'un système de transport, similaire à celui de l'insuline et/ou de la leptine, est présent dans le SNC donnant à l'adiponectine accès aux régions hypothalamiques impliquées dans l'homéostasie énergétique. Aussi des études électrophysiologique et immunohistochimique ont démontré que l'injection i.c.v. d'adiponectine induit l'expression de protéine c-FOS dans le noyau PV, hyperpolarise les neurones ocytocinergiques du noyau PV (Hoyda et al., 2007) et dépolarise et hyperpolarise les neurones de l'AP (Fry et al., 2006).

Dans le SNC, l'adiponectine semble agir comme facteur humoral orexigène, par conséquent induit la prise de poids en contrôlant à la fois la prise alimentaire et la dépense énergétique (Kubota et al., 2007). Kubota et ses collègues (2007) ont démontré que, contrairement à la leptine, l'injection i.c.v. d'adiponectine stimule la prise alimentaire et diminue la dépense énergétique. Ils ont aussi démontré que les souris dont le gène de l'adiponectine a été inactivé ont une prise alimentaire réduite

et une dépense énergétique plus élevée (Kubota et al., 2007). De façon similaire, la surexpression transgénique d'adiponectine chez les souris *ob/ob* induit une obésité associée à une diminution de la prise alimentaire, de même qu'une diminution de la dépense énergétique (Ahima & Lazar, 2008). L'effet orexigène de l'adiponectine est en accord avec ses variations de la concentration plasmatique présentent et sa concentration dans le liquide céphalorachidien en fonction de l'état alimentaire. Par exemple, la concentration céphalorachidienne d'adiponectine augmente lors d'un jeûne et diminue lors de la prise d'un repas (Kadowaki et al., 2007).

L'adiponectine semble contrôler la prise alimentaire et la dépense énergétique en stimulant la voie intracellulaire de la protéine kinase AMP (AMPK) dans les neurones du noyau Arc (Kubota et al., 2007). Kubota et ses collègues (2007) ont démontré que l'expression du récepteur AdipoR1 est augmentée lors d'un jeûne et diminuée lors de la prise alimentaire dans le noyau Arc. De plus, ils ont démontré que l'administration i.v. et i.c.v. d'adiponectine augmente l'activité de la protéine AMPK via les récepteurs AdipoR1 localisés dans le noyau Arc qui, par conséquent, stimule la prise alimentaire et diminue la dépense énergétique. Des effets inverses sont observés chez les souris knock-out pour le gène de l'*adiponectine* (Kubota et al., 2007).

1.2.3 Interaction : contrôle à court et à long terme

Même si à cette double régulation de court et long termes correspondent visiblement des structures neuro-anatomiques ainsi que des signaux humoraux distincts, et même si chacune de ces régulations à la capacité de réguler la prise alimentaire de manière indépendante, une interaction entre la régulation à court et à long termes est requise afin de générer une réponse alimentaire permettant le maintien de la stabilité pondérale. L'existence d'une telle interaction est démontrée par plusieurs études pharmacologiques, physiologiques et immunohistochimiques.

Dans un premier temps, il a été démontré que l'insuline de même que la leptine agissent de façon synergique avec la CCK pour réduire la prise alimentaire et la masse pondérale (Figlewicz et al., 1986; 1995; Barrachina et al., 1997; Matson et al., 1997; Edmond et al., 1999). Aussi, une co-injection, c'est-à-dire l'injection i.p. de

CCK suivie d'une injection i.p. et/ou i.c.v. d'insuline ou de leptine, s'avère plus efficace à diminuer la taille d'un repas que l'injection isolée de l'un ou l'autre de ces peptides. De plus, il a été démontré que l'effet satiétogène est maintenu durant les sept heures suivant la co-injection de leptine et de CCK, comparativement à 30 minutes lors de l'injection i.p. de CCK seulement (Barrachina et al., 1997). Ce phénomène de synergie est aussi observé entre l'injection i.c.v. de leptine et les signaux nerveux mécaniques et chimiques transmis par le nerf vague (X), lors de la prise alimentaire. En effet, l'injection i.c.v. de leptine augmente la sensibilité de l'animal à ces signaux nerveux.

En second lieu, des études de marquage de la protéine c-FOS ont montré que l'injection i.c.v. de leptine induit l'expression de cette protéine dans le noyau PV (Van Dijk et al., 1996). De façon similaire, l'injection i.p. de CCK active la protéine c-FOS dans le NTS (Li & Rowland, 1995; Wang et al., 1998b ; Edmond et al., 1999), ainsi que dans le noyau PV (Li & Rowland, 1995; Barrachina et al., 1997; Wang et al., 1998b; Edmond et al., 1999). En co-injectant ces deux peptides, l'expression de c-FOS est encore plus augmentée dans le noyau PV (Barrachina et al., 1997 ; Wang et al., 1998b ; Edmond et al., 1999) et le NTS (Edmond et al., 1999). Ces observations démontrent que la leptine et la CCK activent des voies neuronales de la prise alimentaire qui se chevauchent au moins dans deux noyaux: le noyau PV et le NTS. Ceci est corroboré par des données électrophysiologiques. La stimulation électrique du noyau PV module l'activité électrique des neurones du DVC qui sont sensibles aux signaux provenant du système digestif (Nishimura & Oomura, 1987; Zhang et al., 1999). L'aire HL semble aussi jouer un rôle dans la modulation de l'activité des neurones du tronc cérébral qui sont sensibles aux signaux périphériques satiétogènes. De fait, les neurones du tronc cérébral sont activés lors d'une stimulation électrique dans l'aire HL (Nishimura & Oomura, 1987). Toutefois, jusqu'à présent, aucune étude n'a démontré que la leptine et la CCK avaient un effet inhibiteur sur les neurones de l'aire HL. Par conséquent, les observations suggèrent que l'interaction entre le contrôle à court et à long termes implique le noyau PV, l'aire HL et le tronc cérébral, et que la réponse des neurones du tronc cérébral, à la suite d'une prise alimentaire peut être modulée par les projections axonales qui proviennent du noyau PV et/ou de l'aire HL.

Ces travaux ont permis de faire l'ébauche d'un modèle d'interaction entre le système de contrôle de la prise alimentaire à court et à long termes. Ce modèle propose que l'intégration des signaux qui régulent la prise alimentaire à court et à long termes implique des voies neuronales reliant l'hypothalamus et le tronc cérébral, en particulier les voies : noyau Arc ↔ noyau PV ↔ DVC et noyau Arc ↔ aire HL ↔ DVC. Le noyau Arc agit comme capteur de l'information. Le noyau PV, l'aire HL et le DVC agissent comme intégrateurs des signaux, grâce à leurs projections bidirectionnelles, afférentes et efférentes. Le noyau PV et l'aire HL sont afferentées par et se projettent sur le noyau Arc et le DVC ; tandis que le DVC est afferenté par et se projette sur le système digestif, le noyau PV et l'aire HL. Les connexions réciproques entre le noyau PV et le DVC, de même qu'entre l'aire HL et le DVC, transmettent à la fois de l'information au sujet du statut pondéral et de l'information sur l'état nutritionnel immédiat de l'organisme. Ceci permet aux circuits neuronaux hypothalamiques sensibles aux signaux humoraux adipeux de moduler l'activité des circuits neuronaux du tronc cérébral, lesquels induisent les phénomènes de rassasiement et de satiété. (voir figure 5)

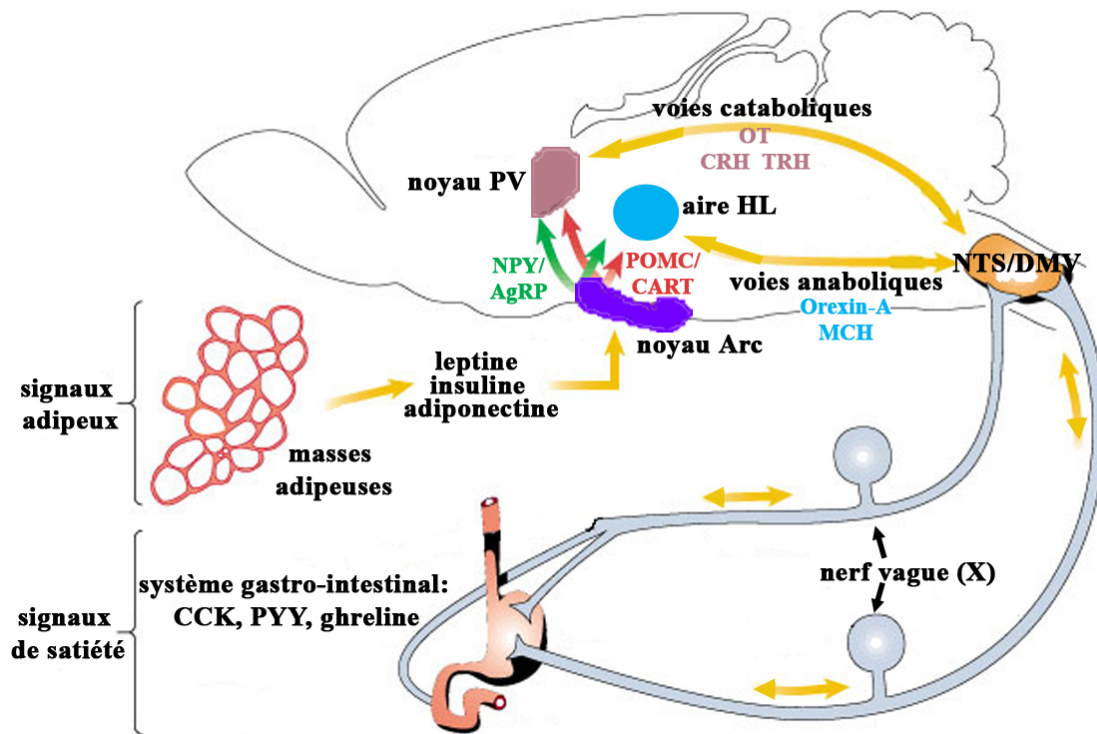


Figure 5. Modèle neuro-anatomique de l'interaction entre les systèmes effecteurs de la prise alimentaire. Par exemple, la leptine, sécrétée par les cellules adipeuses, stimule la voie neuronale hypothalamique catabolique (neurones exprimant POMC/CART) et inhibe la voie neuronale hypothalamique anabolique (neurones exprimant NPY/AgRP) issues du noyau Arc. Ces voies neuronales se projettent sur le noyau PV et l'aire HL, lesquels envoient et reçoivent des projections neuronales du NTS/DMV, où les signaux de satiété sont interprétés. Les signaux de satiété, tel la CCK, sont transmis par le nerf vague (X) au NTS. Le NTS agit comme « centre intégrateur », c'est-à-dire qui intègre les informations afférentes du nerf vague (X) aux informations provenant des voies neuronales hypothalamiques. Le résultat final est, par conséquent, l'arrêt de consommation du repas. *CCK* cholécystokinine, *MCH* neurohormone mélanine, *PYY* peptide YY. Adapté de Schwartz et al., 2000.

1.3 Systèmes effecteurs de la prise alimentaire et neuromédiateurs

La figure 5 illustre les différents circuits neuronaux qui contrôlent la prise alimentaire à court et long termes ainsi que les régions où agissent les divers signaux humoraux qui informent du statut nutritionnel immédiat et du niveau d'adiposité de l'organisme. Récemment, il a été démontré que le mécanisme par lequel ces facteurs humoraux régulent la prise alimentaire revient à moduler, de manière réciproque, deux voies neuronales hypothalamiques : la voie neuronale catabolique (noyau Arc ↔ noyau PV) et la voie neuronale anabolique (noyau Arc ↔ aire HL) (McMinn et al., 2000 ; Schwartz et al., 2003). L'activation de ces circuits stimule la synthèse et la sécrétion de neuromédiateurs dont l'action est soit d'augmenter la prise alimentaire tout en réduisant les dépenses énergétiques (voie anabolique) soit d'induire les effets inverses (voie catabolique).

1.3.1 Système hypothalamique anabolique

Comme le spécifie son appellation, le système hypothalamique anabolique a pour fonction d'augmenter la prise alimentaire et de réduire la dépense énergétique, et par conséquent d'accroître les réserves énergétiques principalement sous forme de tissus adipeux. Ce système accomplit sa fonction par l'intermédiaire d'au moins quatre neuromédiateurs : le NPY, l'AgRP, l'Orexine-A et le MCH. Le NPY et l'AgRP sont synthétisés par la même population de neurones du noyau Arc, tandis que l'Orexine-A et le MCH sont synthétisés dans deux populations différentes de neurones de l'aire HL.

1.3.2 Système hypothalamique catabolique

Contrairement au système hypothalamique anabolique, le système hypothalamique catabolique diminue la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique. Par conséquent, ce système diminue les réserves énergétiques en réduisant la masse des tissus adipeux. Le système hypothalamique catabolique est aussi connu sous l'appellation de voie de la mélanocortine et son neuromédiateur principal est l' α -MSH qui est synthétisée principalement, mais non exclusivement, dans le noyau Arc, par clivage de la protéine précurseur POMC. Cependant, le

peptide CART est aussi synthétisé dans cette même population de neurones du noyau Arc et agit aussi comme neuromédiateur catabolique. Les autres neuromédiateurs de la voie hypothalamique catabolique sont l'OT, la CRH et la TRH, qui sont synthétisés dans le noyau PV.

1.3.3 Interaction : système anabolique et catabolique

L'équilibre entre l'action de la voie anabolique et l'action de la voie catabolique détermine les comportements alimentaires de l'animal et de l'humain et par conséquent la masse pondérale. Quels sont donc les mécanismes d'action et d'interaction entre ces deux systèmes ?

À certains égards, ces deux systèmes agissent de façon indépendante. Comme l'illustre la figure 5, l'insuline et la leptine stimulent la voie catabolique (les neurones POMC/CART) tout en inhibant la voie anabolique et notamment les neurones NPY/AgRP localisés dans le noyau Arc (Schwartz et al., 2003). Ces effets augmentent et diminuent respectivement la production et la sécrétion des peptides POMC/CART et NPY/AgRP dans le noyau PV et dans l'aire HL. Dans ces régions hypothalamiques, ces peptides anorexigènes et orexigènes interagissent avec leurs récepteurs respectifs, induisant, à leur tour la synthèse d'autres neuromédiateurs anorexigènes, tels que l'OT, la CRH et la TRH et orexigènes, tels que l'orexine-A et la MCH. Ceci a comme effet physiologique de réduire la prise alimentaire. L'effet inverse est observé lorsque les niveaux d'insuline et de leptine sont diminués, par exemple chez les souris *ob/ob*, *db/db*, les rats Zuckers (*fa/fa*), ou lors d'un jeûne.

Par ailleurs, ces deux systèmes agissent de façon compétitive le long de la voie de la mélanocortine. En effet, une interaction compétitive entre les neurones NPY/AgRP et les neurones POMC/CART, a été proposée, qui met en jeu le récepteur MC4R exprimé principalement dans le noyau PV ainsi que deux de ses ligands physiologiques, l' α -MSH et l'AgRP. L' α -MSH est un ligand agoniste du récepteur MC4R et se comporte comme un inhibiteur de la prise alimentaire. Par contre, l'AgRP est un antagoniste naturel de ce récepteur et stimule puissamment la prise alimentaire; il s'agit donc d'un facteur dynamique qui bloque l'action anorexigène de l' α -MSH (Ollmann et al., 1997). De façon attendue, l' α -MSH et

l'AgRP sont régulées de façon opposée par la leptine, l'insuline, le jeûne et la prise alimentaire. L'importance de ce mécanisme de régulation de la voie de la mélanocortine, dans la régulation de la prise alimentaire est illustrée par le fait que l'inactivation du gène du récepteur *MC4R* (Huszar et al., 1997) et du gène *POMC* (Yaswer et al., 1999), ainsi que la surexpression transgénique de l'AgRP (Graham et al., 1997), provoquent une augmentation de la prise alimentaire et une obésité sévère chez la souris. De plus, des mutations du récepteur MC4R ont été décrites chez l'homme, qui représente la forme d'obésité monogénique à plus haute prévalence. De fait, 3 à 5% des cas d'obésité précoce et massive sont associés à des mutations dans le gène *MC4R*. Les individus porteurs de ces mutations sont hyperphagiques, hyper insulinémiques, ont une croissance linéaire accrue et sont résistants à la leptine et à l'insuline (Farooqi et al., 2000 ; Vaisse et al., 2000).

Finalement, ces deux systèmes agissent de façon régulatrice. En effet, en plus de leurs projections au noyau PV et à l'aire HL, il a été démontré que les neurones NPY/AgRP forment aussi des contacts synaptiques sur les corps cellulaires et les dendrites des neurones POMC/CART du noyau Arc. De plus, il a été observé que le récepteur Y1 du NPY, qui est couplé à une protéine G inhibitrice, est exprimé sur les neurones POMC/CART du noyau Arc. Ces données morphologiques et immunohistochimiques suggèrent fortement que le NPY exerce une action inhibitrice sur la voie catabolique mélanocortinergique.

2. Dépense énergétique

Contrairement à la prise alimentaire, la dépense énergétique a reçu très peu d'attention malgré le fait qu'elle représente un paramètre critique de la balance énergétique. De fait, chez le rongeur, une régulation de la dépense énergétique est exercée par le système nerveux autonome sympathique (SNS) sur la thermogenèse des tissus adipeux brun (TBA). Cependant, l'absence de TAB chez l'humain porte à disqualifier la dépense énergétique comme paramètre important de l'équilibre énergétique. Toutefois, chez l'humain, il est possible que le SNS régule la dépense énergétique via d'autres systèmes physiologiques et que ce contrôle soit davantage d'ordre motivationnel (Cabanac, 2006).

La dépense énergétique peut être décrite en trois composantes : le métabolisme de base (qui correspond à l'ensemble des processus biochimiques nécessaires au maintien de la vie), l'activité physique (qui correspond aux mouvements) et la thermogenèse adaptative (Spiegelman & Flier, 2001).

L'activité physique a un impact important sur l'équilibre énergétique, particulièrement chez l'humain. L'activité physique peut être volontaire ou spontanée. L'activité physique spontanée fait référence à la thermogenèse induite par des exercices involontaires tel que la contraction spontanée des muscles, le maintien de la posture, s'asseoir, se lever, parler et marcher (Levine et al., 1999; Levine, 2004). Il a été démontré que ces exercices involontaires contribuent de façon significative à la dépense énergétique chez l'humain (Levine et al., 1999). Chez le rongeur, la contribution de l'activité physique à la dépense énergétique est plus difficile à mesurer. Les variations d'activité physique sont souvent, pour ne pas dire toujours, accompagnées d'activation de la thermogenèse dans le TAB (Richard, 2007).

La thermogenèse adaptative fait référence à la dissipation d'énergie sous forme de chaleur en réponse à des modifications de l'environnement tel que le froid ou des changements de la quantité de nourriture ingérée («thermogenèse induite par l'alimentation») (Flier, 2004). La thermogenèse adaptative a été bien étudiée chez le rongeur où elle a lieu dans le TAB et possiblement dans le muscle. Le TAB peut cependant être considéré comme l'organe clé de la thermogenèse (Cannon &

Nedergaard, 2004). En effet, il existe chez les mammifères deux types de tissu adipeux :

- le tissu adipeux blanc, majoritaire, dont la fonction est de stocker l'énergie sous forme de triglycérides et de libérer les acides gras en fonction des besoins énergétiques de l'organisme. Ce tissu est aussi le lieu de production de nombreuses hormones et peptides impliqués dans la prise alimentaire tel la leptine et l'adiponectine.
- le tissu adipeux brun, très riche en mitochondries et grandement innervé par le SNS, qui est un organe d'oxydation et de thermogénèse (Cannon & Nedergaard, 2004). Alors que, dans la plupart des cellules, une grande partie de l'énergie des substrats est conservée sous forme d'ATP, les adipocytes bruns dissipent cette énergie sous forme de chaleur.

La capacité thermogénique unique du TAB est due à une protéine membranaire mitochondriale spécifiquement exprimée dans ce tissu, nommée uncoupling protein 1 (UCP1) (Giacobino, 2002; Cannon & Nedergaard, 2004; Dulloo et al., 2004; Richard, 2007). La présence et l'activation d'UCP1 empêchent les mitochondries de convertir l'énergie de la respiration en ATP, et induit, par conséquent, un découplage respiratoire thermogénique. La stimulation de la thermogénèse dans le TAB par le SNS est médiée par les récepteurs β adrénergiques et conduit à l'activation et l'augmentation de l'expression d'UCP1 (Lowell & Bachman, 2003; Cannon & Nedergaard, 2004; Dulloo et al., 2004). Chez les rongeurs, le rôle crucial du SNS dans la régulation de la thermogénèse adaptative a été clairement démontré en utilisant des souris chez lesquelles les gènes des récepteurs β adrénergiques 1,2 et 3 ont été invalidés (souris «betaless») (Bachman et al., 2002). Soumises à une diète riche en gras, ces souris développent une obésité sévère malgré l'ingestion d'un nombre de calories identique aux souris sauvages. En fait, ces souris sont incapables d'augmenter leur dépense énergétique en réponse à l'alimentation (Bachman et al., 2002).

L'activation de l'UCP1 par le SNS est modulée par les réserves énergétiques (Géloën & Trayhurn, 1990a; 1990b; Scarpaga et al., 1997; Commins et al., 1999) ainsi que le statut nutritionnel (Leblanc et al., 1986; Stock & Rothwell, 1986). Les neurones pré-ganglionnaires du SNS, qui contrôlent l'activité de l'UCP1, sont régulés par le SNC. Les régions du SNC qui contrôlent l'homéostasie énergétique sont

modulées par les facteurs nutritionnels, endocriniens (ex : l'insuline) et adipeux (ex : leptine). Par conséquent, l'activité de l'UCP1 varie selon les changements énergétiques (Géloën & Trayhurn, 1990a; 1990b; Scarpaga et al., 1997; Commins et al., 1999; Asensio et al., 2008). De plus, en période de jeûne, l'activation de l'UCP1 est réduite tandis que l'effet inverse est observé lors de la prise alimentaire (Leblanc et al., 1986; Stock & Rothwell, 1986). Finalement, le manque d'énergie réduit la thermogénèse (Richard, 2007).

Récemment, plusieurs protéines découplantes homologues à l'UCP1 ont été identifiées (UCP2, UCP3, UCP4 et UCP5) (Ricquier & Bouillaud, 2000; Giacobino, 2002; Erlanson-Albertsson, 2003). Alors que l'UCP1 est exclusivement exprimée dans le TAB, UCP2 a une large distribution. UCP3 est principalement exprimée dans le muscle squelettique et UCP4 et 5 sont spécifiques au cerveau. Le rôle de ces homologues dans l'homéostasie énergétique reste à clarifier.

Chez l'humain, il est de plus en plus certain que de subtiles variations de la thermogénèse peuvent, à long terme, jouer un rôle important dans le développement de l'obésité (Dulloo et al., 2004). Cependant, la contribution du SNS à ces variations reste à être clairement établie, et les organes où la thermogénèse aurait lieu restent à identifier. Chez l'humain, le rôle du TAB dans la thermogénèse est moins évident que chez le rongeur. Toutefois, plusieurs études de tomographie par émission de positrons ont démontré la présence de quantités significatives de TAB chez le nouveau-nés (Cannon & Nedergaard, 2004) de même que chez l'homme adulte (Nedergaard et al., 2007). De plus, des données récentes indiquent que la consommation de glucose par les TAB, donc possiblement la thermogénèse, serait sous le contrôle du SNS (Nedergaard et al., 2007). Ceci pourrait être particulièrement important chez les sujets obèses.

2.1 Neuro-anatomie de la dépense énergétique

Comme nous l'avons vu, le maintien de l'homéostasie énergétique implique une coordination entre l'ingestion de calories et la dépense énergétique, coordination qui est orchestrée par des circuits neuronaux localisés dans l'hypothalamus, le tronc cérébral et la moelle épinière. Le SNC régule la dépense énergétique principalement

par le biais du SNS. Alors que le rôle du SNS dans le contrôle de la dépense énergétique est bien établi, celui de l'hypothalamus n'a été constaté que dans les années 1980. Shimazu & Takahashi (1980) ainsi que Pekins et ses collègues (1981) ont démontré que des stimulations électriques de faible amplitude dans la région de l'hypothalamus ventromédian induisent l'activation de la thermogenèse et de la lipogenèse dans le TAB (Shimazu & Takahashi, 1980; Pekin et al., 1981). Ces observations ont été corroborées par des études indiquant que de telles lésions de l'hypothalamus ventromédian en plus de produire une hyperphagie et une obésité (Hetherington & Ranson, 1940) induisent aussi une réduction de l'activité du SNS et une diminution de la thermogenèse dans le TAB (Nijima et al., 1984; Vander Tuig et al., 1982; Sakaguchi et al., 1988). À l'opposé, des lésions de l'aire HL induisent une hypophagie (Anand & Brobeck, 1951) et une augmentation de l'activité du SNS (Yoshida et al., 1983).

Les noyaux hypothalamiques qui contrôlent la dépense énergétique ont été identifiés par divers techniques incluant le marquage transneuronal rétrograde à l'aide du virus pseudorabies (VPR) (Bamshad et al., 1999; Oldfield et al., 2002). Des techniques mesurant les changements morphologiques et métaboliques du TAB par suite de stimulations et/ou de lésions de la région hypothalamique ventromédiale ont également été utilisées (Freeman & Wellman, 1987; Sakaguchi et al., 1988). Chez le hamster Sibérien et chez le rat, les données obtenues, par suite des marquages rétrogrades indiquent que l'innervation du TAB par l'hypothalamus est transneuronale (Bamshad et al., 1999; Oldfield et al., 2002).

Dans la moelle épinière, les neurones pré-ganglionnaires sont localisés principalement, mais non exclusivement, dans les cornes intermédiolaterales des segments thoraciques 3 et 4 (Morrison, 2004). Dans le tronc cérébral, les régions marquées incluent la formation réticulaire, le noyau raphé caudal, la région norépinéphrinergique A5 ainsi que le NTS. Finalement, dans l'hypothalamus le marquage interesse les noyaux Arc, PV, VM, suprachiasmatique, l'aire HL et la région pré-optique médiane. La figure 6 présente un schéma des circuits neuronaux qui relie l'hypothalamus au TAB.

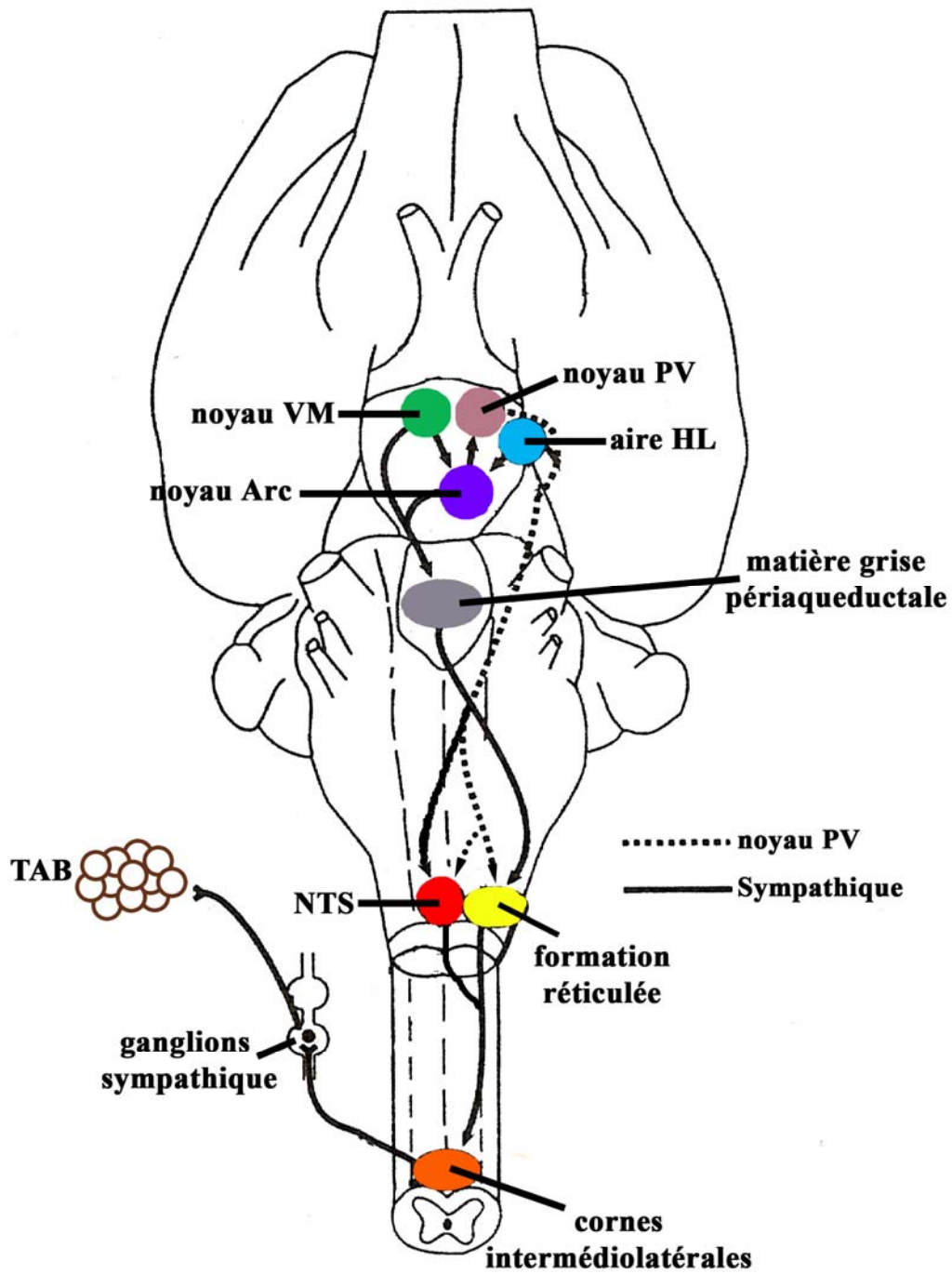


Figure 6. Représentation schématique des circuits neuronaux qui relie l'hypothalamus au TAB. TAB tissu adipeux brun.

L'implication fonctionnelle du noyau Arc ainsi que de l'aire HL dans le contrôle de la dépense énergétique a été démontrée par des études de stimulation et de lésion (Yoshida et al., 1983; Arase et al., 1987; Oldfield et al., 2007). Cependant, plusieurs observations sont venues infirmer l'implication fonctionnelle du noyau PV en ce qui a trait à la dépense énergétique. Ces études ont d'abord démontré que des lésions (Sakaguchi et al., 1988) et/ou l'injection de glucose ou d'insuline (Sakaguchi & Bray, 1988) dans le noyau PV n'affectaient pas l'activité électrique des neurones post-ganglionnaires du SNS qui innervent le TAB. Ces observations ont été corroborées dans les modèles animaux d'obésité induite par suite de lésions partielles et/ou complètes du noyau PV. Les rats et les chiens avec lésion du noyau PV ne présentent aucune dysfonction du système nerveux autonome sympathique et parasympathique, aucune dysfonction du système circadien et leur niveau d'activité physique est normal (Heinbecker et al., 1944 ; Leibowitz et al., 1981 ; Cox & Powley, 1981 ; Aravich & Sclafani, 1983). Un protocole expérimental faisant appel au paradigme des apports caloriques pairés, a permis de constater que l'hyperphagie est la cause principale, sinon l'unique cause de l'obésité présentée par ces animaux (Cox & Powley, 1981; Tokunaga et al., 1986 ; 1990 ; Fukushima et al., 1987). Finalement, Balthasar et ses collègues (2005) ont récemment généré une souris conditionnelle nulle pour l'allèle du gène du récepteur *MC4R* (*loxTB MC4R*) (Balthasar et al., 2005). Les souris homozygotes n'expriment pas le récepteur *MC4R* et sont sévèrement obèses. Ces auteurs ont démontré que la réactivation de l'expression de ce récepteur spécifiquement dans le noyau PV, ainsi que dans une sous population de neurones de l'amygdale diminue la prise alimentaire mais n'induit aucun effet sur la dépense énergétique (Balthasar et al., 2005). Ces observations renforcent l'hypothèse voulant que le noyau PV ne soit pas impliqué dans le contrôle de la dépense énergétique.

2.2 Systèmes effecteurs de la dépense énergétique et neuromédiateurs

Les systèmes effecteurs et les neuromédiateurs impliqués dans le contrôle de la dépense énergétique sont les mêmes que ceux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire, c'est-à-dire les systèmes hypothalamiques anabolique et catabolique.

2.2.1 Système hypothalamique anabolique

Le système hypothalamique anabolique semble dépendre principalement de l'aire HL et de la MCH comme principal neuromédiateur. Tout d'abord, un lien neuro-anatomique a été observé entre le TAB et les neurones mélaninergiques de l'aire HL. Par des techniques de marquage transneuronal rétrograde combinées à l'immunohistochimie, une co-localisation du traceur transneuronal VPR, injecté dans le TAB, et de la MCH a été observée dans les neurones de l'aire HL (Oldfield et al., 2002; 2007). En second lieu, il a été démontré que l'injection i.c.v. de MCH diminue l'expression de l'ARNm de l'UCP1 (Ito et al., 2003). De façon inverse, l'expression de cette protéine est augmentée dans le TAB chez les souris invalides pour le gène *MCH*, souris *MCH*^{-/-} (Segal-Lieberman et al., 2003). Des études de génétique suggèrent aussi un rôle important de MCH en tant qu'effecteur anabolique de la dépense énergétique (Segal-Lieberman et al., 2003; Kokkotou et al., 2005). En effet, chez les souris *ob/ob* surexprimant la MCH l'invalidation du gène de la *MCH* entraîne une diminution importante de la masse adipeuse et une augmentation de la dépense énergétique, sans réduction de la prise alimentaire (Segal-Lieberman et al., 2003). Même si elles sont hyperphagiques les souris *MCH*^{-/-} ont une dépense énergétique élevée et sont minces (Kokkotou et al., 2005).

2.2.2 Système hypothalamique catabolique

Le système hypothalamique catabolique intervient aussi dans le contrôle de la dépense énergétique. Il dépend principalement, mais pas exclusivement, du noyau Arc et implique la voie de la mélanocortine. Ceci est corroboré par des études de caractérisation neurochimique des projections neuronales poly-synaptiques qui relient l'hypothalamus au TAB. Il a été démontré que les neurones du noyau Arc qui se projettent sur les neurones pré-ganglionnaires du SNS expriment le récepteur de la leptine ainsi que la POMC (Oldfield et al., 2002). De plus, l'injection chronique i.c.v. de l'AgRP chez le rongeur diminue l'expression de l'ARNm de l'UCP1 dans le TAB, la consommation d'oxygène et la température dans ce tissu, ainsi que l'activité des neurones post-ganglionnaire du SNS qui innervent le TAB (Small et al., 2001; Yasuda et al., 2004). Des effets inverse sur l'expression de l'ARNm de l'UCP1 dans le TAB, sur la thermogenèse du TAB, ainsi que sur l'activité des neurones post-ganglionnaires du SNS qui innervent le TAB ont été observé par suite de l'injection

chronique i.c.v. de α -MSH et/ou de MTII, un agoniste du récepteur MC4R (Cettour-Rose & Rohner-Jeanrenaud, 2002; Yasuda et al., 2004).

LES GÈNES SINGLE-MINDED

1. Définition générale

Les gènes *single-minded* (*SIM*) codent pour des protéines (*SIM*) appartenant à la famille des facteurs de transcription bHLH-PAS (Nambu et al., 1991). Cette famille de facteurs de transcription est caractérisée par trois domaines distincts : le domaine basique (b), le domaine Hélice-Boucle-Hélice (HLH de l'anglais Helix-Loop-Helix) et les domaines PAS, PAS-1 et PAS-2 (nommés ainsi pour les premières protéines dans lesquelles ce motif a été identifié : PER, ARNT et SIM) (Moffett et al., 1996 ; Moffet & Pelletier, 2000). Le domaine basique, situé dans la partie N-terminale de l'acide aminé, est nécessaire pour la liaison à l'ADN. Le domaine HLH est lui aussi situé du côté N-terminal entre le domaine basique et les régions PAS. De concert avec les régions PAS, le domaine HLH forme une interface de dimérisation. Toutefois, les domaines PAS sont aussi capables de liaison et d'interaction avec d'autres petites molécules et protéines indépendamment du domaine bHLH (Huang et al., 1993 ; Moffett et al., 1996). Finalement, la région C-terminale contenant les domaines bHLH-PAS possède généralement une activité transcriptionnelle de répression ou d'activation. Dans le cas des protéines *SIM*, il a été démontré dans un système in vitro que l'activité transcriptionnelle de la région C-terminal est répressive. Entre autres, dans des essais de transfection cellulaire, *SIM* bloque l'activité transcriptionnelle de l'un de ses partenaires de dimérisation, Ah receptor nuclear translocation (*ARNT*), une protéine appartenant aussi à la famille des facteurs de transcription bHLH-PAS (Ema et al., 1996a ; Moffett et al., 1997). La fonction transcriptionnelle des *SIM* requiert une hétérodimérisation avec d'autres protéines de la famille des facteurs de transcription bHLH-PAS. Plusieurs protéines bHLH-PAS sont présentement connues et peuvent agir comme partenaires de dimérisation tel que : *ARNT1* (Hoffman et al., 1991), *ARNT2* (Hirose et al., 1996), *BMAL1* (Hogenesch et al., 1997) et *BMAL2* (Hogenesch et al., 2000).

Le gène *Sim* a été tout d'abord identifié chez la drosophile et par la suite chez la souris ainsi que chez l'humain.

Chez la drosophile, *Sim* est exprimé dans les cellules de la ligne médiane du SNC et joue un rôle primordial dans le développement de ces cellules. En effet, les

cellules de la ligne médiane du SNC de la drosophile ne se développent pas chez la drosophile mutante pour le gène *Sim*. De plus, l'expression ectopique de ce gène dans les cellules latérales du SNC de la drosophile change la destinée de ces cellules. Ces dernières acquièrent une morphologie cellulaire ainsi qu'un patron d'expression génique typique des cellules de la ligne médiane (Nambu et al., 1991).

Chez la souris de même que chez l'humain, deux gènes homologues du gène *Sim* de la drosophile ont été identifiés et nommés : *Sim1* et *Sim2*. Le gène *Sim1* est localisé sur le chromosome 10 chez la souris et sur le chromosome 6 chez l'humain (Fan et al., 1996 ; Chrast et al., 1997). Les deux gènes *Sim1* sont à 96% identiques pour ce qui est de leur séquence en acides aminés (Chrast et al., 1997). Les deux gènes *Sim2* sont localisés sur les chromosomes 16 et 21, respectivement chez la souris et chez l'humain (Ema et al., 1996b ; Fan et al., 1996 ; Chrast et al., 1997). Les deux gènes *Sim2* sont à 90% identiques pour ce qui est de leur séquence en acides aminés (Chrast et al., 1997). Le gène *Sim1* code pour un polypeptide de 765 acides aminés ayant une masse moléculaire de 87 kDa, tandis que le gène *Sim2* code pour un polypeptide de 657 acides aminés ayant une masse moléculaire de 75 kDa (Ema et al., 1996b ; Yamaki et al., 1996). La grande homologie de séquence entre SIM1 et SIM2 chez l'humain et avec leurs homologues chez la souris suggère une même fonction pour ces deux gènes.

Durant l'embryogenèse, *Sim1* est exprimé tout au long de la somitogenèse, de la néphrogenèse et de la neurogenèse (Fan et al., 1996). Durant la neurogenèse, l'expression de *Sim1* est limitée à certaines régions du SNC en développement. Ces régions sont : la parite ventrolatérale du mésencéphale rostral et du tube neural caudal, la zona limitans du thalamus, le noyau du tractus olfactif latéral (NLOT) et l'hypothalamus antérieur (Fan et al., 1996 ; Chrast et al., 1997). Dans l'hypothalamus, l'expression de *Sim1* est prédominante dans les noyaux PV, supra-optique (SO) et les corps mamillaires (Michaud et al., 1998). Chez la souris adulte, *Sim1* est exprimé dans les reins, certains muscles squelettiques ainsi que dans les noyaux PV, SO, certains neurones de l'aire HL et l'amygdala basomédiale (Chrast et al., 1997 ; Nilaweera et al., 2002 ; Holder et al., 2004). Pour sa part, durant l'embryogenèse, *Sim2* est exprimé de façon prédominante dans la région ventrolatérale du diencephale, dans les muscles des membres, ainsi que dans de

nombreux cartilages primordiaux et particulièrement ceux des vertèbres, des côtes, des poumons, des reins et de certaines structures cranio-faciales (Ema et al., 1996b ; Chrast et al., 1997 ; Yamaki et al., 1996 ; Moffett & Pelletier, 2000). Chez la souris adulte, *Sim2* est exprimé dans certains muscles squelettiques, les reins et les poumons (Chrast et al., 1997).

2. LES FONCTIONS DU GÈNE *Sim1*

2.1 *Sim1* et le développement

Chez les mammifères, *Sim1* semble jouer un rôle spécifique dans le développement du SNC. Les défauts anatomiques identifiés jusqu'à présent chez les souris invalide pour le gène *Sim1* sont l'absence complète de neurones dans les noyaux PV et SO, l'absence de neurones exprimant la SS dans le noyau périventriculaire antérieur de l'hypothalamus (aPV), une région continue avec le noyau PV (Michaud et al., 1998) ainsi qu'une diminution des projections axonales mammillo-thalamique (MTT) et mammillo-tegmentale (MTEG) (Marion et al., 2005).

2.1.1 Développement des noyaux aPV, PV et SO

Le gène *Sim1* est exprimé dans tous les neurones des noyaux PV et SO, ainsi que dans une sous population de neurones du noyau aPV. Des études de perte de fonction chez la souris ont démontré que *Sim1* est requis pour le développement de tous les neurones des noyaux PV, SO et aPV qui produisent la VP, l'OT, la TRH, la CRH et la SS. Michaud et al. (1998) ont démontré que *Sim1* agit pour contrôler les étapes tardives du développement de ces cellules, c'est-à-dire l'étape de la différenciation cellulaire. En effet, ces auteurs ont constaté que *Sim1* est exprimé dans les cellules des noyaux PV, SO et aPV aussitôt qu'elles quittent le cycle cellulaire et migrent dans la couche du manteau. Chez l'embryon homozygote pour un allèle nul de *Sim1*, *Sim1*^{-/-}, ces cellules sont générées, expriment le transcrit mutant de *Sim1* et survivent au moins jusqu'au quatorzième jour du développement (E14.0). Toutefois, vers E14.0-E15.0, elles cessent d'exprimer le transcrit mutant de *Sim1* et, par conséquent, ne terminent pas leur différenciation (Michaud et al., 1998). La destinée de ces cellules n'a pas encore été élucidée. Toutefois, récemment, Caqueret et al. (2006) ont démontré à l'aide de techniques d'immunohistochimie, que le nombre de cellules générées dans l'hypothalamus antérieur des embryons *Sim1*^{-/-}

est réduit de 30%. Ils ont aussi constaté, par l'essai de TUNNEL, que cette diminution n'était pas causée par une augmentation d'apoptose dans l'hypothalamus antérieur l'embryon. Cependant, ces mêmes auteurs ont observé l'expression du transcrit *Sim1^{lacZ}*, un allèle mutant du gène *Sim1*, généré par introduction d'un gène de fusion tau-lacZ dans l'exon 1 du gène *Sim1*, dans une région du SNC située entre le troisième ventricule et la surface du cerveau (Caqueret et al., 2006). Ceci suggère qu'en l'absence du gène *Sim1*, les cellules de l'hypothalamus antérieur migrent au-delà des noyaux PV, SO et aPV, et acquièrent une nouvelle identité. Le gène *Sim1* semble donc être requis pour la différenciation finale de ces cellules, mais aussi pour leur migration et leur positionnement final dans les noyaux PV, SO et aPV.

2.1.2 Développement des corps mammillaires (CMs)

Les corps mammillaires (CMs) sont composés de plusieurs petits noyaux, situés de chaque côté de la ligne médiane dans la partie la plus postérieure de l'hypothalamus. Les CMs reçoivent des projections de l'hippocampe, via le fornix, et se projettent sur le thalamus antérieur, via le faisceau MTT, et sur le tegmentum mésencéphalique, via le faisceau MTEG. Les CMs et leurs projections axonales, le MTT et le MTEG, sont des composantes importantes du circuit de Papez, un circuit neuronal critique pour le processus de la mémoire et l'apprentissage (revu dans Vann & Aggleton, 2004). De fait, chez le rat, une lésion de ces régions induit des troubles de mémoire spatiale et d'apprentissage (Aggleton et al., 1996 ; Vann & Aggleton, 2003).

Récemment, il a été démontré que *Sim1* et *Sim2* agissent de façon compensatoire et non hiérarchique durant le développement des axones du CM (Marion et al., 2005). Chez la souris, les neurones du CM sont générés entre les jours E 10.5 et E13.5. Des études antérieures ont démontré que l'expression de *Sim1* et *Sim2* dans les cellules du neuro-épithélium précurseur des neurones du CM débute le jour précédent l'apparition de ses premiers neurones, à E9.5. Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que la formation du MTT et du MTEG est un processus très complexe et implique de multiples facteurs qui contrôlent le guidage axonal (Alvarez-Bolado et al., 2000 ; Valverde et al., 2000; Marion et al., 2005). *Sim1* et *Sim2* semblent impliqués dans la régulation de l'expression de certains de ces

facteurs. Par exemple, Marion et ses collègues (2005) ont constaté que, chez les souris double mutantes *Sim1*^{-/-} et *Sim2*^{-/-}, Rlg-1, un régulateur des molécules Slits qui induisent la répulsion de certains axones, est exprimé de façon ectopique durant le développement (Marion et al., 2005). Il a aussi été démontré que les neurones du CM sont générés et maintenus, au moins jusqu'au stade E18.5, chez les souris mutantes pour *Sim1* (*Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{+/+}), *Sim2* (*Sim1*^{+/+}; *Sim2*^{-/-}) ou *Sim1* et *Sim2* (*Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-}). Toutefois, le MTT et le MTEG sont absents chez les embryons *Sim1*^{-/-}; *Sim2*^{-/-} et diminués chez les embryons mutants pour *Sim1*, mais dotés d'une ou deux copie de *Sim2* (Marion et al., 2005). Ces observations suggèrent fortement que *Sim1* et *Sim2* agissent de façon redondante pour contrôler le développement des axones du CM, possiblement en régulant l'expression de molécules impliquées dans le guidage axonal.

2.2 *Sim1* et la régulation de la prise alimentaire

L'implication du gène *Sim1* dans la régulation de la prise alimentaire a tout d'abord été soupçonné sur la base d'études cliniques. Holder et al. ont observé chez une jeune fille qu'une désorganisation du gène *Sim1*, causée par une translocation entre le chromosome 1 et 6, était associée à une obésité précoce, une hyperphagie ainsi qu'une croissance linéaire accélérée (Holder et al., 2000). Ces auteurs ont aussi constaté que l'obésité précoce de plusieurs garçons et de filles était associée à des délétions dans la région du chromosome 6 contenant le gène *Sim1* (Holder et al., 2000). Ce sont ces observations qui ont mené à l'hypothèse voulant que l'haploinsuffisance du gène *Sim1* cause une obésité précoce chez l'humain. Les mécanismes par lesquels le gène *Sim1* régule la prise alimentaire n'ont pas encore été élucidés. Cependant, deux possibilités ont jusqu'à maintenant été considérées, soit celles d'anomalies du développement de l'hypothalamus et/ou d'une ou de dysfonctions physiologiques de SIM1.

2.2.1 Anomalies du développement de l'hypothalamus

Des études sur des souris invalide pour le gène *Sim1* ont démontré que les souris *Sim1*^{-/-} ne sont pas viables. Ces souris meurent à la naissance probablement à cause de l'absence de développement des noyaux PV, SO et aPV. Toutefois, les souris invalide hétérozygotes, *Sim1*^{+/-}, survivent mais développent une obésité

sévère associée à une augmentation de la prise alimentaire, sans modification significative du métabolisme corporel et des dépenses énergétiques (Michaud et al., 2001). À l'aide de techniques d'immunohistologie, Michaud et al. (2001) ont démontré que le noyau PV de ces souris était hypocellulaire et ont proposé que les anomalies du développement du noyau PV pourraient être la cause de leur obésité (Michaud et al., 2001). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que le noyau PV, en plus du rôle physiologique qu'il exerce sur le système endocrinien, est connu pour son rôle comme régulateur critique de l'homéostasie énergétique. Comme nous l'avons déjà mentionné dans la section «Régulation de l'homéostasie énergétique», des lésions du noyau PV chez le rat induisent une obésité hyperphagique. De plus, le noyau PV est capable d'intégrer des signaux anorexigènes (ex : α -MSH) et orexigènes (ex : NPY) en provenance d'autres régions hypothalamiques telles que le noyau Arc, et de transmettre ces signaux à d'autres régions du SNC comme le NTS, impliqué dans la régulation de la prise alimentaire. Des perturbations durant le développement de l'hypothalamus pourraient donc engendrer de mauvaises connexions neuronales et perturber en conséquence l'homéostasie énergétique.

2.2.2 Rôles physiologiques de la protéine SIM1

Plusieurs données suggèrent un rôle physiologique du gène *Sim1* dans la régulation de la prise alimentaire. Tout d'abord, chez la souris adulte, le gène *Sim1* est exprimé principalement, si ce n'est exclusivement, dans certains noyaux hypothalamiques incluant les noyaux PV, SO et l'aire HL, ainsi que dans l'amygdale basomédiale (Holder et al., 2004). Toutes des régions connues pour leur implication dans le contrôle de la prise alimentaire. De plus, il a été démontré, par PCR en temps réel, que l'injection i.p. de leptine et de MTII chez la souris sauvage augmente spécifiquement l'expression de l'ARNm de *Sim1* dans l'hypothalamus, de 50% et de 80%, respectivement. De plus, une diminution de la prise alimentaire est observée chez ces souris (Kublaoui et al., 2006a). Enfin, il a été démontré qu'une modulation de l'expression du gène *Sim1* dans le noyau PV, grâce à des adénovirus, s'accompagne d'une modulation concomitante de la prise alimentaire. De fait, l'injection stéréotaxique d'un adénovirus produisant un petit ARN en épingle à cheveux dirigé contre le gène *Sim1* entraîne une réduction spécifique de l'expression de *Sim1* dans le noyau PV, tout en induisant une augmentation de la prise

alimentaire. De façon inverse, l'injection d'un adénovirus porteur du gène *Sim1* dans le noyau PV réduit la prise alimentaire (Yang et al., 2006). Ces résultats sont corroborés par l'étude de Kublaoui et al. (2006), qui démontre que l'augmentation de l'expression de gène *Sim1* à l'aide d'un transgène, dans d'autres modèles d'obésité chez la souris, élimine complètement l'hyperphagie de ces souris (Kublaoui et al., 2006b). L'ensemble de ces observations suggère fortement qu'en plus d'un rôle au cours du développement, le gène *Sim1* joue un rôle physiologique dans le contrôle de la prise alimentaire par le noyau PV.

3. LES FONCTIONS DU GÈNE *Sim2*

3.1 *Sim2* et le développement

Tout comme le gène *Sim1*, le gène *Sim2* joue un rôle important durant l'embryogenèse, et notamment durant la neurogenèse de l'hypothalamus antérieur. En effet, le gène *Sim2* est exprimé dans la région pré-optique ainsi que dans le noyau aPV jusque dans le milieu du noyau PV. Contrairement aux souris mutantes *Sim1*^{-/-}, les souris *Sim2*^{-/-} ne démontrent aucune anomalie du développement des noyaux PV et SO. Les noyaux PV et SO des souris *Sim2*^{-/-} sont histologiquement identiques à ceux des souris sauvages (Goshu et al., 2002). Toutefois, une analyse quantitative a démontré une diminution du nombre de cellules exprimant la TRH et la SS de 43% et 83%, respectivement, dans l'hypothalamus antérieur de ces souris (Goshu et al., 2004). Cette diminution ne semble pas affecter la survie ni la prise alimentaire des souris hétérozygotes pour le gène *Sim2*, souris *Sim2*^{+/-}. De fait, les souris *Sim2*^{+/-} (aussi génotypées comme *Sim1*^{+/+};*Sim2*^{+/-}) ne démontrent pas de phénotype d'obésité. De plus, les souris hétérozygotes pour les deux gènes, *Sim1*^{+/-};*Sim2*^{+/-} ne sont pas plus obèses que les souris *Sim1*^{+/-}. Par conséquent, contrairement à l'haploinsuffisance du gène *Sim1*, l'haploinsuffisance du gène *Sim2* ne semble pas causer l'obésité ni contribuer à ce phénotype chez la souris *Sim1*^{+/+} et *Sim1*^{+/-} (Goshu et al., 2002). Ces observations suggèrent fortement que le gène *Sim2* ne participe pas à la régulation de la prise alimentaire.

PROJET

1. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

L'étiologie de l'obésité est multifactorielle. En effet, l'obésité est causée par une combinaison de facteurs environnementaux et/ou d'anomalies et de dysfonctions génétiques. Plusieurs de ces facteurs de même que plusieurs gènes ont été identifiés et leur rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique a été établi. Ces avancées expérimentales ont permis la production de modèles animaux d'obésité qui permettent d'élucider les mécanismes qui régulent l'homéostasie énergétique et d'affirmer que l'obésité provient d'un déséquilibre du bilan énergétique, c'est-à-dire d'une augmentation des apports caloriques et/ou d'une diminution des dépenses énergétiques. De plus, grâce à ces avancées, on dispose désormais chez l'animal de même que chez l'humain, un schéma intégré de la neuro-anatomie de la régulation pondérale, dans lequel l'hypothalamus ainsi que le tronc cérébral occupent des positions centrales.

Dans l'hypothalamus, le noyau PV est un régulateur critique de la prise alimentaire. Le noyau PV intègre plusieurs signaux provenant du SNC et de la périphérie pour réguler l'équilibre énergétique via ses projections axonales aux neurones pré-ganglionnaires du SNA situés dans le tronc cérébral et la moelle épinière. Le gène *Sim1* code pour un facteur de transcription. La protéine SIM1 est produite par virtuellement tous les neurones du noyau PV et est requise pour le développement de ce noyau. En effet, dans une étude antérieure, nous avons démontré que le noyau PV ne se développe pas chez les souris homozygotes pour un allèle nul du gène *Sim1*. Ces souris meurent à la naissance, probablement à cause des anomalies du noyau PV. Cependant, les souris hétérozygotes, *Sim1*^{+/-} survivent, mais développent une obésité précoce. De plus, nous avons observé que le noyau PV des souris *Sim1*^{+/-} est hypodéveloppé, contenant 24% moins de cellules. Nous pensons que ces anomalies du développement du noyau PV pourraient être à l'origine de l'obésité observée chez les souris *Sim1*^{+/-}. Nous proposons que l'haploinsuffisance de *Sim1* engendre des anomalies dans le développement du noyau PV et, par conséquent, des dysfonctions de ce noyau hypothalamique, dont une mauvaise régulation de l'équilibre énergétique. Les objectifs du présent projet de recherche sont donc de caractériser l'impact de l'haploinsuffisance de *Sim1* sur:

i) le développement du noyau PV et ses projections neuronales efférentes; **ii)** l'homéostasie énergétique, et **iii)** les voies neuronales qui régulent l'homéostasie énergétique.

DEUXIÈME CHAPITRE :
PREMIER ARTICLE

**Impact of *Sim1* gene dosage on the development of the
paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus**

Accepté : European Journal of Neuroscience

**Impact of *Sim1* gene dosage on the development of the
paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus**

Sabine Michaëlle Duplan^{1,2}, Francine Boucher^{1,2} and Jacques L. Michaud^{1,2}

**¹Center of Excellence in Neuromics of Université de Montréal, Montréal,
Canada**

²CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, Canada

Corresponding author:

**Jacques Michaud
Research Center
CHU Sainte-Justine
3175 Côte Sainte-Catherine
Montréal (Québec)
Canada H3T 1C5
Phone : (514) 345-4931, ext : 6900
Fax : (514) 345-4766**

ABSTRACT

The bHLH-PAS transcription SIM1 is required for the development of all neurons of the paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei of the hypothalamus. Mice with a loss of *Sim1* die within a few days after birth, presumably because of the lack of a PVN and SON. In contrast, mice with a decrease of *Sim1* survive, are hyperphagic and become obese. The mechanism by which *Sim1* controls food intake remains unclear. Here, we show that the development of specific PVN and SON cell types is sensitive to *Sim1* gene dosage. *Sim1* haploinsufficiency reduces the number of vasopressin (AVP)- and oxytocin (OT)-producing cells in the PVN by about 50% and 80%, respectively, but does not affect the development of *Crh*, *Trh* and *Ss* neurons. Decrease of AVP-producing cells increases the sensitivity of *Sim1* heterozygous mice to chronic dehydration. Moreover, retrograde labelling showed a 70% reduction of PVN neurons projecting to the dorsal vagal complex, raising the possibility that a decrease of these axons contributes to the hyperphagia of *Sim1*^{+/-} mice. *Sim1* haploinsufficiency is thus associated with a decrease of several PVN/SON cell types which has the potential of affecting distinct homeostatic processes.

INTRODUCTION

The hypothalamus contains small nuclei interspaced between less defined regions. Different physiological functions have been assigned to these distinct areas of the hypothalamus. In particular, the paraventricular (PVN) and the supraoptic nuclei (SON), which is formed by cells that migrate out of the prospective PVN during development, play a critical role in several homeostatic processes, such as the maintenance of energy and fluid balance, the response to stress and the regulation of blood pressure. Structurally, the PVN is composed of magnocellular and parvocellular neurons, whereas the SON is mainly composed of the latter type of neurons (Swanson & Sawchenko, 1983; Sawchenko *et al.*, 1992). Magnocellular neurons of the PVN/SON project their axons to the posterior pituitary where they secrete either vasopressin (AVP) or oxytocin (OT) in the general circulation. AVP is a key regulator of fluid balance, acting to stimulate water uptake by the kidney tubule, whereas OT promotes lactation, stimulates natriuresis and mediates at least in part dehydration-induced decrease of sodium and food intake (Gimpl & Fahrenholz, 2001; Miedlar *et al.*, 2007; Ball, 2007). AVP and OT production is mutually exclusive, defining two distinct types of magnocellular neurons (Mohr *et al.*, 1988).

The parvocellular population of PVN neurons is more heterogeneous than the magnocellular population and has not been as well characterized. Distinct populations of parvocellular neurons can be distinguished based on the fact that they send axons to at least one of the following targets: 1) the medial eminence where they secrete several factors, including TRH and CRH; these factors are transported via the small vasculature to the anterior pituitary where they modulate the secretion

of pituitary hormones; 2) the dorsal vagal complex (DVC) of the brainstem, which includes the dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) and the adjacent nucleus of the solitary tract (NST); the DMV contains preganglionic neurons of the parasympathetic nervous system, whereas the NST receives visceral sensory information via vagal afferences; and 3) to sympathetic centers located in the spinal cord thoracolumbar intermediolateral cell column (Saper *et al.*, 1976; Swanson & Kuypers, 1980; Sawchenko & Swanson, 1982; Rogers & Nelson, 1984; Lawrence & Pittman 1985; Hornby & Piekut 1988; Hardy, 2001).

The PVN is a component of an important hypothalamic circuit that controls food intake (Berthoud & Morrison, 2008). Signals such as leptin that are produced by the periphery activate hypothalamic neurons located in the arcuate nucleus (ARC) that send axonal projections to the PVN. These axons have been shown to influence neuronal activity in the PVN as well as food intake by secreting agonist and antagonist of melanocortin receptor type 4 (Mc4R). Although the identity of Mc4r-expressing PVN cells that are activated by these signals have not yet been fully characterized, several observations suggest that parvocellular neurons that send axons to the DVC are important for the control of food intake, presumably by modulating vagal activity (Flanagan *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 1999; Blevins *et al.*, 2003; Blevins *et al.*, 2004; Rinaman *et al.*, 2005). Studies performed in rats indicate that about 10% of PVN axons projecting to the DVC produce oxytocin (OT) (for instance, see (Sawchenko & Swanson, 1982; Olson *et al.*, 1992)). These OT neurons have been involved in mediating the effect of leptin on food intake and the induction of anorexia associated with dehydration (Blevins *et al.*, 2003; Blevins *et al.*, 2004; Rinaman *et al.*, 2005). Other PVN neurons projecting to the DVC can be

distinguished by the production of CRH, AVP, and TRH, but represent a small subset of projecting neurons (5% <) (Sawchenko & Swanson, 1982; Sawchenko, 1987; Lynn *et al.*, 1991; Olson *et al.*, 1992). The identity of the great majority of PVN neurons projecting to the DVC remains unknown.

A cascade of transcription factors involved in the specification of PVN/SON neurons has been described (Caqueret *et al.*, 2005). One component of this cascade, the bHLH-PAS transcription factor SIM1, is required for the development of virtually all neurons of the PVN and SON (Michaud *et al.*, 1998). Mice homozygous for null alleles of *Sim1* die shortly after birth, presumably from the hypothalamic defects. In contrast, *Sim1* heterozygous mice survive but show hyperphagia and become obese (Michaud *et al.*, 2001; Holder, Jr. *et al.*, 2004). Similarly, *SIM1* haploinsufficiency is one of the few known monogenic causes of obesity in human (Holder Jr *et al.*, 2000). The mechanism by which a decrease of *Sim1* affects food intake remains unknown. Some observations suggest that *Sim1* controls food intake by acting along a physiological pathway that interacts with that of *Mc4r* in the postnatal PVN (Yang *et al.*, 2006; Kublaoui *et al.*, 06a; Kublaoui *et al.*, 2006b). Alternatively, *Sim1* haploinsufficiency could affect food intake indirectly by disrupting PVN development, as suggested by the observation that the number of PVN cells is reduced by 24% in *Sim1*^{+/-} mice (Michaud *et al.*, 2001).

In order to further characterize the impact of *Sim1* haploinsufficiency on hypothalamic development and homeostatic processes, we characterized the cellular composition of the PVN/SON of *Sim1*^{+/-} mice. We found a reduction of *Avp*- and *Ot*-expressing magnocellular neurons as well as of a subset of parvocellular neurons

that project to the DVC in the PVN of these mice. The loss of these parvocellular neurons may have an impact of the control of food intake. Moreover, we show that the decrease of AVP- producing cells affects the response of *Sim1*^{+/-} mice to dehydration. *Sim1* haploinsufficiency thus disrupts the development of distinct cell types, possibly resulting in the perturbation of several homeostatic processes.

MATERIAL AND METHODS

Mice

The *Sim1* mutant allele is characterized by a deletion encompassing 750 bp of the 5' region, the initiation codon and the sequence coding for the basic domain (Michaud *et al.*, 1998). This allele was maintained on a mixed background derived from the 129Sv and C57BL/6 strains and was genotyped as previously described (Michaud *et al.*, 1998). With the exception of embryos, only males were studied. Mice were fed with a 9% fat diet (Teklab Global Rodent Diet 2019, Harlan Teklab, Madison, Wisconsin) and kept in a controlled environment at 22°C with a 12-h light, 12-h dark cycle. For all studies, each heterozygous animal was paired with a littermate control. Mice were housed individually for at least 4 days before and during the whole period of the experiment. All manipulations involving mice were reviewed and approved by the Institutional Animal Care Committee of Ste-Justine Hospital in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

In situ hybridization and immunohistochemistry

E18.5 brains were fixed in Carnoy's solution, processed for embedding in paraffin, and sectioned at a thickness of 7 μ m. Brains from mice were processed as follows. Mice were deeply anaesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (40mg/kg) and perfused transcardially with 35ml of 0.9% saline (room temperature), followed by 45ml of 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1M phosphate buffered saline (PBS; pH7.4, 4°C). Whole brains were post-fixed overnight in 4% PFA at 4°C, immersed in 30% sucrose for 24 hours, embedded in OCT and sectioned at 20 μ m with a cryostat.

In situ hybridization using *Crh*, *Avp* and *Ot* probes was performed as previously described (Goshu *et al.*, 2004). Signals present in the PVN and SON on every fourth section were quantified using the Image Pro software (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland). For each embryo, the sum of arbitrary values for the total intensity of signals captured at the level of the PVN or SON was calculated.

Immunohistochemistry was performed on free floating sections using either an indirect avidin-biotin-peroxidase method, according to the manufacturer's instructions (Vectastain ABC Elite PK-6100 Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), or the detection of a fluorochrome. For the peroxidase methods, brain sections were quenched in 1% hydrogen peroxide (H₂O₂) for 10 minutes and blocked for 1h with 10% normal goat or donkey serum in PBS containing 0.3% Triton X-100. The sections were then incubated for 3 days at 4°C in PBS containing either normal goat or donkey serum (1%) and Triton X-100 (0.3%) as well as one of the following

antibodies at the indicated dilution: rabbit anti-oxytocin polyclonal antibody (1:1000; Chemicon International, Temecula, CA, USA; #AB911); rabbit anti-vasopressin polyclonal antibody (1:2000; Chemicon International; #AB1565); goat anti-neurophysin I (M-15) polyclonal antibody (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; #SC-7810) and goat anti-neurophysin II (M-20) polyclonal antibody (1:1000; Santa Cruz Biotechnology; #SC-7812). Sections were washed in PBS, incubated with biotinylated goat anti-rabbit (1:1000 for anti-oxytocin and anti-vasopressin; Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA, USA; #111-065-144;) or donkey anti-goat (1:1000 for anti-neurophysin I and anti-neurophysin II; Jackson Immunoresearch Laboratories; #705-065-147) IgGs for 1h, washed again and incubated for another hour with streptavidin-peroxidase complex. Peroxydase activity was detected using 3,3'-diaminobenzine tetrahydrochloride (DAB, 0.025%; Sigma) diluted in 10% H₂O₂.

For fluorescent immunohistochemistry, free-floating sections were washed in PBS containing 0.3% Triton X-100 (TPBS) for 5 minutes and blocked in 10% normal goat serum diluted in TPBS for 1-2 h at room temperature. The sections were washed twice in TPBS for 5 minutes and incubated with the rabbit polyclonal anti-oxytocin or with the rabbit anti-vasopressin polyclonal antibody (diluted 1:1000 in TPBS) for 3 days at 4°C. After two 5 minutes washes in TPBS, sections were incubated with the Cy2-conjugated anti-rabbit IgG (1:500; Jackson Immunoresearch Labs; #111-225-144) for 1-2 h at room temperature. After the staining was completed, sections were mounted on gelatine-coated glass slides, air-dried, briefly dehydrated in 100% ethanol (40 seconds), cleared in xylenes (60 seconds) and cover-slipped with Krystalon (EM Science Harleco, Gibbstown, NJ, USA) solution.

Specificity of the immunoreactions was determined routinely by omission of the primary or secondary antibodies and inclusion of appropriate pre-immune sera. The specificity of the antibodies was also assessed by comparing immunostaining with the expression patterns observed by *in situ* hybridization.

Avidin-biotin-peroxidase immunoreactions were photographed using a Leica DM5500 Q microscope coupled to the Leica Application Suite (LAS) microscope software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Nikon Eclipse E800 microscope (emission intensity of 510-560 nm), Nikon Digital camera DXM1200 and Nikon ACT-1 software (Nikon Corporation Instruments Compagny, Japan) were used for analyses and photography of fluorescent immunostained sections. Image brightness and contrast were adjusted by applying PhotoShop 7.0 (Adobe Systems Inc., San José, CA, USA) software.

Quantification of immunoreactive cells was done by counting labelled cells in the PVN on every fourth 20 μ M thick coronal section using a Zeiss Axioskop 2 (Carl Zeiss, Luxembourg; 20x Ph2 Plan-NeoFluar objective lens) microscope or a Nikon Eclipse E800 (Nikon Corp.; 20x Ph1 DLL PlanFluor objective lens) microscope. OT- and AVP-positive cells were identified by either their dark brown or bright fluorescent cytoplasmic staining.

Chronic dehydration

Sim1^{+/+} and *Sim1*^{+/-} males, 4-5 weeks of age, were housed individually for at least 4 days before the beginning of the experiment. The weight, the amount of food consumed as well as the volume of tap water drunk by each mouse were recorded

every morning at 10:00 am over the following 5 days. At the end of day 5, tap water was replaced by either a 0.34M or a 0.5M NaCl solution. The same parameters were recorded daily for another 5 days. Blood was then collected by intracardiac puncture for determination of plasma sodium concentration as well as osmolality using freezing-point-depression osmometers (Fiske Associated, Norwood, Massachusetts) and mice were perfused as described above. Their brain was removed and processed for *in situ* hybridization or immunohistochemistry.

Retrograde labelling

Four-five week-old *Sim1^{+/+}* and *Sim1^{+/-}* mice were anaesthetized with an intraperitoneal injection of acepromazine (1 mg/kg body weight; Ayerst, Guelph, ON), Xylazine (10 mg/kg body weight; Bayer, Etobicoke, ON) and ketamine (100 mg/kg body weight; Ayerst) mixture and placed into a stereotaxic device (Kopf instruments, Tujunga, CA). The retrograde tracer rhodamine –labelled latex microspheres (Lumafluor, New York) was used to trace PVN projections to the hindbrain dorsal vagal complex (DVC). The rhodamine-labelled microspheres were injected unilaterally into the DVC region, at the level of the area postrema, using the following coordinates: 8.5 mm caudal to bregma, 0.15 mm lateral to the midline and 5.65 mm below the dorsal surface of the skull. A 0.4- μ l volume of rhodamine-labelled microspheres was injected with a 0.5- μ l Hamilton syringe (Fisher Scientific) over a 10 minute period. The syringe was held stationary for another 10 minute and slowly removed over the following minute. The mice were kept 4 weeks before being sacrificed. Mice with a correctly targeted DVC were identified by examining coronal sections of the hindbrain for the presence of microspheres. Brains of these mice were then sectioned coronally and processed for immunohistochemistry as described

above. Photomicrographs of labelled cells were taken with an Olympus FluoView FV300 Confocal Laser Scanning microscope (Olympus corporation, Japan). Quantification of PVN rhodamine-labelled and OT-positive cells was done as described above. Immunopositive rhodamine-labelled cells were identified by their bright fluorescent cytoplasm.

Statistics

Results were expressed as means \pm standard error of the mean. Analysis of variance was used to study the impact of dehydration on osmolality and sodium levels. For all the other experiments, statistical significance was determined using a paired Student's t-test. All statistics were performed using SPSS 15.0. The level of significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Decrease of vasopressin- and oxytocin- producing cells in the PVN and SON of *Sim1*^{+/-} embryos and mice.

We have previously shown that the PVN of *Sim1*^{+/-} mice is hypocellular containing 24 % less cells than that of littermate controls (Michaud *et al.*, 2001). We have also observed that the number of *Trh*- and somatostatin-expressing neurons in the PVN and in adjacent areas is not decreased in E18.5 *Sim1*^{+/-} embryos (Goshu *et al.*, 2004). In order to further characterize the impact of *Sim1* haploinsufficiency on the neuronal populations of the PVN, we examined the expression of three other markers of terminal differentiation- *Crh*, *Ot* and *Avt*- in E18.5 *Sim1*^{+/-} embryos by *in*

situ hybridization. We found that the expression of *Ot* and *Avp* transcripts is decreased by 62% ($t_2 = 5.796$, $P = 0.0285$) and 65% ($t_2 = 17.845$, $P = 0.0031$), respectively, in the PVN of *Sim1*^{+/-} embryos in comparison to *Sim1*^{+/+} littermate controls (Fig. 1A-D,G). Interestingly, the reduction of *Avp* expression was particularly important in the ventral aspect of the PVN (Fig. 1C,D). In contrast, *Crh* expression was not changed in the PVN of in *Sim1*^{+/-} embryos when compared to littermate controls (Fig. 1E-G). Of note, *Ot* and *Avp* expression was decreased by 52% ($t_2 = 3.352$, $P = 0.0786$) and 51% ($t_2 = 6.110$, $P = 0.0258$), respectively, in the SON of these heterozygous embryos but this reduction reached significance only in the case of the latter (Fig. 1H-L).

We next quantified *Ot* and *Avp* expression in the PVN of 4-6 week-old male mice. *In situ* hybridization showed that *Ot* and *Avp* expression is reduced by 37% ($t_6 = 8.118$, $P = 0.0002$) and 30% ($t_6 = 7.334$, $P = 0.0003$), respectively, in *Sim1*^{+/-} mice compared to littermate controls (data not shown). Immunohistochemistry studies using antibodies directed against OT and neurophysin-OT showed a reduction of the number of labelled cells by 84% ($t_4 = 7.840$, $P = 0.0014$) and 57% ($t_2 = 6.770$, $P = 0.0211$), respectively, whereas antibodies directed against AVP and neurophysin-AVP showed a reduction of the number of labelled cells by 42% ($t_4 = 3.573$, $P = 0.0233$) and 49% ($t_2 = 11.433$, $P = 0.0076$), respectively, in *Sim1*^{+/-} mice (Fig. 2). The decrease of *Ot*-producing cells was observed in all regions of the PVN whereas the reduction of *Avp* expression was more striking in the ventral aspect of the PVN, as similarly observed at E18.5. OT and AVP production was also decreased in the SON of *Sim1*^{+/-} mice (Fig. 3). However, quantification of OT/AVP production in this nucleus was difficult because the SON tended to be damaged in these sections. All together,

these results indicate that *Sim1* haploinsufficiency affects the development of specific cell types within the PVN and SON.

Impact of *Sim1* haploinsufficiency on tolerance to dehydration

AVP and OT are components of the adaptive response to dehydration. Production of these two peptides is induced by increased osmolality. One of the main functions of AVP is to stimulate water uptake by the kidney tubules whereas OT appears to stimulate natriuresis, as well as to mediate dehydration-induced decrease of sodium and food intake (Sjoquist *et al.*, 1995; Rinaman *et al.*, 2005; Vollmer *et al.*, 2006). In an attempt to examine the impact of the cellular deficiencies associated with *Sim1* haploinsufficiency on fluid homeostasis, we submitted *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice to water deprivation for a period of 18 hours. We did not find any difference between the two groups of mice with respect to food intake, blood sodium and blood osmolality (data not shown).

In order to further explore the impact of *Sim1* haploinsufficiency on fluid homeostasis, we used a paradigm of chronic dehydration in which water is replaced by a 0.34M or a 0.5M NaCl solution (Watts, 2001; Vollmer *et al.*, 2006). Typically, mice and rats drinking these NaCl solutions over a 5 day period show a decrease of food intake and an increase of blood osmolality. Although *Ot* mutant mice have been shown to consume increased amounts of saline solution and food than controls in short-term paradigms of dehydration, their food intake, fluid consumption and weight gain are not different from those of controls in the context of this paradigm of chronic dehydration (Rinaman *et al.*, 2005; Vollmer *et al.*, 2006). We thus decided to use this

paradigm as a mean to explore the impact of a reduction of AVP-producing cells on fluid homeostasis.

Over a period of five days during which mice had access to water, the average daily food intake of *Sim1*^{+/-} mice was significantly increased when compared to that of littermate controls ($t_7 = 2.926$, $P = 0.022$, Fig. 4A; $t_7 = 4.619$, $P = 0.002$, Fig. 4B). Water was then replaced with a 0.34M or 0.5M NaCl solution and, 4 days later, food intake was measured over a 24-hour period. The food intake of *Sim1*^{+/-} mice drinking the NaCl solutions was significantly decreased when compared to that of their littermate controls (for 0.34M NaCl solution: $t_7 = 4.169$, $P = 0.004$; Fig. 4A) and (for 0.5M NaCl solution: $t_7 = 2.589$, $P = 0.036$; Fig. 4B). Therefore, whereas *Sim1*^{+/-} mice drinking water eat more than littermate controls, the reverse situation is observed at the end of the dehydration phase for the two conditions tested.

At the end of the fifth day of dehydration, mice drinking the 0.34M or 0.50 M NaCl solutions were sacrificed. Blood osmolality and sodium levels were measured and compared to those of a group of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice of the same age that had access to water (Fig. 4C,D). Analysis of variance showed an interaction between the genotype and the dehydration conditions for both osmolality ($F_{2,43} = 6.54$, $P = 0.004$) and sodium levels ($F_{2,43} = 11.15$, $P < 0.001$), with increased values in *Sim1*^{+/-} mice when compared to littermate controls. In summary, dehydration induced a more profound anorexia as well as higher blood sodium and osmolality levels in *Sim1*^{+/-} mice than in *Sim1*^{+/+} mice. Overall, these experiments suggest that the decrease of AVP production associated with *Sim1* haploinsufficiency affects the sensitivity of mice to dehydration.

At least two none mutually exclusive mechanisms could be proposed to account for the decreased number of *Avp*- and *Ot*-expressing cells found in *Sim1*^{+/-} mice: *Sim1* haploinsufficiency could affect either the development of these cell types or the regulation of *Avp* and *Ot* expression in the PVN/SON. In the second scenario, the number of PVN/SON cells fated to express *Avp* or *Ot* would not be decreased but only a subset of them would be identified because the other cells would express levels of *Avp* or *Ot* that escape detection. In order to explore this possibility, we examined the production of AVP and OT in the PVN of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice that have drank a solution of 0.5M NaCl for five days. Chronic dehydration stimulates *Avp* and *Ot* transcription in the PVN (Yue *et al.*, 2008). We reasoned that by increasing the levels of *Avp* and *Ot* expression, dehydration may reveal a subset of cells in *Sim1*^{+/-} mice that are undetectable in basal conditions. However, despite the fact that blood osmolality levels are increased in *Sim1*^{+/-} mice compared to littermate controls, immunohistochemical analysis showed that the PVN of *Sim1*^{+/-} mice harbours 78% ($t_2 = 12.481$, $P = 0.0064$) and 50% ($t_2 = 19.135$, $P = 0.0027$) less OT- and AVP-producing cells, respectively, when compared with littermate controls, a decrease comparable to that observed in basal conditions (Fig. 5A-F). *In situ* hybridization performed on sections adjacent to those used for these immunohistochemical studies showed that dehydration increased *Avp* expression in *Sim1*^{+/-} and *Sim1*^{+/+} mice by 51% ($t_2 = 4.518$, $P = 0.0457$) and 26%, respectively (Fig. 5G-L). The increased induction of *Avp* expression in the PVN of *Sim1*^{+/-} mice is consistent with the observation that these mice showed higher blood osmolality levels than *Sim1*^{+/+} mice. All together, these results suggest that *Sim1* is not required for *Avp* expression in basal conditions, or for the upregulation of its expression upon dehydration.

Decrease of PVN cells projecting to the brainstem in *Sim1*^{+/-} mice

OT and AVP are produced by magnocellular neurons but also by a subset of PVN parvocellular neurons that project to the DVC. In the rat, OT-producing cells appear to be one of the main groups of neurons projecting to the DVC, representing approximately 10 % of these axons (Saper *et al.*, 1976; Swanson & Kuypers, 1980; Sawchenko & Swanson, 1982; Rogers & Nelson, 1984; Lawrence & Pittman, 1985; Hornby & Piekut, 1988; Olson *et al.*, 1992; Rinaman, 1998). In order to determine whether the population of OT neurons projecting to the DVC is also affected by *Sim1* haploinsufficiency, we performed retrograde labelling experiments. Fluorescent latex beads were stereotaxically injected into the DVC of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice, at the level of the area postrema. Analysis of brainstem sections indicated that the labelling was maximal in the lateral half of the DVC (Fig. 6A). Attempts to inject the beads more medially resulted in lethality. As previously reported in rat studies, most labelled neurons were found in the posterior half of the PVN in both *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice (Fig. 8B,E,H,K) (Sawchenko & Swanson, 1982). However, OT production was detected in only a small subset of these labelled cells (Fig. 6B-M). We found a total of 8 and 3 dual labelled cells in *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice (n = 4 for each genotype), respectively. The number of dual labelled cells per case varied from 0 to 3. Because our retrograde labelling protocol identified only a small number of OT-producing cells, we could not determine whether *Sim1* haploinsufficiency affects the development of these cells. Interestingly, the number of PVN cells containing the latex beads was decreased by 72% ($t_3 = 10.627$, $P = 0.0018$) in *Sim1*^{+/-} mice, when compared to littermate controls (Fig. 6 and 7). These observations thus indicate that *Sim1* haploinsufficiency affects not only the development of AVP and OT magnocellular neurons but also that of a subset of neurons projecting to the brainstem.

DISCUSSION

Whereas loss of *Sim1* abolishes PVN/SON development, *Sim1* haploinsufficiency is associated with a decrease of *Avp*- and *Ot*-expressing neurons in these nuclei. It is possible that this decrease of *Avp* and *Ot* expression results from the abnormal development of PVN/SON cells rather than from the specific disruption of *Avp* and *Ot* transcription. First, our retrograde labelling studies indicating a decrease of a subset of parvocellular neurons projecting to the DVC strongly suggest that *Sim1* haploinsufficiency has the potential of affecting the development of some PVN cell types. Second, the fact that the number of *Avp*- and *Ot*-expressing cells is stable during the pre- and post-natal life of *Sim1*^{+/-} mice, even in the presence of hyperosmolality, which stimulates the expression of these genes, is consistent with the possibility that this reduction is developmental. Third, we have shown that *Avp* expression is increased in *Sim1*^{+/-} mice in response to hyperosmolarity, indicating that the pathways required for its upregulation are not affected by *Sim1* haploinsufficiency. These findings are consistent with our previous histological finding that the total number of PVN cells is decreased by about 24% in *Sim1*^{+/-} mice compared to wild-type littermates (Michaud *et al.*, 2001). In contrast, Kublaoui *et al.* (2006) have observed that the number of PVN cells expressing a *Sim1* reporter transgene, which presumably labels virtually all PVN neurons, was comparable in *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice (Kublaoui *et al.*, 2006a; Kublaoui *et al.*, 2006b). One possible explanation for this discrepancy is that our histological study revealed a decrease of both glial and neuronal cell types in *Sim1*^{+/-} mice. Only a small subset of PVN neurons would be affected by *Sim1* haploinsufficiency, possibly escaping detection by the transgenic assay.

Gene dosage and hypothalamus development

SIM1 and its heterodimerizing partner ARNT2 are required for the development of virtually all neurons of the PVN and SON (Michaud *et al.*, 1998; Michaud *et al.*, 2000; Hosoya *et al.*, 2001; Keith *et al.*, 2001; Caqueret *et al.*, 2006). The SIM1:ARNT2 complex functions in parallel with the homeobox-containing transcription factor OTP for the development of these cells (Acampora *et al.*, 1999; Wang & Lufkin, 2000). SIM1:ARNT2 and OTP acts upstream of two other transcription factors, BRN2 and SIM2, a homolog of SIM1, which in turn direct the development of a subset of PVN/SON cells. BRN2 is required for the development of all AVP-, OT- and CRH-producing cells of the PVN/SON (Schonemann *et al.*, 1995; Nakai *et al.*, 1995). In contrast, loss of *Sim2* decreases the number of TRH- and SS-producing cells by 43 and 83 %, respectively (Goshu *et al.*, 2004). The fact that *Brn2* and *Sim2* specify distinct cell types is consistent with the observation that they are expressed in different domains of the developing hypothalamus (Goshu *et al.*, 2004).

Sim1 appears to control AVP and OT cell development by modulating *Brn2* expression (Michaud *et al.*, 1998). If *Sim1* haploinsufficiency interferes with the development of AVP and OT cells in the PVN/SON, it follows that a decrease of *Brn2* should also affect this process. Indeed, RNase protection assay have shown that the expression of *Avp* and *Ot* is decreased by 50% in the hypothalamus of *Brn2* heterozygous animals (Nakai *et al.*, 1995). *Brn2* has been shown to directly control *Crh* expression in cultured cells, raising the possibility that it also functions as a regulator of *Avp* and *Ot* expression (Schonemann *et al.*, 1995). Adenoviral-mediated expression of *Brn2* in the PVN of rats, however, does not result in an increase of *Avp* or *Crh* expression (Wong & Murphy, 2003). Although we cannot rule out the

possibility that *Brn2* regulates *Avp*, *Ot* or *Crh* expression *in vivo*, possibly acting in a non-limiting fashion, it appears likely that the decrease of *Avp* and *Ot* expression observed in *Brn2*^{+/-} mice is caused by disruption of the development of a subset of PVN/SON cells. Interestingly, *in situ* hybridization studies have also revealed a reduction of *Avp* expression in mice with *Arnt2* haploinsufficiency (Hosoya *et al.*, 2001). *Sim1* haploinsufficiency does not affect the development of PVN TRH- and CRH-producing cell types. The impact of *Brn2* and *Arnt2* haploinsufficiency on the expression of other PVN/SON markers has not yet been reported. However, based on our knowledge of the functional relationship between *Sim1* and these genes, we would predict that *Brn2* and *Arnt2* haploinsufficiency do not affect the development of TRH and CRH cells. Expression of *Avp* and *Ot* in PVN/SON magnocellular neurons is mutually exclusive (Mohr *et al.*, 1988). *Avp* and *Ot* transcriptional units are adjacent to each other and sequences belonging to each of these units can repress the other gene, possibly explaining this expression pattern (Waller *et al.*, 1998). The binary organization of this magnocellular population is consistent with the existence of a common progenitor. All together, these observations suggest that the development of this progenitor is sensitive to *Sim1*, *Arnt2* and *Brn2* gene dosage.

***Sim1* haploinsufficiency and the control of fluid balance**

Increased production of AVP and OT is part of an adaptive response to hyperosmolality. AVP induces water uptake by the kidney tubules whereas OT stimulates natriuresis and mediates dehydration-induced decrease of sodium and food intake (Gimpl & Fahrenholz, 2001; Miedlar *et al.*, 2007; Ball, 2007). Defects of AVP biosynthesis have been studied in mouse models. In particular, a mutation that truncates the AVP precursor (*Avp*^{C67X}) has been generated by gene targeting

(Russell *et al.*, 2003). Mice homozygous for this allele die shortly after birth whereas heterozygotes survive but show decreased water uptake by the kidney. The phenotype becomes detectable around 2 months of age and worsens with age. Studies of the PVN and SON of these heterozygous animals revealed a progressive loss of AVP-producing neurons relative to OT-producing neurons, presumably because of the toxic effects of the mutant protein. The number of AVP-producing cells is reduced by about half when these mice begin to display impaired water uptake by the kidney. *Sim1*^{+/-} mice show a reduction of AVP-producing cells that is comparable to that observed in young *Avp*^{+/^{C67X} mice. Collectively, these observations indicate that decreasing the pool of AVP-producing cells in the PVN/SON by half is sufficient to affect fluid balance.}

Central diabetes insipidus (CDI) is a heterogeneous condition characterized by polyuria and polydypsia which is caused by a lack of secretion of AVP. Known genetic causes of CDI includes defects affecting AVP biosynthesis (Christensen & Rittig, 2006), the Wolfram syndrome (Minton *et al.*, 2003) and holoprosencephaly (Hahn *et al.*, 2005). In the latter case, the ventral midline of the brain does not develop properly, presumably affecting the development of the prospective PVN/SON region which flanks the third ventricle. Familial forms of CDI typically show an autosomal dominant mode of transmission and are mainly caused by mutations affecting AVP biogenesis (Christensen & Rittig, 2006). CDI is unexplained in about 50% of cases (Maghnie *et al.*, 2000). Collectively, our observations suggest that subtle developmental defects of the PVN/SON could underlie unexplained cases of CDI. *SIM1*, *BRN2* or *ARNT2* haploinsufficiency thus represents candidate causes of both sporadic and familial CDI. In the case of *SIM1*, CDI would be expected to be

associated with obesity. Interestingly, a microdeletion encompassing both *SIM1* and *BRN2* was described in a patient with obesity and diabetes insipidus (Klein *et al.*, 2007). Although this report does not indicate whether this case of diabetes insipidus is of central origin or whether it involves a decreased response to AVP, it is tempting to speculate that *SIM1* and/or *BRN2* haploinsufficiency causes this defect. It would thus be interesting to examine the response of patients with intragenic mutations in *SIM1* to fluid restriction.

***Sim1* haploinsufficiency and the control of food intake**

Retrograde labelling showed a decrease of PVN neurons projecting to the DVC in *Sim1*^{+/-} mice, indicating that *Sim1* haploinsufficiency not only affects the development of magnocellular but also that of parvocellular neurons. The identity of these PVN parvocellular cells remains unknown. In the rat, about 10% of PVN neurons projecting to the DVC produce OT. We could not study the impact of *Sim1* haploinsufficiency on the development of these cells since we have identified only a small number of them. Previous studies performed in the rat suggest that OT-producing project abundantly to cells located in the medial half of the DVC but less so to cells located more laterally (Rinaman, 1998; Blevins *et al.*, 2003). It is thus possible that we did not identify more dual labelled cells because our retrograde labelling protocol mainly targeted the lateral DVC. Injection into the medial DVC resulted in the death of animals.

Recently, Kublaoui *et al.* (2008) have also observed a decrease of OT-producing cells in the PVN of *Sim1*^{+/-} mice (Kublaoui *et al.*, 2008). Since OT

administration has been shown to be anorexigenic, they hypothesized that *Sim1* haploinsufficiency may be mediated by a decrease of OT production. Interestingly, intracerebroventricular administration of OT to this mice restored food intake to control levels, suggesting that the decrease of *Ot* expression is responsible for their hyperphagia. In contrast, *Ot* mutant mice do not show abnormal food intake (Mantella *et al.*, 2003; Rinaman *et al.*, 2005). It is possible that the decrease of *Ot* expression observed in *Sim1*^{+/-} mice may have a more important impact on food intake in the context of the loss of PVN neurons projecting to the DVC.

Assuming that OT cells neurons fail to differentiate in these mice, this observation would suggest that their hyperphagia has a developmental origin. Since OT appears to influence food intake through the PVN projections to the DVC, this observation would also be consistent with the possibility that *Sim1* haploinsufficiency affects the development of the parvocellular population of OT neurons. Alternatively, it is possible that *Sim1* haploinsufficiency controls both the development of OT-producing cells and the expression of *Ot*, which would be consistent with studies showing that adenoviral modulation of *Sim1* expression levels in the postnatal PVN affects food intake (Yang *et al.*, 2006). Disrupting *Sim1* only after birth by using a conditional allele will permit to elucidate the mechanism by which its decrease affects food intake.

Conclusions

Haploinsufficiency of genes coding for other transcription factors have also been shown to affect the development of the hypothalamus. For instance, *Sim2* haploinsufficiency decreases the number of TRH and SS cells in the PVN and other

areas of the anterior hypothalamus whereas *Mash1* haploinsufficiency decreases the number of SF1 cells in the ventromedial nucleus (Goshu *et al.*, 2004; McNay *et al.*, 2006). We suggest that single hits in genes coding for transcriptional regulators of hypothalamic development may represent a common mechanism by which homeostatic processes are disrupted in humans. Moreover, since each hypothalamic nucleus plays multiple physiological roles, loss of a single or several cell types could affect multiple homeostatic processes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by grants from the Sick Kids Foundation and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). SMD was supported by a salary award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. JLM is a Clinical Investigator of the CIHR (Institute of Genetics).

LEGENDS

Figure 1. **Decrease of *Ot* and *Avp* expression in the PVN and SON of E18.5 *Sim1*^{+/-} embryos.** (A-F) Adjacent coronal sections through the PVN of E18.5 *Sim1*^{+/+} (A,C,E) and *Sim1*^{+/-} (B,D,F) embryos hybridized with *Ot* (A,B), *Avp* (C,D) or *Crh* (E,F) probes. Visual inspection of these sections shows a decrease of *Ot* and *Avp*, but not of *Crh* expression, in *Sim1*^{+/-} embryos when compared to littermate controls. The arrow in (D) shows the ventral aspect of the PVN. (G) Quantification of *Ot*, *Avp* and *Crh* hybridization signals in *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} embryos. For each probe, the sum of intensity values observed in each embryo was calculated. The values obtained for *Sim1*^{+/-} embryos are expressed relatively to those obtained for *Sim1*^{+/+} embryos, which are set at 100% (n = 3 embryos for each genotype). (H-K) Adjacent coronal sections through the SON of E18.5 *Sim1*^{+/+} (H,J) and *Sim1*^{+/-} (I,K) embryos hybridized with *Ot* (H,I) or *Avp* (J,K) probes. Visual inspection of these sections shows a decrease of *Ot* and *Avp* expression in *Sim1*^{+/-} embryos when compared to littermate controls. (L) Quantification of *Ot* and *Avp* hybridization signals in *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} embryos (n = 3 embryos for each genotype). The asterisk indicates values significantly different between *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} embryos ($P < 0,05$). Scale bars represent a segment of 100 μ M.

Figure 2. **Decrease of OT and AVP production of in the PVN of *Sim1*^{+/-} mice.** Production of OT (A,B), N-OT (D,E), AVP (G,H) and N-AVP (J,K) was detected in coronal sections through the PVN of *Sim1*^{+/+} (A,D,G,J) and *Sim1*^{+/-} (B,E,H,K) mice using immunohistochemistry. Arrows in (H) and (K) shows the ventral aspect of the PVN. The number of cells producing each of these markers was counted on every

four sections (C,F,I,L) (n= 5 mice for each genotype for OT and AVP; n=3 mice for each genotype for N-OT and N-AVP). The asterisk indicates values significantly different between *Sim1^{+/+}* and *Sim1^{+/-}* mice ($P < 0,05$). The scale bar represents a segment of 100 μ M.

Figure 3. Decrease of OT and AVP production of in the SON of *Sim1^{+/-}* mice.

Production of OT (A,B) and AVP (C,D) was detected in coronal sections through the SON of *Sim1^{+/+}* (A,C) and *Sim1^{+/-}* (B,D) mice using immunohistochemistry. The scale bar represents a segment of 100 μ M.

Figure 4. Impact of chronic dehydration on food intake, blood osmolality and blood sodium levels in *Sim1^{+/+}* and *Sim1^{+/-}* mice.

(A,B) The average food intake of *Sim1^{+/+}* and *Sim1^{+/-}* mice measured over a period of five days, during which they had access to water, was compared to the food intake measured in the same mice over a 24-hour period, 4 days after the introduction of a 0.34M (A) or of a 0.5M (B) NaCl solution. Asterisk indicates a significant difference between *Sim1^{+/-}* mice and littermate controls (n=8 for each genotype) ($P < 0,05$). (C, D) Mean blood osmolality (C) or sodium (D) levels measured in *Sim1^{+/+}* and *Sim1^{+/-}* mice after a period of 5 days during which they had access either to water, to a 0.34M NaCl or to a 0.5M NaCl solution, as indicated. Each group is composed of 7 or 8 mice.

Figure 5. Expression of *Ot* and *Avp* in dehydrated *Sim1^{+/+}* and *Sim1^{+/-}* mice.

(A-F) Immunohistochemical detection of OT (A,B) and AVP (D,E) production in coronal sections through the PVN of *Sim1^{+/+}* (A,D) and *Sim1^{+/-}* (B,E) mice that drank the 0.5 M NaCl solution for five days. The number of cells producing each of these markers

was counted on every four sections (C,F) (n= 3 for each genotype). (G-K) Coronal sections through the PVN of *Sim1*^{+/+} (G,H) and *Sim1*^{+/-} (J,K) mice that drank either water (G,J) or the 0.5M NaCl solution (H,K) were hybridized with the *Avp* probe. These sections are from the same animals as those used for the immunohistochemical studies shown in (A-F). Visual inspection shows an increase of *Avp* expression in mice that drank the NaCl solution when compared to those that drank water. (I,L) Quantification of *Avp* hybridization signals in the PVN of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice that drank either water or the 0.5M NaCl solution. The sum of intensity values observed in each PVN was calculated. For each genotype, the values obtained with NaCl solution supplementation are expressed relatively to those obtained with water supplementation, which are set at 100%. This increase was statistically significant only for *Sim1*^{+/-} mice (n = 3 mice for each genotype). The asterisk indicates values significantly difference between *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice or between mice of the same genotype that were euhydrated or dehydrated ($P < 0,05$). The scales bars represent a segment of 100 μ M.

Figure 6. Retrograde labelling of PVN neurons projecting to the DVC in *Sim1*^{+/+} mice and *Sim1*^{+/-} mice. (A) Fluorescent latex beads were stereotaxically injected into the DVC of mice, which comprised the NST and the DMV, at the level of the area postrema (AP). Labelling was maximal in the lateral half of the DVC. (B-M) Coronal sections through the anterior or posterior PVN of *Sim1*^{+/+} (B-D, H-J) and *Sim1*^{+/-} (E-G, K-M) mice that were injected with the latex beads. (B,E,H,K) PVN cells labelled with the fluorescent beads. (C,F,I,L) Immunohistochemistry showing PVN cells that produce OT. (D,G,J,M) Merging of sections showing the presence of latex beads and

the production of OT. Arrows in (K,L,M) show a cell that is double-labelled (also shown in the inset). The scale bar represents a segment of 100 μ M.

Figure 7. Quantification of PVN neurons projecting to the DVC in *Sim1*^{+/+} mice and *Sim1*^{+/-} mice. (A) Quantification of the number of PVN cells projecting to the DVC that were labelled by retrograde labelling. (B) Quantification of the number of PVN cells producing OT. These two cell counts were performed using the same PVN sections (n = 4 mice for each genotype). The asterisk indicates values significantly different between *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice ($P < 0,05$).

Reference List

- Acampora, D., Postiglione, M.P., Avantiaggiato, V., Di Bonito, M., Vaccarino, F.M., Michaud, J. & Simeone, A. (1999) Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev.*, **13**, 2787-2800.
- Ball, S.G. (2007) Vasopressin and disorders of water balance: the physiology and pathophysiology of vasopressin. *Ann. Clin. Biochem.*, **44**, 417-431.
- Berthoud, H.R. & Morrison, C. (2008) The brain, appetite, and obesity. *Annu. Rev. Psychol.*, **59**, 55-92.
- Blevins, J.E., Eakin, T.J., Murphy, J.A., Schwartz, M.W. & Baskin, D.G. (2003) Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. *Brain Res.*, **993**, 30-41.
- Blevins, J.E., Schwartz, M.W. & Baskin, D.G. (2004) Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **287**, R87-R96.
- Caqueret, A., Boucher, F. & Michaud, J.L. (2006) Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus. *Dev. Biol.*, **298**, 95-106.
- Caqueret, A., Yang, C., Duplan, S., Boucher, F. & Michaud, J.L. (2005) Looking for trouble: a search for developmental defects of the hypothalamus. *Horm. Res.*, **64**, 222-230.
- Christensen, J.H. & Rittig, S. (2006) Familial neurohypophyseal diabetes insipidus--an update. *Semin. Nephrol.*, **26**, 209-223.
- Flanagan, L.M., Dohanics, J., Verbalis, J.G. & Stricker, E.M. (1992) Gastric motility and food intake in rats after lesions of hypothalamic paraventricular nucleus. *Am. J. Physiol.*, **263**, R39-R44.
- Gimpl, G. & Fahrenholz, F. (2001) The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.*, **81**, 629-683.
- Goshu, E., Jin, H., Lovejoy, J., Marion, J.F., Michaud, J.L. & Fan, C.M. (2004) Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol. Endocrinol.*, **18**, 1251-1262.
- Hahn, J.S., Hahn, S.M., Kammann, H., Barkovich, A.J., Clegg, N.J., Delgado, M.R. & Levey, E. (2005) Endocrine disorders associated with holoprosencephaly. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, **18**, 935-941.
- Hardy, S.G. (2001) Hypothalamic projections to cardiovascular centers of the medulla. *Brain Res.*, **894**, 233-240.

- Holder Jr, J.L., Butte, N.F. & Zinn, A.R. (2000) Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 101-108.
- Holder, J.L., Jr., Zhang, L., Kublaoui, B.M., DiLeone, R.J., Oz, O.K., Bair, C.H., Lee, Y.H. & Zinn, A.R. (2004) Sim1 gene dosage modulates the homeostatic feeding response to increased dietary fat in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **287**, E105-E113.
- Hornby, P.J. & Piekut, D.T. (1988) Anatomical evidence for interaction of ACTH1-39 immunostained fibers and hypothalamic paraventricular neurons that project to the dorsal vagal complex. *Histochemistry*, **90**, 201-206.
- Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Kawauchi, S., Ema, M., Yamamoto, M. & Fujii-Kuriyama, Y. (2001) Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes Cells*, **6**, 361-374.
- Keith, B., Adelman, D.M. & Simon, M.C. (2001) Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 6692-6697.
- Klein, O.D., Cotter, P.D., Moore, M.W., Zanko, A., Gilats, M., Epstein, C.J., Conte, F. & Rauen, K.A. (2007) Interstitial deletions of chromosome 6q: genotype-phenotype correlation utilizing array CGH. *Clin. Genet.*, **71**, 260-266.
- Kublaoui, B.M., Gemelli, T., Tolson, K.P., Wang, Y. & Zinn, A.R. (2008) Oxytocin Deficiency Mediates Hyperphagic Obesity of Sim1 Haploinsufficient Mice. *Mol. Endocrinol.*, **22**, 1723-1734.
- Kublaoui, B.M., Holder, J.L., Jr., Gemelli, T. & Zinn, A.R. (2006a) Sim1 haploinsufficiency impairs melanocortin-mediated anorexia and activation of paraventricular nucleus neurons. *Mol. Endocrinol.*, **20**, 2483-2492.
- Kublaoui, B.M., Holder, J.L., Jr., Tolson, K.P., Gemelli, T. & Zinn, A.R. (2006b) SIM1 overexpression partially rescues agouti yellow and diet-induced obesity by normalizing food intake. *Endocrinology*, **147**, 4542-4549.
- Lawrence, D. & Pittman, Q.J. (1985) Interaction between descending paraventricular neurons and vagal motor neurons. *Brain Res.*, **332**, 158-160.
- Lynn, R.B., Kreider, M.S. & Miselis, R.R. (1991) Thyrotropin-releasing hormone-immunoreactive projections to the dorsal motor nucleus and the nucleus of the solitary tract of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **311**, 271-288.
- Maghnie, M., Cosi, G., Genovese, E., Manca-Bitti, M.L., Cohen, A., Zecca, S., Tinelli, C., Gallucci, M., Bernasconi, S., Boscherini, B., Severi, F. & Arico, M. (2000) Central diabetes insipidus in children and young adults. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 998-1007.
- Mantella, R.C., Rinaman, L., Vollmer, R.R. & Amico, J.A. (2003) Cholecystokinin and D-fenfluramine inhibit food intake in oxytocin-deficient mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **285**, R1037-R1045.

- McNay, D.E., Pelling, M., Claxton, S., Guillemot, F. & Ang, S.L. (2006) Mash1 is required for generic and subtype differentiation of hypothalamic neuroendocrine cells. *Mol. Endocrinol.*, **20**, 1623-1632.
- Michaud, J.L., Boucher, F., Melnyk, A., Gauthier, F., Goshu, E., Levy, E., Mitchell, G.A., Himms-Hagen, J. & Fan, C.-M. (2001) *Sim1* haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 1465-1473.
- Michaud, J.L., DeRossi, C., May, N.R., Holdener, B.C. & Fan, C.M. (2000) ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech. Dev.*, **90**, 253-261.
- Michaud, J.L., Rosenquist, T., May, N.R. & Fan, C.-M. (1998) Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.*, **12**, 3264-3275.
- Miedlar, J.A., Rinaman, L., Vollmer, R.R. & Amico, J.A. (2007) Oxytocin gene deletion mice overconsume palatable sucrose solution but not palatable lipid emulsions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **293**, R1063-R1068.
- Minton, J.A., Rainbow, L.A., Ricketts, C. & Barrett, T.G. (2003) Wolfram syndrome. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, **4**, 53-59.
- Mohr, E., Bahnsen, U., Kiessling, C. & Richter, D. (1988) Expression of the vasopressin and oxytocin genes in rats occurs in mutually exclusive sets of hypothalamic neurons. *FEBS Lett.*, **242**, 144-148.
- Nakai, S., Kawano, H., Yudate, T., Nishi, M., Kuno, J., Nagata, A., Jishage, K., Hamada, H., Fujii, H. & Kawamura, K. (1995) The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev.*, **9**, 3109-3121.
- Olson, B.R., Hoffman, G.E., Sved, A.F., Stricker, E.M. & Verbalis, J.G. (1992) Cholecystokinin induces c-fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons projecting to the dorsal vagal complex. *Brain Res.*, **569**, 238-248.
- Rinaman, L. (1998) Oxytocinergic inputs to the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the vagus in neonatal rats. *J. Comp. Neurol.*, **399**, 101-109.
- Rinaman, L., Vollmer, R.R., Karam, J., Phillips, D., Li, X. & Amico, J.A. (2005) Dehydration anorexia is attenuated in oxytocin-deficient mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **288**, R1791-R1799.
- Rogers, R.C. & Nelson, D.O. (1984) Neurons of the vagal division of the solitary nucleus activated by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Auton. Nerv. Syst.*, **10**, 193-197.
- Russell, T.A., Ito, M., Ito, M., Yu, R.N., Martinson, F.A., Weiss, J. & Jameson, J.L. (2003) A murine model of autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus reveals progressive loss of vasopressin-producing neurons. *J. Clin. Invest.*, **112**, 1697-1706.

- Saper, C.B., Loewy, A.D., Swanson, L.W. & Cowan, W.M. (1976) Direct hypothalamo-autonomic connections. *Brain Res.*, **117**, 305-312.
- Sawchenko, P.E. (1987) Evidence for differential regulation of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivities in parvocellular neurosecretory and autonomic-related projections of the paraventricular nucleus. *Brain Res.*, **437**, 253-263.
- Sawchenko, P.E., Imaki, T. & Vale, W. (1992) Co-localization of neuroactive substances in the endocrine hypothalamus. *Ciba Foundation Symposium*, **168**, 16-30.
- Sawchenko, P.E. & Swanson, L.W. (1982) Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **205**, 260-272.
- Schonemann, M.D., Ryan, A.K., McEvelly, R.J. & O'Connell, C.A. (1995) Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor BRN2. *Genes Dev.*, **9**, 3122-3135.
- Sjoquist, M., Huang, W., Jacobsson, E., Lee, S.L. & Ulfendahl, H.R. (1995) Natriuretic role of oxytocin in sodium homeostasis in rats. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **395**, 353-354.
- Swanson, L.W. & Kuypers, H.G. (1980) The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J. Comp. Neurol.*, **194**, 555-570.
- Swanson, L.W. & Sawchenko, P.E. (1983) Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.*, **6**, 269-324.
- Vollmer, R.R., Li, X., Karam, J.R. & Amico, J.A. (2006) Sodium ingestion in oxytocin knockout mice. *Exp. Neurol.*, **202**, 441-448.
- Waller, S.J., Ratty, A., Burbach, J.P. & Murphy, D. (1998) Transgenic and transcriptional studies on neurosecretory cell gene expression. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **18**, 149-171.
- Wang, W. & Lufkin, T. (2000) The murine otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus [In Process Citation]. *Dev. Biol.*, **227**, 432-449.
- Watts, A.G. (2001) Neuropeptides and the integration of motor responses to dehydration. *Annu. Rev. Neurosci.*, **24**, 357-384.
- Wong, L.F. & Murphy, D. (2003) Adenoviral-mediated over-expression of Brn2 in the rat paraventricular nucleus: no effect on vasopressin or corticotrophin releasing factor RNA levels. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **200**, 165-175.

- Yang, C., Gagnon, D., Vachon, P., Tremblay, A., Levy, E., Massie, B. & Michaud, J.L. (2006) Adenoviral-mediated modulation of Sim1 expression in the paraventricular nucleus affects food intake. *J. Neurosci.*, **26**, 7116-7120.
- Yue, C., Mutsuga, N., Sugimura, Y., Verbalis, J. & Gainer, H., (2008) Differential kinetics of oxytocin and vasopressin heteronuclear RNA expression in the rat supraoptic nucleus in response to chronic salt loading in vivo. *J. Neuroendocrinol.*, **20**, 227-232.
- Zhang, X., Fogel, R. & Renehan, W.E. (1999) Stimulation of the paraventricular nucleus modulates the activity of gut-sensitive neurons in the vagal complex. *Am. J. Physiol.*, **277**, G79-G90.

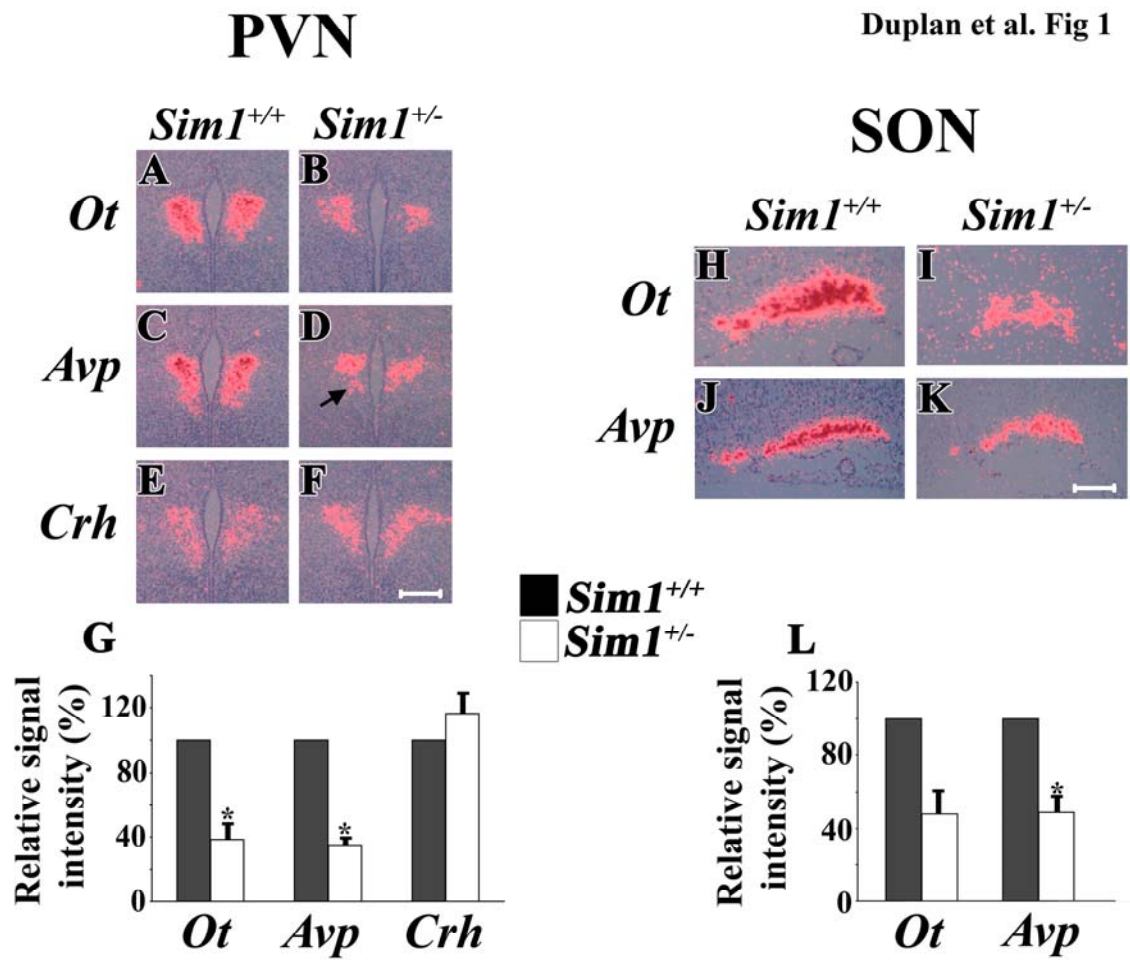


Figure 1. Decrease of *Ot* and *Avp* expression in the PVN and SON of E18.5 *Sim1*^{+/-} embryos.

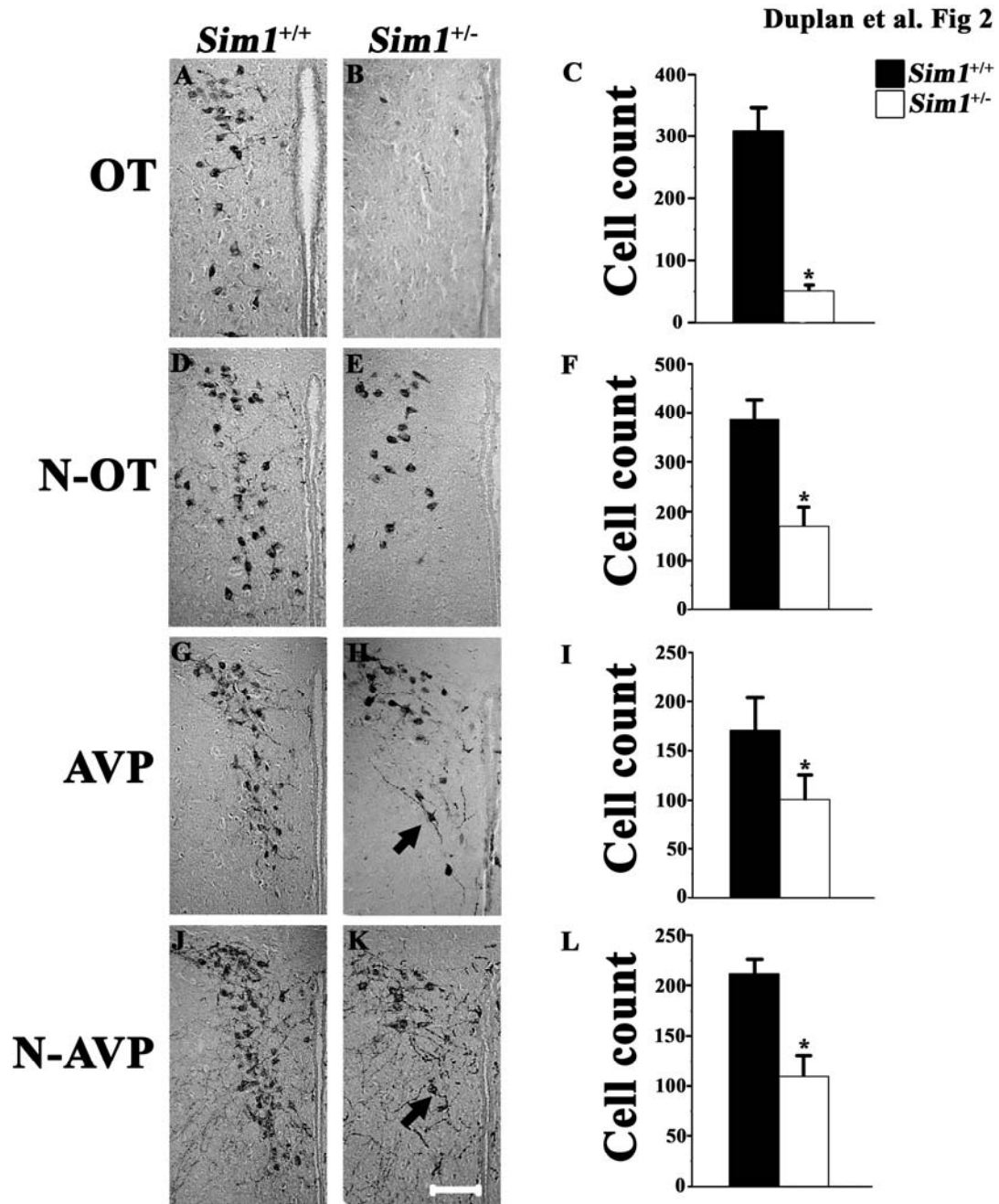


Figure 2. Decrease of OT and AVP production of in the PVN of *Sim1*^{+/-} mice.

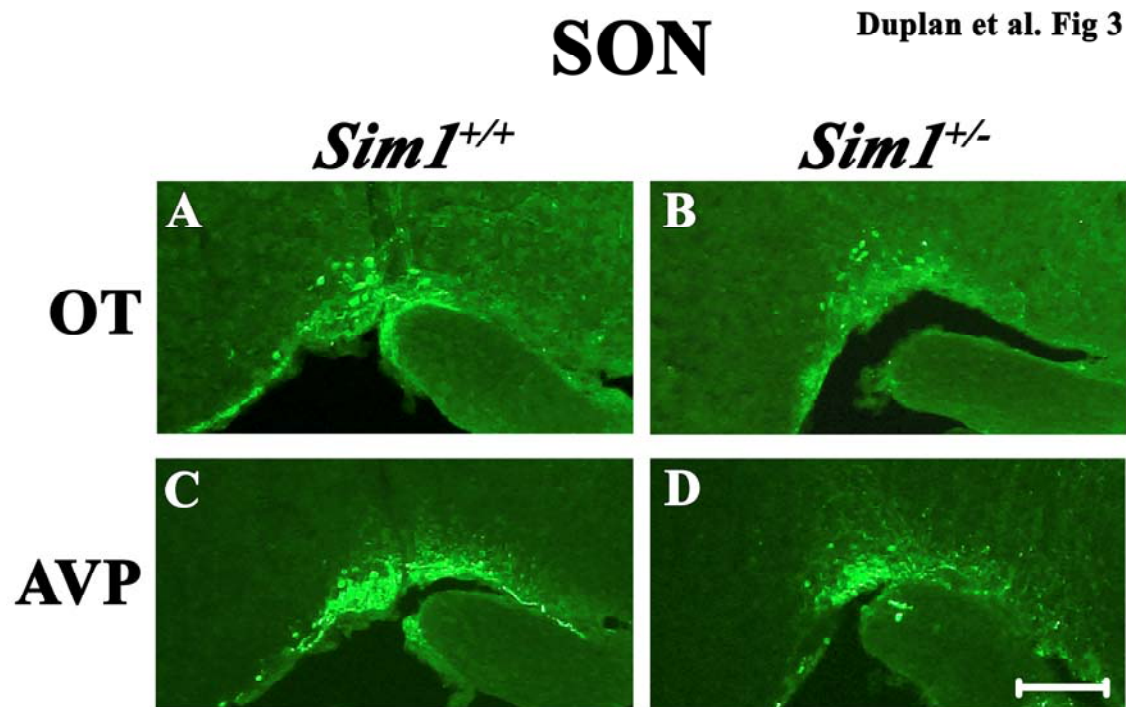


Figure 3. Decrease of OT and AVP production of in the SON of *Sim1*^{+/-} mice.

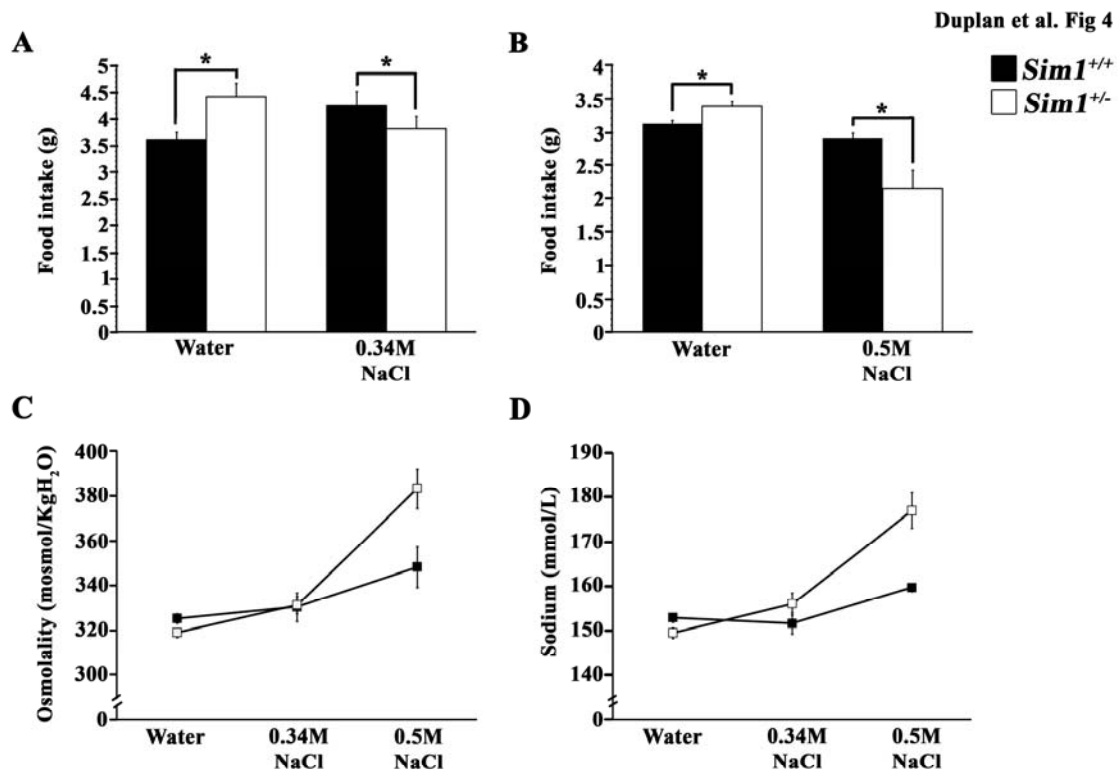


Figure 4. Impact of a 0.34M NaCl drinking solution on fluid intake, food intake

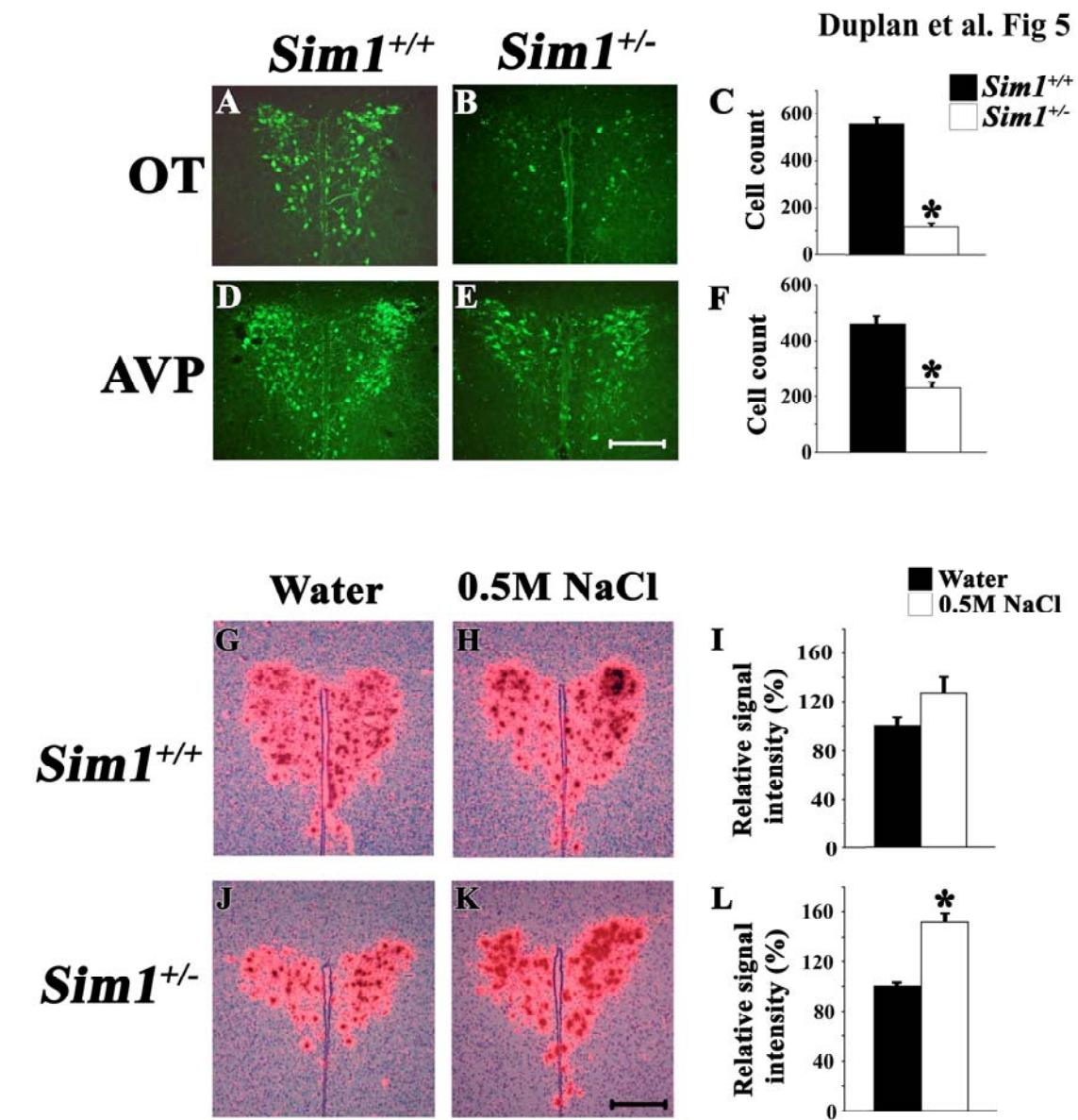


Figure 5. Expression of *Ot* and *Avp* in dehydrated *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice.

Duplan et al. Fig 6

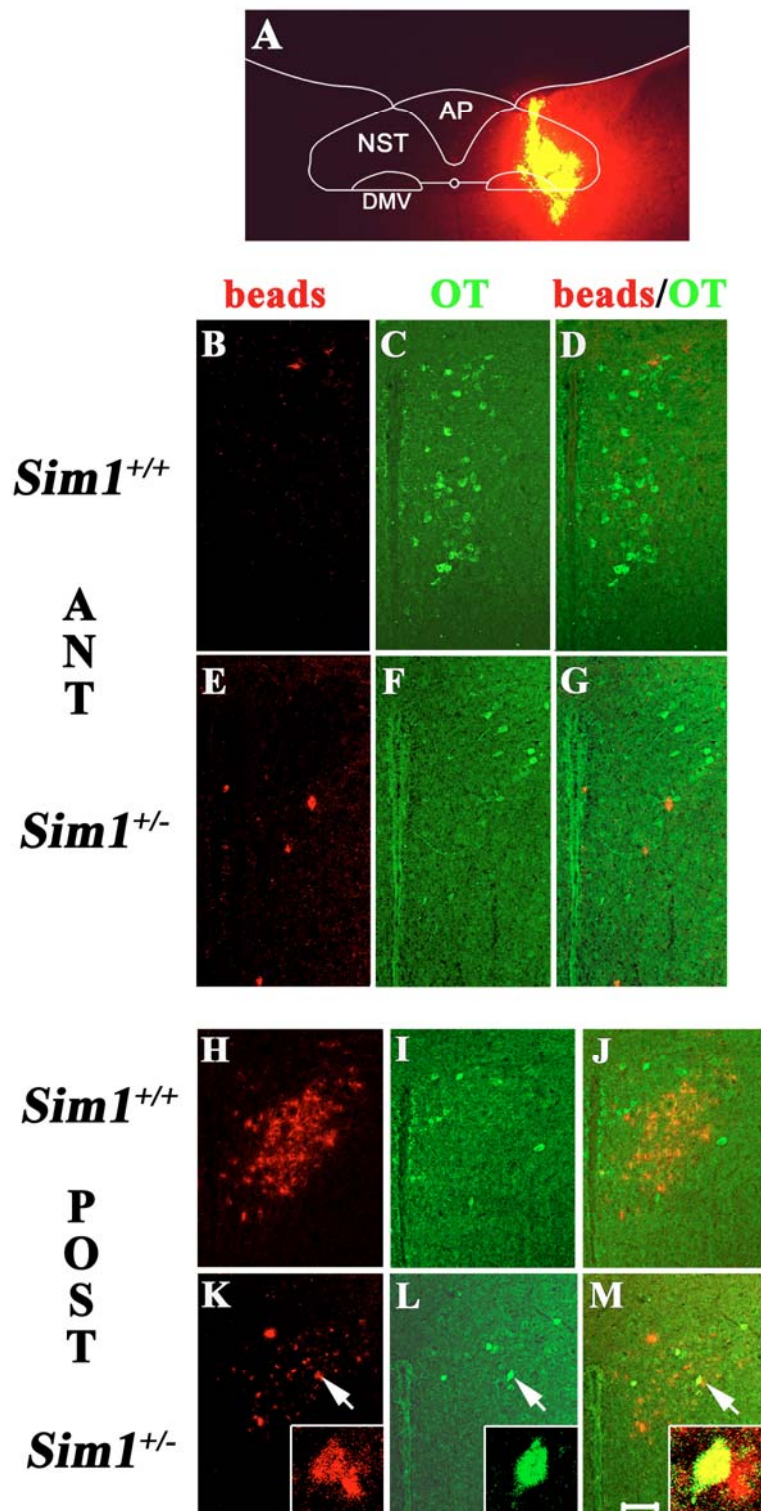


Figure 6. Retrograde labelling of PVN neurons projecting to the DVC in *Sim1*^{+/+} mice and *Sim1*^{+/-} mice.

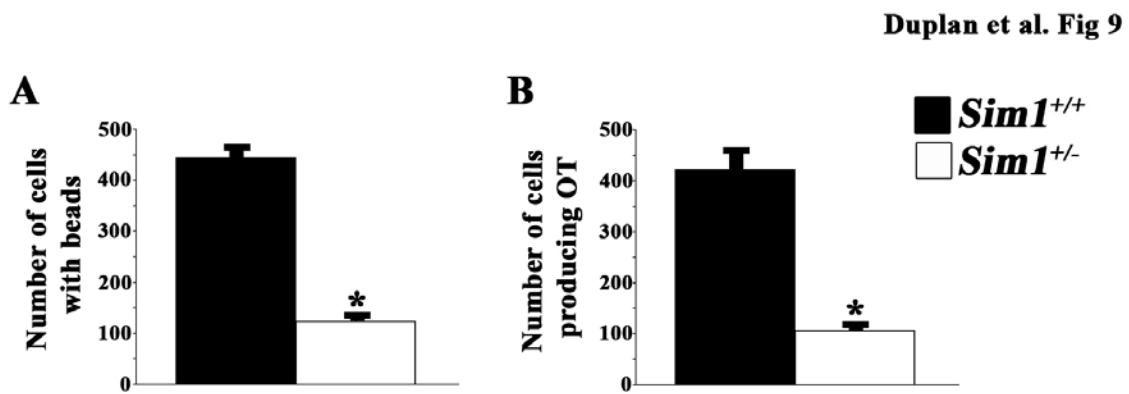


Figure 7. Quantification of PVN neurons projecting to the DVC in *Sim1*^{+/+} mice and *Sim1*^{+/-} mice.

**TROISIÈME CHAPITRE :
DEUXIÈME ARTICLE**

***Sim1* haploinsufficiency specifically affects food intake**

en préparation pour : American Journal of Physiology

***Sim1* haploinsufficiency specifically affects food intake**

Sabine Michaelle Duplan, Francine Boucher and Jacques L. Michaud

Research Center, Hôpital Sainte-Justine, Montreal

Corresponding author :

Jacques L. Michaud
Centre de Recherche
Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Sainte Catherine
Montreal (Quebec)
Phone : (514) 345-4931, ext : 6900
Fax : (514) 345-4766

ABSTRACT

Sim1 codes for a bHLH-PAS transcription factor that is specifically expressed in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Sim1* haploinsufficiency causes obesity both in mice and in humans. Here, we found that pair-fed *Sim1*^{+/-} mice do not gain more weight than littermate controls from 4 to 16 weeks of age, suggesting that hyperphagia is the main, if not the sole contributor to the obesity of *Sim1*^{+/-} mice. Analysis also showed significant increase of lean and fat mass, with hyperplasia of white adipose tissue and hypertrophy of brown adipose tissue, in *Sim1*^{+/-} mice but not in pair-fed animals. We also found increased meal size without any change in meal frequency in *Sim1*^{+/-} mice. Satiety factors have been shown to play a role in meal termination. In order to test the possibility that *Sim1*^{+/-} mice are resistant to the effect of satiety factors, we compared the impact of CCK-8 administration on food intake from 8 to 12 weeks of age in mutant and control littermates. The response to CCK-8 was similar in both groups of mice. We postulate that *Sim1*^{+/-} mice are resistant to the effects of other satiety factors than CCK-8.

INTRODUCTION

The brain controls energy homeostasis by regulating food intake and energy expenditure. Sensory input is received from the periphery in the form of circulating hormones (leptin, insulin, CCK, ghrelin), fuels (glucose, fatty acids), and vagal afferences from the gut. This information is integrated with cues from the outside world as well as with the emotional state of the organism. The brain then initiates appropriate alterations in food intake and energy expenditure with the ultimate goal of maintaining energy balance. Obesity develops when this system is imbalance. Indeed, an increase in energy intake and/or a decrease in energy expenditure have been documented in obese animals and humans.

The brain regions involved in the maintenance of energy homeostasis form a circuit that includes hypothalamic neurons, that detect peripheral signals, and the caudal brainstem (CBS) neurons, that respond to meal-related signals. Although the identity and function of the cells involved in this circuit are not well established, an increasing body of evidence suggests that neurons of the hypothalamic arcuate nucleus (ARC) and paraventricular nucleus (PVN) play a crucial role in this relay (reviewed in Broberger & Hökfelt 2001; McMinn et al., 2000a). Neurons of the ARC can be activated by peripheral signals, such as leptin and insulin. These neurons project axons to the PVN where they can produce several signals including MSH, an agonist of the melanocortin pathway. Some observations suggest that the PVN is required for energy balance. First, the PVN projects axons to the preganglionic neurons of the autonomic nervous system located in the brainstem, which have been shown to control the feeling of hunger by modulating gastric movements and secretion. Second, selective lesions in the PVN lead to marked hyperphagia and obesity in animals. Third, microinjection of several orexigenic compounds into the PVN stimulates feeding, whereas injection of anorexigenic compounds suppresses feeding. Fourth, electrophysiological studies have shown that PVN neurons can be activated by melanocortin agonists, which decrease food intake. Finally, injection of NPY and CART into the PVN has been shown to decrease BAT thermogenesis, suggesting that it can also influence energy expenditure (Kotz et al., 2000; Wang et al., 2000).

SIM1, a bHLH-PAS transcription factor, is specifically expressed in the PVN during development and after birth. Analyses of mutant mouse embryos have shown that *Sim1* functions during development by controlling the final stages of the differentiation of several neuronal cell types (Michaud et al., 1998). Indeed, in these mutants, virtually all cells of the PVN are missing and mice die shortly after birth, presumably because of these defects. In contrast, mice with only one copy of a *Sim1* mutant allele survive but show increased weight gain after 4-weeks of age with increased linear growth, hyperinsulinemia and hyperleptinemia (Michaud et al., 2001). Similarly, SIM1 haploinsufficiency also causes obesity in humans (Holder et al., 2000). Previous studies suggest that *Sim1* haploinsufficiency induces obesity in the *Sim1*^{+/-} mice by increasing food intake, without decreasing energy expenditure. However, these studies involved the use of short-term paradigms to assess energy expenditure which can miss small changes that can have an impact on the long-term. Here, we studied *Sim1*^{+/-} mice using the pair-feeding paradigm which allows dissecting the contribution of energy intake and expenditure on weight gain over a long period of time. We found that hyperphagia is a major contributor to the obesity of *Sim1*^{+/-} mice. Moreover, we found that a decrease of *Sim1* influences meal size without influencing meal frequency. All together, our results indicate that *Sim1* haploinsufficiency specifically affects feeding behaviour.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Genotyping of the *Sim1*⁻ allele has been previously described (Michaud et al., 1998). The allele was maintained on either a mixed C57/129Sv or a CD1 background. Mice were fed with a Harlan Teklab Global 19% protein extruded rodent diet (9% fat) (Harlan Teklab, Madison, WI) and kept in a controlled environment at 22°C with a 12-h light, 12-h dark cycle. For all studies, each heterozygous animal was paired with a littermate control. Also, mice were housed individually for at least 5 days before and during the whole period of the experiment. All manipulations involving mice were reviewed and approved by the Institutional Animal Care Committee of Ste-Justine Hospital in accordance with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Pair-feeding

For pair-feeding studies, trios of 4 week-old littermate mice were generated: 1) *Sim1*^{+/+} mouse fed ad libitum; 2) *Sim1*^{+/-} mouse fed with the amount of food consumed by the paired *Sim1*^{+/+} mouse over the previous 24 hours; 3) *Sim1*^{+/+} mouse fed ad libitum. Weight and food intake was measured daily for three months. At the age of 16 weeks, mice were anaesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg) after a 16h fast. Total fat content was determined by DEXA scan and blood was obtained by cardiac puncture. Mice were then sacrificed by cervical dislocation. Inguinal, retroperitoneal, and perigonadal white adipose tissue, as well as liver and scapular brown adipose tissue, were rapidly removed, weighed and either emerged immediately in 10% buffered formaldehyde or frozen in liquid nitrogen.

Meal pattern analysis

The meal pattern of both *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice was determined using the Comprehensive Lab Animal Monitoring System (CLAMS) OXYMAX (Columbus Instruments, Columbus, OH). The CLAMS is designed to measure the quantity of food that is consumed over periods of 20 minutes. Each animal were housed in calorimeter chambers equipped with the feed-scale system. The mice were allowed to familiarize to the chambers as well as to the change from pellets to powdered chow, for 3 days before measurements were taken. Each feeding event recorded (start date and time, feeding duration and the amount eaten) is exported to a central

computer and a Microsoft Excel-based program is used for data collection. Meal pattern analysis was defined using the following criteria. The size of an individual meal was defined as the consumption of at least 0.05g of the powdered chow over a period of 20 minutes that was separated from the end of the previous meal by a period of at least 20 minutes during which food intake was less than 0.05 g. Average meal size was calculated by dividing the number of feeding bouts (individual meals) by the total amount of food consumed (in grams) over a test period (24 hours).

Biochemical and histological analyses

Blood glucose levels were determined with a Precision QID device whereas blood insulin levels were measured with an immunoassay, according to the manufacturer's instructions (ALPCO).

For histology, brown adipose tissues was embedded in paraffin, after fixation, and sectioned at 8 μ m. After staining with haematoxylin and eosin, the total surface occupied by the lipid droplets was measured using the Image Pro Plus software.

Microinjection and feeding assays

Melanocortin agonist MTII (3 μ g/mouse; phoenix Pharmaceuticals, Belmont, CA) and mouse leptin (5 μ g /mouse; R&D Systems Inc., Minneapolis, MN) were dissolved in 0.9% sterile saline. A within-subjects crossover design was used whereby each animal served as its own control. Intracerebroventricular injections of either saline (0.9%) or MTII or leptin were performed on 16 hours fasted mice to stimulate feeding during the daytime experimental period. Substances were administered to anaesthetize (isoflurane) mice through a 30-gauge stainless steel injector connected by polyethylene tubing to a Hamilton syringe (Fisher Scientific). Saline (0.9%) or MTII or leptin was slowly injected in a volume of 2- μ l over 1 minute. An additional minute was allowed for diffusion and prevention of backflow through the needle track before the injector was withdrawn. Mice were immediately replaced in their home cage to recover from anaesthesia. Twenty minutes post-injection, mice were given free access to a pre-weighted food pellet. Food intake was assessed every hour for 5 hours after injection as well as 24 hours post-injection. For the injection with leptin, food intake was also measured 48 hours post-injection.

Injections were separated by at least 3 days to allow re-establishment of body weight and feeding pattern as well as complete washout of the peptide injected.

Intraperitoneal injection

Male *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice of 4 and 7 weeks of age were used to test food intake in response to intraperitoneal injection of either Melanocortin agonist MTII (Bachem) or cholecystokinin-8 (CCK-8) (Sigma, St-Louis, MO), respectively. A within-subjects crossover design was used whereby each animal served as its own control. Mice from the same littermates were housed individually, handled daily care and allowed to acclimate to this condition for the week before and during each experimental protocol. Before experiments, the mice were manipulated by intraperitoneal injection of saline (0.9%) once a day for 7 days to allow the mice to acclimate to the experimental procedure and reduce the non-specific stress effect on feeding.

For CCK-8 injections, after fasting for 16 hours with water available, the mice received either intraperitoneal injected saline (0.9%) or CCK-8 (3.5 µg /kg) dissolved in saline. Pre-weighted chow was given 10 minutes after the injection and food intake was measured each 30 minutes for a 2 hours period as well as 24 hours post-injection. Mice were weighted before and after 16 hours fasting and again at the end of the 2 hours feeding period. Testing was done every 2-3 days to allow mice to recover initial body weight between each 16 hours fast and complete washout of the injected peptide. Peptides were thawed immediately before the injections and kept on ice for the duration of the injections.

For MTII injections, food was removed 3 hours prior to the onset of the dark cycle (15h00). At the onset of the dark cycle (18h00), mice were injected intraperitoneally with either saline (0.9%) or MTII (5mg/kg; 100 µg/mouse) dissolved in saline. Food intake was measured every hour for up to 4 hours and 24 hours post-injection. The experiments were done on 2 separated days separated by 2-3 days to allowed complete washout of the injected peptide.

Statistics

Results were expressed as means \pm SEM. The Student's t-test was used where comparisons were restricted to two groups. Multistatistical analysis were obtained by One way ANOVA, followed by post hoc Student-Newman-Keuls multiple comparison test. P values reported differences between group means and were considered significant when less than 0.05.

RESULTS

Penetrance of the *Sim1*⁻ allele on three backgrounds.

The obese phenotype associated with the *Sim1* mutation was initially studied on a mixed 129Sv-C57Bl/6 background (Michaud et al., 2001). In order to determine whether the genetic environment influences the expression of the phenotype, we performed 7 backcrosses to transfer the mutation on 129S/v, C57Bl/6 and CD1 backgrounds. As shown in figure 1, increased weight gain was first observed between 4 and 8 weeks of age for all backgrounds in male mice as well as in 126SV*Sim1*^{tlz} females, as it was also found for the mixed 129Sv-C57Bl/6 background on which the mutation was initially studied. Increased weight gain become different statistically between *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} female mice of CD1*Sim1*^{tlz} and C57*Sim1*^{tlz} background between 8 and 12 weeks of age. Thus, the phenotype is penetrant on all three backgrounds. Of note, the *Sim1* allele could not be maintained on the C57Bl/6 since these animals became infertile after the seventh backcross. For the following studies, we chose to use the CD1 strain because of its higher fertility.

Paired-feeding of *Sim1*^{+/-} mice

We took advantage of the pair-feeding paradigm in order to determine whether increased food intake is the sole basis of the obesity of *Sim1*^{+/-} mice. For each gender, we generated trios of littermates, composed of two *Sim1*^{+/-} and one *Sim1*^{+/+} mice. The food intake of one *Sim1*^{+/-} and of the *Sim1*^{+/+} mouse was measured daily from four weeks to 16 weeks of age. During that period, the other *Sim1*^{+/-} mouse was fed the same amount of food as that consumed by the *Sim1*^{+/+} mouse over the previous 24 hours.

Both male and female *Sim1*^{+/-} mice fed ad libitum consistently consumed more food per day than *Sim1*^{+/+} controls (Fig 2). Food consumption of *Sim1*^{+/-} males started to be significantly greater than that of their littermate controls at 5th weeks of age while food consumption of *Sim1*^{+/-} females was significantly greater from the 7th weeks and on. *Sim1*^{+/-} mice that were paired-fed consistently ate all the food that was presented to them. Body weight of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice fed ad libitum becomes significantly different at 6 weeks old, for males, and 8 weeks old, for females (Fig. 2). The body weight of paired-fed *Sim1*^{+/-} mice was not significantly different from that of

Sim1^{+/-} mice during the whole period of food restriction, suggesting that increased food intake is the main factor underlying the obesity associated with *Sim1* haploinsufficiency.

Dexascan measurements, performed at 16 weeks of age, showed that the fat mass of *Sim1*^{+/-} males and females fed ad libitum was increased by two and three fold, respectively, when compared to that of *Sim1*^{+/+} controls (Fig. 3A-D). In contrast, the fat mass of *Sim1*^{+/-} paired-fed males and females was not significantly different from that of *Sim1*^{+/+} littermates. Similarly, the lean mass of *Sim1*^{+/-} males and females fed ad libitum increased by more than 15% and 20 %, respectively, when compared to that of controls, whereas that of *Sim1*^{+/-} paired-fed was also not significantly different than that of *Sim1*^{+/+} littermates.

Mice were sacrificed after Dexascan measurements. Weight of white adipose tissue (WAT) of males and females was measured (Fig. 3E,F). The WAT of *Sim1*^{+/-} males was increased by 2.3- and 1.6-fold when compared to that of *Sim1*^{+/+} controls and *Sim1*^{+/-} pair-fed mice, respectively. The WAT of *Sim1*^{+/-} pair-fed males was increased by 1.5-fold when compared to that of *Sim1*^{+/+} controls but this difference was not significant. A similar pattern was observed in females. WAT of *Sim1*^{+/-} females was increased by 7- and 3.5-fold when compared to that of *Sim1*^{+/+} controls and *Sim1*^{+/-} pair-fed mice, respectively. *Sim1*^{+/-} pair-fed females also showed a 2-fold increased of their WAT pads when compared to controls but this difference was not significant. Histological analysis of WAT did not detect any difference between the diameters of adipocytes found in the three groups of mice, suggesting that increased WAT is caused by hyperplasia, not hypertrophy, of adipocytes (not shown).

BAT was weighed only in males. It was increased in *Sim1*^{+/-} males fed ad libitum by 2.4 fold when compared to *Sim1*^{+/-} pair-fed and *Sim1*^{+/+} males whereas no significant difference was observed between the BAT of *Sim1*^{+/+} controls and *Sim1*^{+/-} pair-fed mice (Fig. 3G-K). Histologically, BAT adipocytes of *Sim1*^{+/-} males were hypertrophied when compared to those of *Sim1*^{+/+} males (Fig. 3G,I). BAT adipocytes of *Sim1*^{+/-} pair-fed males also appeared somewhat hypertrophied on inspection of histological sections. However, quantification of the total area occupied by the lipid

droplet of BAT did not show significant difference between *Sim1*^{+/-} pair-fed and *Sim1*^{+/+} males (Fig 3K).

Plasma insulin levels of *Sim1*^{+/-} and *Sim1*^{+/-} pair-fed males were significantly lower than those of *Sim1*^{+/-} males fed ad libitum whereas blood glucose levels of the three groups of mice showed no significant difference (Table 1).

Meal pattern of *Sim1*^{+/-} mice

In order to characterize the meal pattern associated with *Sim1* haploinsufficiency, we housed *Sim1*^{+/-} and *Sim1*^{+/+} males individually in metabolic cages equipped to continuously measure intake of powdered chow. *Sim1*^{+/-} mice exhibited a 41% increase of food intake over 24 hours relative to *Sim1*^{+/+} mice ($4.57 \pm 0.32\text{g}$ vs $3.24 \pm 0.38\text{g}$; $P < 0.05$; $n=6$). Both nocturnal and diurnal food consumption was found to be increased in *Sim1*^{+/-} mice. Meal number was not significantly different between the two genotypes but diurnal and nocturnal meal size was increased in *Sim1*^{+/-} mice when compared to littermate controls (Fig 4). The hyperphagia of *Sim1*^{+/-} mice is therefore characterized by the consumption of a normal number of excessively large meals.

Effect of leptin administration on the food intake of *Sim1*^{+/-} mice

We next sought to determine whether the hyperphagia of *Sim1*^{+/-} mice is caused by a decreased sensitivity of the hypothalamus to peripheral signals. We previously found that blood leptin levels are increased in these mice, suggesting some resistance to its action (). At least two mechanisms have been proposed to explain leptin resistance in obesity, namely a reduction of its transport across the blood brain barrier and a decrease of its signalling in the brain. In an attempt to verify whether the hyperleptinemia of *Sim1*^{+/-} mice is caused by a central resistance to the action of leptin, we examined the impact of the intracerebroventricular (ICV) administration of leptin on food intake in *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice. ICV injection of 5 μg of leptin decreased food intake over the first 5 hours by $32.8 \pm 4.1\%$ and $45.3 \pm 3.4\%$ in *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice, respectively, in comparison to the effect of saline injection (Fig 5A). This effect was sustained for 24 hours but was no longer significant by 48 hours. One day after injection, body weights of leptin-treated *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice decreased by $1.38 \pm 0.07\text{g}$ and $1.53 \pm 0.27\text{g}$, respectively, which

corresponds to a loss of $6,1 \pm 0,34\%$ and $5,5 \pm 1,08\%$ when compared to their initial weight (Fig 5B). Body weight lost was in the range (3-5%) of that reported by others for the same paradigm (Lin et al., 2000). Collectively, these results suggest that *Sim1*^{+/-} mice are sensitive to the central effect of leptin.

***Effect of MTII administration on the food intake of Sim1*^{+/-} mice**

Some observations suggest that the melanocortin pathway functions downstream of leptin in the hypothalamus while others suggest that these pathways can also function in parallel. Even though *Sim1*^{+/-} mice are sensitive to the central effect of leptin, it is thus possible that melanocortin signalling is disrupted in these mice. In order to determine whether *Sim1*^{+/-} mice are sensitive to melanocortin signalling, we examined the impact of the administration of MTII, an agonist of the melanocortin receptor 4, on the food intake of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice. For these experiments, we studied CD1 as well as C57/129SV mice. Food intake was measured at different time points after the intraperitoneal administration of MTII at the onset of the dark period. We observed a dramatic reduction of the food intake of both *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice at 1, 2, 3 and 4 hours after MTII administration (Fig 6). The magnitude of the suppression decreased progressively with time and the effect of MTII waned by 24 hours. *Sim1*^{+/-} mice of both backgrounds consistently ate more than their littermate controls over the first 4 hours after MTII administration. For instance, 3 hours post-injection, the food intake of C57/129SV *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice was decreased by 77 % and 52 %, respectively, when compared to that observed after saline injection. At all time points, the difference of food intake after MTII administration between mice of both genotypes, however, was not statically different.

***Effect of cholecystokinin administration on the food intake of Sim1*^{+/-} mice**

The increase in meal size without any change in meal frequency observed in *Sim1*^{+/-} mice suggests decreased sensitivity to the effect of satiety factors. In order to explore this possibility, we chose to study the effect of the administration of cholecystokinin-8s (CCK-8), a potent satiety factor, on the food intake of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice. Intraperitoneal CCK-8 administration after a 16-h fast reduced food intake over the first 30 minutes of re-feeding in 8 week-old *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice (Fig 7). The effect of CCK-8 appeared to be more important in *Sim1*^{+/-} mice when

compared to littermate controls but this difference did not reach significance. In order to determine whether this difference is reproducible, we repeated the experiments at 9, 10, 11 and 12 weeks of age using the same mice. At all these time points, CCK-8 administration also reduced re-feeding over the first 30 minutes following the injection but we observed no consistent or significant difference between mice of the two genotypes. The suppressive effect of CCK-8 is restricted to the initial 30 minutes period (Fig. 7) because no suppression of food intake was observed during the following time points, i.e. 60, 90 and 120 minutes as well as 24 hours post-injection (data not shown).

DISCUSSION

Sim1 haploinsufficiency causes obesity both in mice and humans. A decrease of *Sim1* appears to disrupt energy balance by perturbing the function of the PVN. Since the PVN has been associated with the control of food intake as well as with the regulation of energy expenditure, an important question is whether *Sim1* haploinsufficiency affects these two processes. We have previously established that *Sim1*^{+/-} mice are hyperphagic (Michaud et al., 2001). We have also found that these mice display normal levels of physical activity, can maintain their body temperature in a cold environment and show levels of oxygen consumption that are comparable to those of littermate controls (Michaud et al., 2001). Collectively, these observations suggest that *Sim1* haploinsufficiency does not decrease energy expenditure. However, the paradigms used in these experiments evaluate energy expenditure on short periods of times. Small changes in energy expenditure, which could have an impact on energy balance on the long-term, could be missed by short-term evaluations. Here, we used a complementary approach, the pair-feeding paradigm, to assess energy expenditure on a long period of time in *Sim1*^{+/-} mice. Our results suggest that hyperphagia is the main, if not the sole mechanism of obesity in *Sim1*^{+/-} mice. Detailed analysis showed mild increase of the WAT and BAT in the *Sim1*^{+/-} mice that were pair-fed. However, these changes were not statistically significant. Although we cannot completely exclude the possibility that *Sim1* haploinsufficiency influences peripheral metabolism, this effect would be subtle and would not affect weight gain.

***Sim1* and the melanocortin pathway**

Sim1 heterozygous mice show a phenotype that is similar to that of the agouti yellow *Ay* and *Mc4r* knockout mice. These mice also exhibit hyperphagia, obesity, increased linear growth, and susceptibility to diet-induced obesity (Huszar et al., 1997; Lu et al., 1994; Michaud et al., 2001). However, in contrast to *Sim1*^{+/-} mice, they also show decreased energy expenditure (Huszar et al., 1997; Lu et al., 1994; Michaud et al., 2001). *Mc4r*, which codes for a melanocortin receptor, is expressed in several areas of the hypothalamus, including the PVN. Restoration of *Mc4r* gene expression specifically in the PVN, using a *Sim1*-cre transgene, completely normalized food intake of *Mc4r* knockout mice, without affecting energy expenditure (Balthazar et al., 2005). These observations indicate that the PVN harbours a

pathway that specifically influences food intake without affecting energy expenditure. Our characterization of *Sim1*^{+/-} mice further strengthens this conclusion.

Kublaoui et al. (2006) reported that *Sim1* heterozygous mice are resistant to the anorectic action of melanocortin signalling (Kublaoui et al., 2006). This experiment suggests that *Sim1* influences food intake by acting along the Mc4r pathway. We indeed found that *Sim1*^{+/-} mice tend to be resistant to the effects of MTII when compared to littermate controls but this difference did not reach statistical significance. Variable effects of centrally administered MTII in modulating food intake in rats with PVN lesions have also been reported (Dube et al., 2006; Choi et al., 1999; Wang et al., 2007). The different results observed between these studies may be due to the different methods to disable the PVN, the time interval between lesioning treatment and the injection time of the neuropeptides and the animal gender. In this regard, our study used mice aged 4 weeks old, an age when food consumption of *Sim1*^{+/-} mice is not significantly different from that of *Sim1*^{+/+} mice whereas Kublaoui et al. used mice from 6 to 8 weeks of age (Kublaoui et al., 2006). Insensitivity to MTII may develop with time as weight of mutant animals increases. Similarly, age-related changes in leptin responsiveness has been described in *Mc4r*^{-/-} mice, where young *Mc4r*^{-/-} mice were reported to be sensitive to leptin injection in contrast to older animals (Marsh et al., 1999).

Meal termination in *Sim1*^{+/-} mice

In this study, we found that in addition to exhibiting larger meal size than wild type mice, *Sim1*^{+/-} mice exhibit a meal pattern that is consistent with a defect in signals involved in meal termination. Satiety factors play an important role for meal termination. The hyperphagia observed in *Sim1*^{+/-} mice could thus be caused by their inability to respond to satiety signals. One potential signal known to be involved in meal termination is CCK (Blevins et al., 2004; Crawley & Schwaber, 1983; Reidelberger, 1992; Smith et al., 1981). We thus hypothesized that *Sim1*^{+/-} mice would be less sensitive to the satiation effect of exogenous CCK than wild type littermates. Contrary to this hypothesis, we found that *Sim1*^{+/-} mice were at least as sensitive than *Sim1*^{+/+} mice to the effect of CCK.

Sensitivity to CCK-8 has been previously reported in *ob/ob* male mice as well as in *Mc4r* knockout mice, although in the latter insensitivity has also been demonstrated (Strohmayr & Smith, 1981; 1986; Vaughan et al., 2006; Fan et al., 2004). A synergistic relationship between leptin and CCK in reducing food intake has been proposed as a probable mechanism for CCK sensitive response (Barrachina et al., 1997; Matson et al., 1997; McMinn et al., 2000b; Wang et al., 2000). In this regard, it has been shown that fasted rats with lower plasma levels of leptin show an attenuated anorectic effect of CCK (McMinn et al., 2000b) while increased leptin due to obesity can produce increased efficacy of CCK (McLaughlin & Baile, 1980). *Sim1* heterozygous mice exhibit high endogenous leptin levels as early as eight weeks of age (Michaud et al., 2001). Thus, the normal sensitivity of *Sim1*^{+/-} mice to the satiety effect of CCK-8 may be explained by their increased production of leptin. We postulate that *Sim1*^{+/-} mice are resistant to other satiety factors that remain to be identified.

REFERENCES

Balthasar N, Dalgardard LT, Lee CE, Yu J, Funahashi H, Williams T, Ferreira M, Tang V, McGovern RA, Kenny CD, Christiansen LM, Edelstein E, Choi B, Boss O, Aschkenasi C, Zhang CY, Mountjoy K, Kishi T, Elmquist JK and Lowell BB. Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123(3): 493-505, 2005.

Barrachina MD, Martinez V, Wang L, Wei JY and Taché Y. Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10455-10460, 1997.

Blevins JE, Schwartz MW and Baskin DG. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R87-R96, 2004.

Broberger C and Hökfelt T. Hypothalamic and vagal neuropeptide circuitries regulating food intake. *Physiol Behav* 74: 669-682, 2001.

Choi S, Sparks R, Clay M and Dallman MF. Rats with hypothalamic obesity are insensitive to central leptin injections. *Endocrinol* 140: 4426-4433, 1999.

Crawley JN and Schwaber JS. Nucleus tractus solitarius lesions block the behavioural actions of cholecystokinin. *Peptides* 4: 743-747, 1983.

Dube MG, Kalra SP and Kalra PS. The hypothalamic paraventricular nucleus is not essential for orexigenic NPY or anorexigenic melanocortin action. *Peptides* 27(9): 2239-2248, 2006.

Fan W, Ellacott KLJ, Halatchev IG, Takahashi K, Yu P and Cone RD. Cholecystokinin-mediated suppression of feeding involves the brainstem melanocortin system. *Nat Neuroscience* 7(4): 335-336, 2004.

Holder JL, Butte NF and Zinn AR. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the *SIM1* gene. *Hum Mol Genet* 9(1): 101-108, 2000.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P and Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-141, 1997.

Kotz CM, Glass MJ, Levine AS and Billington CJ. Regional effect of naltrexone in the nucleus of the solitary tract in blockade of NPY-induced feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R499-503, 2000.

Kublaoui BM, Holder JL, Gemelli T and Zinn AR. *Sim1* haploinsufficiency impairs melanocortin-mediated anorexia and activation of paraventricular nucleus neurons. *Mol Endocrinol* 20(10): 2483-2492, 2006.

Lin S, Thomas TC, Storlien LH and Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes* 24: 639-646, 2000.

Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkinson WO and Cone RD. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371: 799-802, 1994.

Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Laufer R, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P and Palmiter RD. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet* 21: 119-122, 1999.

Matson CA, Wiater MF, Kuijper JL and Weigle DS. Synergy between leptin and cholecystokinin (CCK) to control daily caloric intake. *Peptides* 18(8): 1275-1278, 1997.

McLaughlin CL and Baile CA. Feeding response of weaning Zucker obese rats to cholecystokinin and bombesin. *Physiol Behav* 25(3): 341-346, 1980.

McMinn JE, Baskin DG and Schwartz MW. Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight. *Obesity reviews* 1: 37-46, 2000a.

McMinn JE, Sindelar DK, Havel PJ and Schwartz MW. Leptin deficiency induced by fasting impairs the satiety response to cholecystokinin. *Endocrinol* 141: 4442-4448, 2000b.

Michaud JL, Boucher F, Melnyk A, Gauthier F, Goshu E, Lévy E, Mitchell GA, Himms-Hagen J and Fan CM. *Sim1* haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* 10(14): 1465-1473, 2001.

Michaud JL, Rosenquist T, May NR and Fan CM. Development of the neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev* 12: 3264-3275, 1998.

Reidelberger RD. Abdominal vagal mediation of the satiety effects of exogenous and endogenous cholecystokinin in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 263: R1-R5, 1992.

Smith GP, Jerome C, Cushin BJ, Eterno R and Simansky KJ. Abdominal vagotomy blocks the satiety effect of cholecystokinin in the rat. *Science* 213: 1036-1037, 1981.

Strohmayr AJ and Smith GP. Cholecystokinin inhibits food intake in genetically obese (C57BL/6j-ob) mice. *Peptides* 2(1): 39-43, 1981.

Strohmayr AJ and Smith GP. Obese male mice (ob/ob) are normally sensitive to the satiating effect of CCK-8. *Brain Res Bull* 17: 571-573, 1986.

Vaughan CH, Haskell-Luevano C, Andreasen A and Rowland NE. Effects of oral preload, CCK or bombesin administration on short term food intake of melanocortin-4 receptor knockout (MC4RKO) mice. *Peptides* 27(12): 3226-3233, 2006.

Wang C, Billington CJ, Levine AS and Kotz CM. Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. *Neuroreport* 11: 3251-3255, 2000.

Wang J, Ling S, Usami T, Murata T, Narita K and Higuchi T. Effects of ghrelin, corticotrophin-releasing hormone, and melanocortan-II on food intake in rats with paraventricular nucleus lesions. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 115: 669-673, 2007.

Wang L, Barrachina MD, Martinez V, Wei JY and Taché Y. Synergistic interaction between CCK and leptin to regulate food intake. *Regul Peptides* 92: 79-85, 2000.

Table 1. Plasma insulin and glucose levels in *Sim1*^{+/+}, *Sim1*^{+/-} paired-fed and *Sim1*^{+/-} males

Measure	<i>Sim1</i> ^{+/+}	<i>Sim1</i> ^{+/-} paired-fed	<i>Sim1</i> ^{+/-}
Insulin (ug/L)	0.96 ± 0.17	2.1 ± 1.24	6.48 ± 1.75*
Glucose (mmol/L)	6.56 ± 0.39	7.26 ± 0.7	8.56 ± 0.67

Results are presented as means ± S.E.M., n=8.

*Values significantly different from *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} paired-fed with P < 0.05

LEGENDS

Figure 1. **The *Sim1*⁻ allele is penetrant on three distinct backgrounds.** Weight curves of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice with different genetic backgrounds. An asterisk (*) indicates a P value less than 0.001 (n=7, except for C57: females n=5 and males n=10).

Figure 2. **Pair feeding of *Sim1*^{+/-} mice.** (A,B) Weekly body weight of trios of male (A) or female (B) littermates composed of: 1) *Sim1*^{+/+} mice fed ad libitum (black squares); 2) *Sim1*^{+/-} mice fed ad libitum (white squares); and 3) *Sim1*^{+/-} mice that were fed the same amount of food as that consumed by the *Sim1*^{+/+} littermate over the previous 24 hours (white losanges). An asterisk (*) indicates a significant difference between the weight of *Sim1*^{+/+} or paired-fed *Sim1*^{+/-} mice and *Sim1*^{+/-} mice fed ad libitum (P<0.01) (n=8 trios of male and 8 trios of female mice). (C,D) Weekly food intake of *Sim1*^{+/+} (black bars) and *Sim1*^{+/-} (white bars) males (C) and females (D) fed ad libitum. An asterisk (*) indicates a significant difference between the food intake of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} mice (P<0.01).

Figure 3. **Body fat and lean mass of *Sim1*^{+/+}, *Sim1*^{+/-} pair-fed and *Sim1*^{+/-} mice.** (A-D) Dexascan measurements of total fat (A,B) and lean (C,D) mass of *Sim1*^{+/+} (black bars), *Sim1*^{+/-}-paired-fed (gray bars) and *Sim1*^{+/-} (white bars) male and female mice. An asterisk (*) indicates significant difference between *Sim1*^{+/-} mice fed ad libitum and *Sim1*^{+/-} paired-fed or *Sim1*^{+/+} mice (** P<0.001). (E,F) Total weight of white adipose tissue (WAT), including retroperitoneal, perigonadal and inguinal white fat pads, of 16-week-old *Sim1*^{+/+}, *Sim1*^{+/-} pair-fed and *Sim1*^{+/-} male and female mice. (G-K) Analysis of brown adipose tissue (BAT) from 16-week-old *Sim1*^{+/+}, *Sim1*^{+/-} pair-fed and *Sim1*^{+/-} male mice. (G-I) Histological section of BAT. (J) Weight of the BAT. (K) Size of the BAT. * P< 0.01 and ** P< 0.001. Eight trios of male and 8 trios of female mice were used for all analyses.

Figure 4. **Nocturnal and diurnal meal pattern of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice.** Data are based on food intake measured continuously over a 24-hour period in mice housed individually. Average nocturnal and diurnal meal size (B and D) of *Sim1*^{+/-} (white bars) are significantly larger than those of *Sim1*^{+/+} (black bars) male mice. (*)

$P < 0.01$; ** $P < 0.001$). Nocturnal and diurnal meal number (A and C) are not significantly different between both genotypes. (n=6 mice for each genotype).

Figure 5. Intracerebroventricular injection of leptin suppresses cumulative food intake and body weight of CD57/129SV *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice. (A) *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice were injected with either saline or leptin after 16 hours food deprivation. Cumulative food intake was measured 5, 24 and 48 hours after injection. Data compared food intake after leptin injection with previous day's saline. In mice of both genotypes, leptin significantly decreases cumulative food intake compared with saline injection at 5 and 24 hours. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$). No significant differences were observed between genotype after injection of leptin at any time measured ($P > 0.05$). (B) Body weight of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice measured at 5, 24 and 48 hours following saline or leptin injection. (n=6).

Figure 6. Intraperitoneal injection of MTII suppresses cumulative food intake of CD1 and C57/129SV *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice. *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice were injected with either saline or MTII at the onset of the dark cycle. Cumulative food intake was measured 1, 2, 3, 4 and 24 hours after injection. Data compared food intake after MTII i.p. injection with previous day's saline. In mice of both genotypes, i.p. injection of MTII significantly decreased cumulative food intake compared with saline injection from 1 to 4 hours. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$). However, no significant differences were observed between genotypes after i.p. injection of MTII at any time measured ($P > 0.05$). (CD1: n=10; C57/129SV: n=6).

Figure 7. CCK-8 suppress food intake of C57/129SV *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice. *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice were injected with saline or CCK-8 after 16-hours food deprivation. Food intake measurements were done every 30 minutes after injection and reintroduction of food. Data compared food intake after CCK-8 injection with the previous day's saline. Mice of both genotypes treated with CCK-8 consumed less food than when treated with saline during the first 30 minutes. This decrease in food intake last from 8 to 12 weeks of age. In mice of both genotypes, CCK-8 significantly decreased cumulative food intake compared with saline injection with * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. (n=8 mice for each genotype).

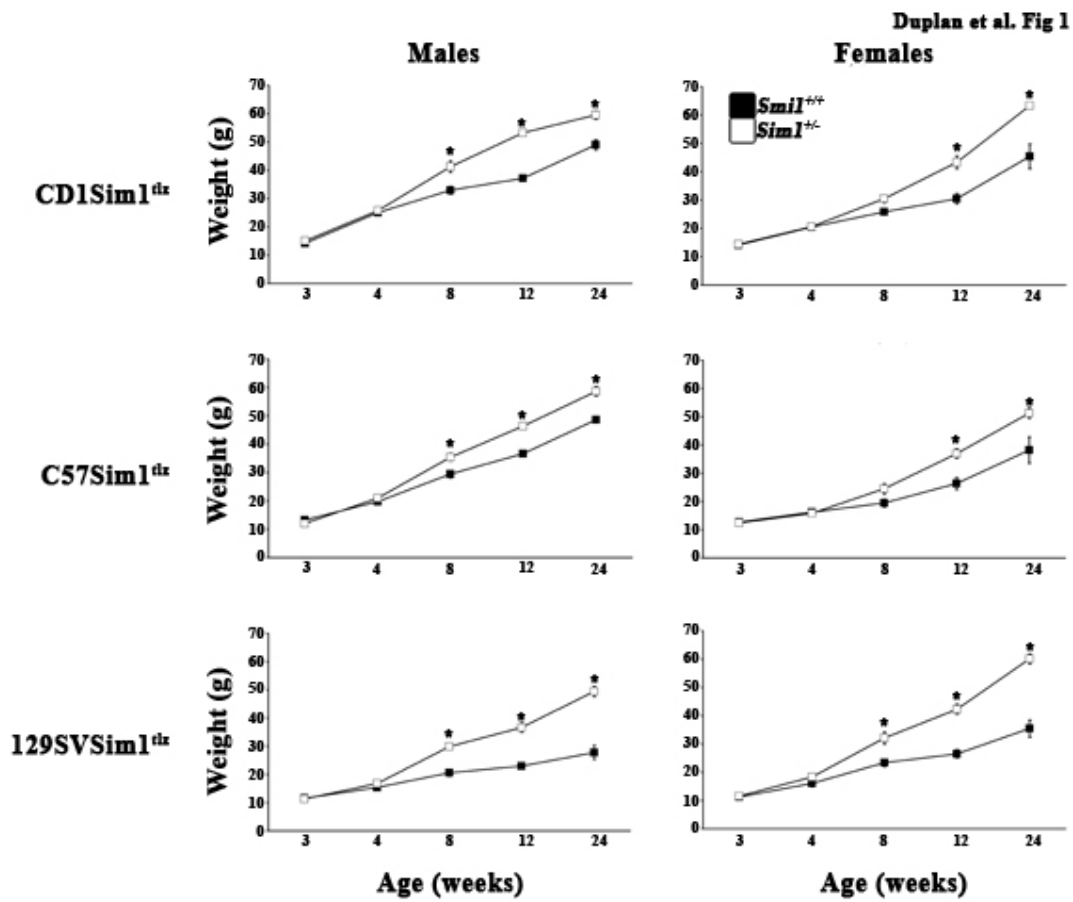
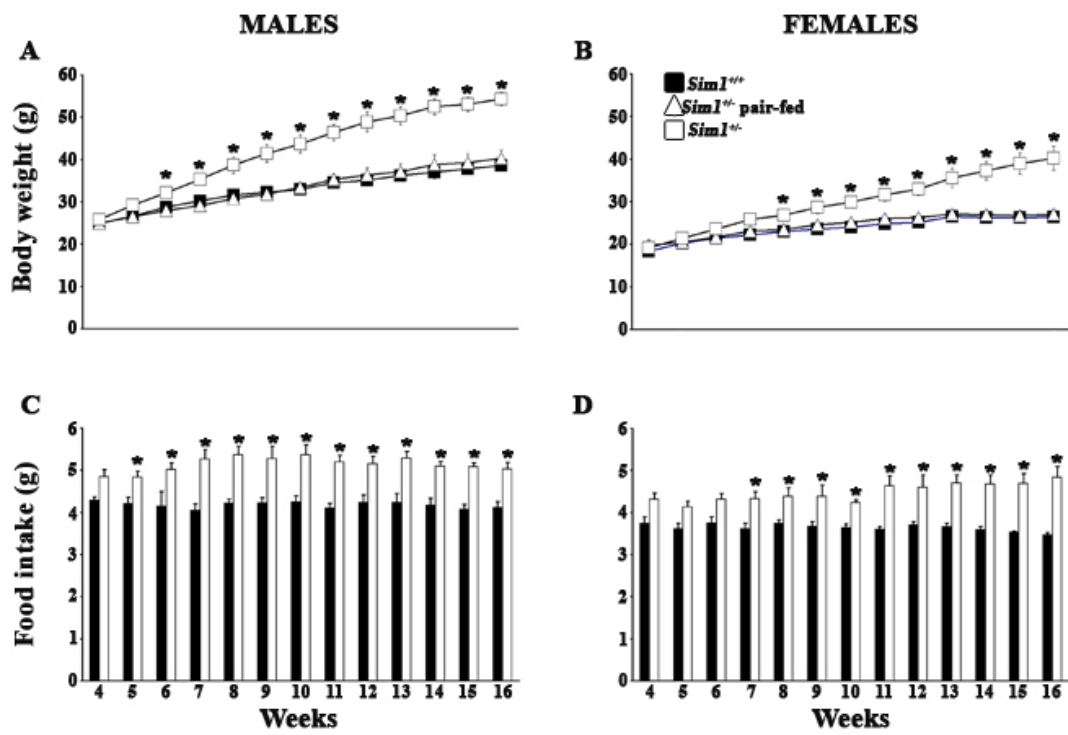


Figure 1. The *Sim1*⁻ allele is penetrant on three distinct backgrounds.

Duplan et al. Fig 2

Figure 2. Pair feeding of *Sim1*^{+/-} mice.

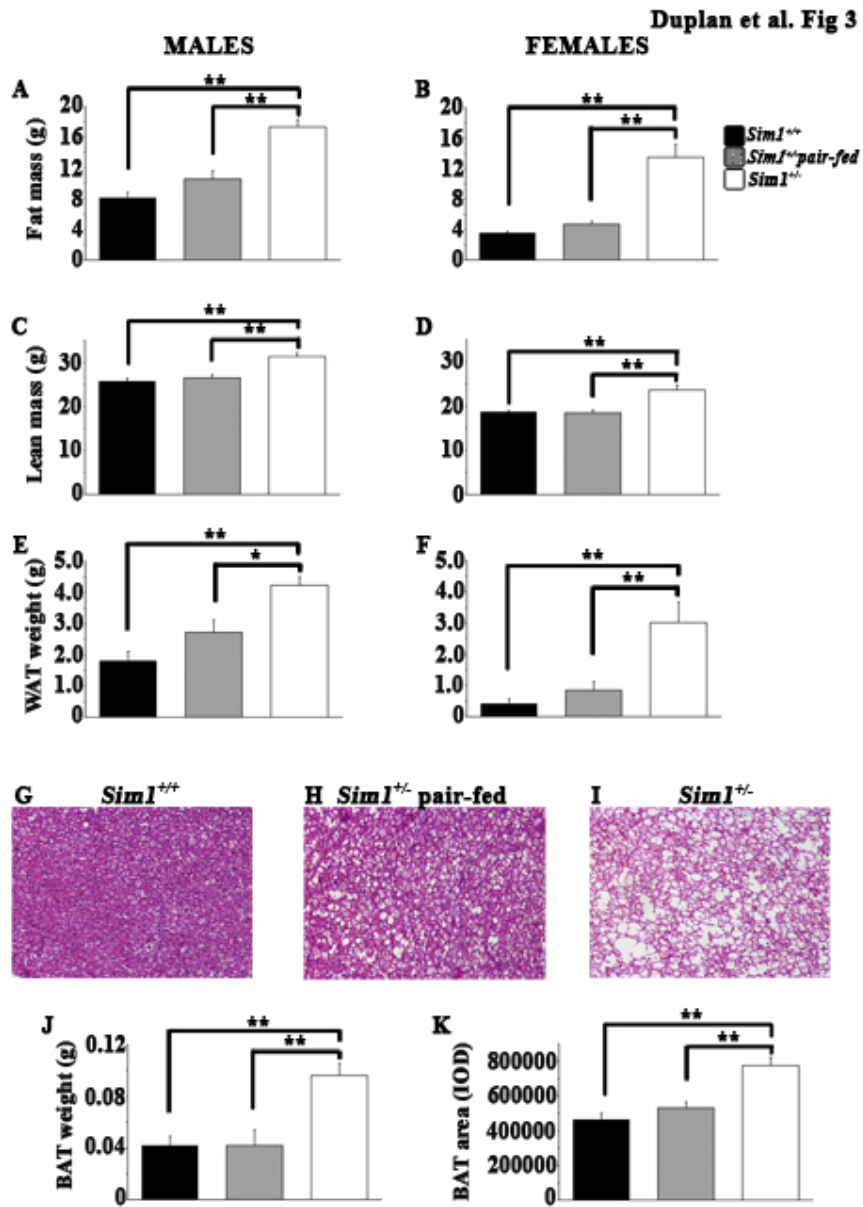


Figure 3. Body fat and lean mass of *Sim1*^{+/+}, *Sim1*^{+/-} pair-fed and *Sim1*^{+/-} mice.

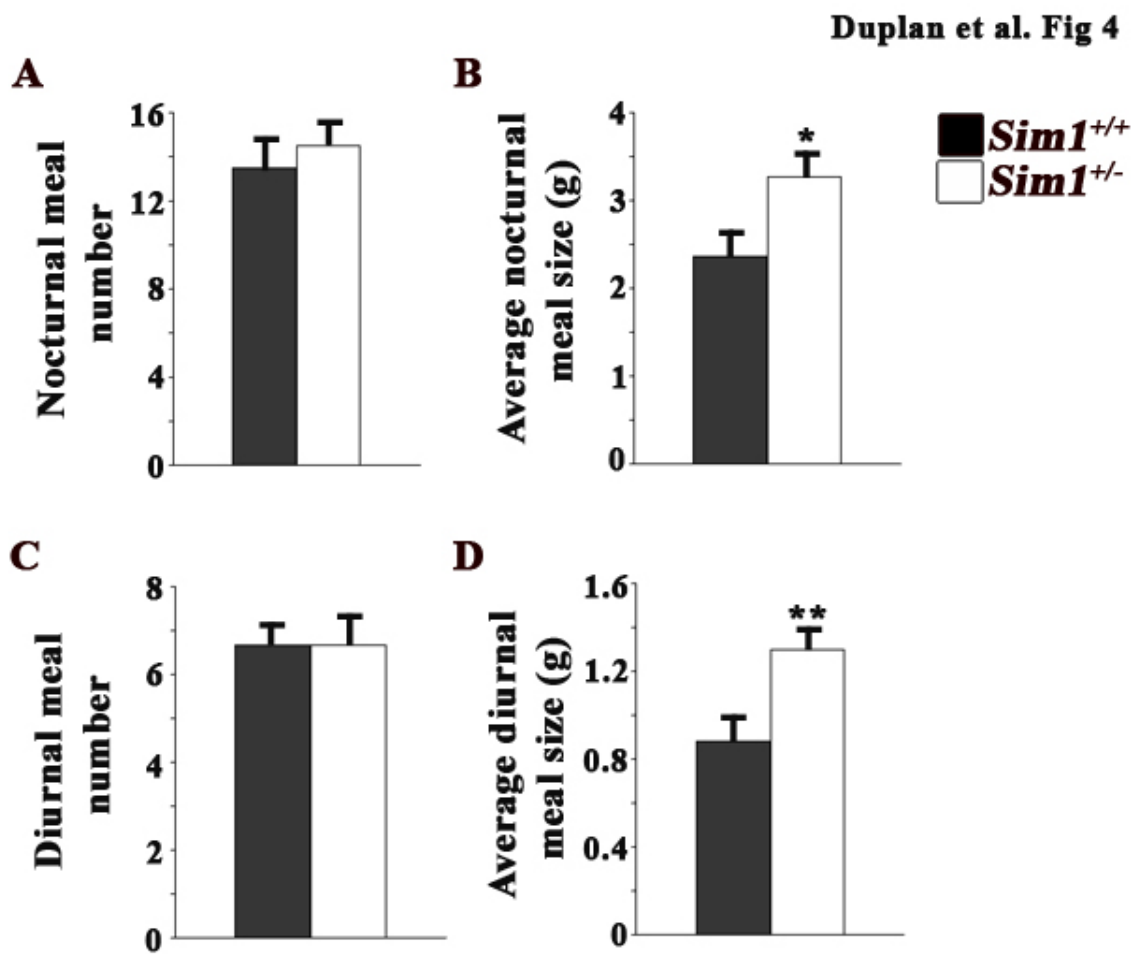


Figure 4. Nocturnal and diurnal meal pattern of *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice.

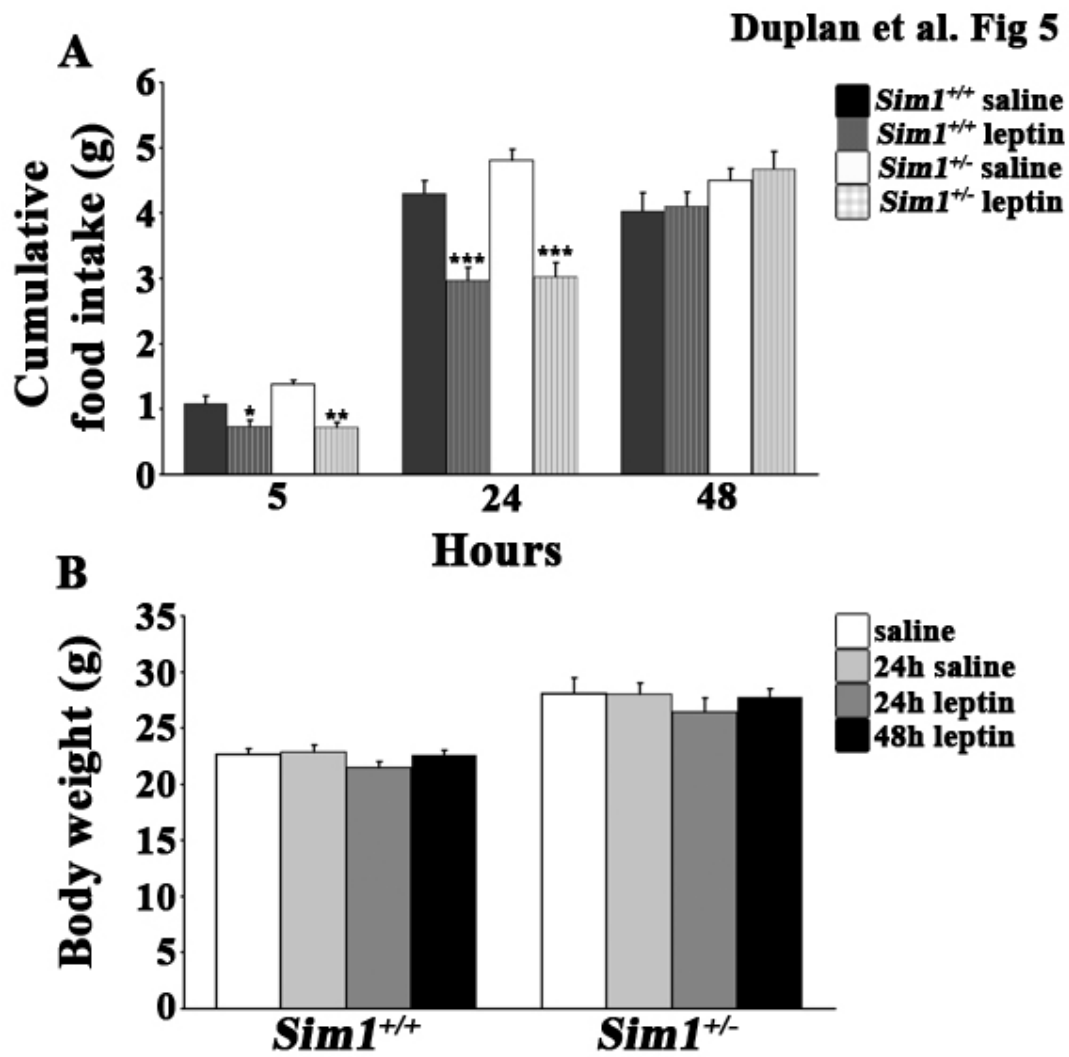


Figure 5: Intracerebroventricular injection of leptin suppresses cumulative food intake and body weight of CD57/129SV *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice.

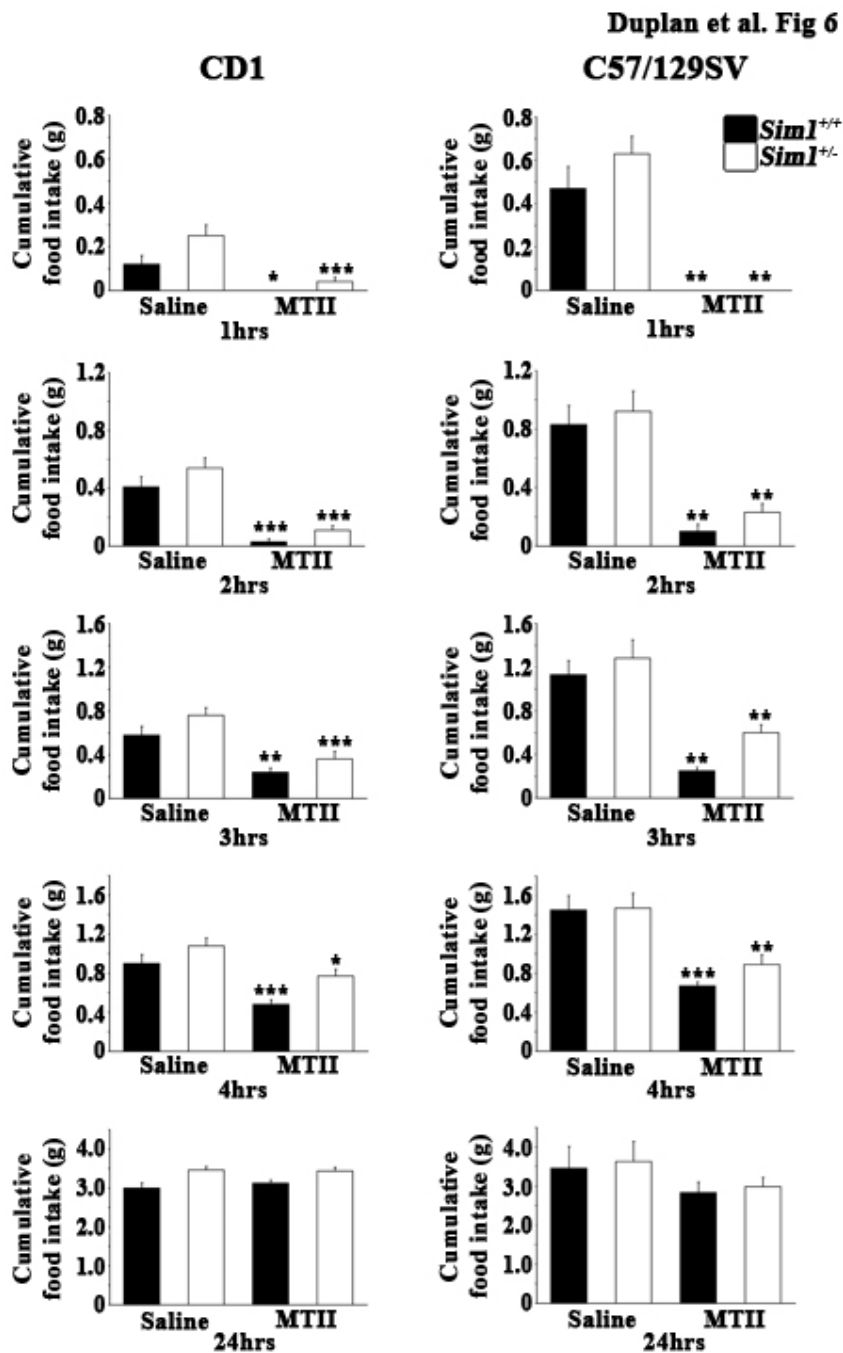


Figure 6. Intraperitoneal injection of MTII suppresses cumulative food intake of CD1 and C57/129SV *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice.

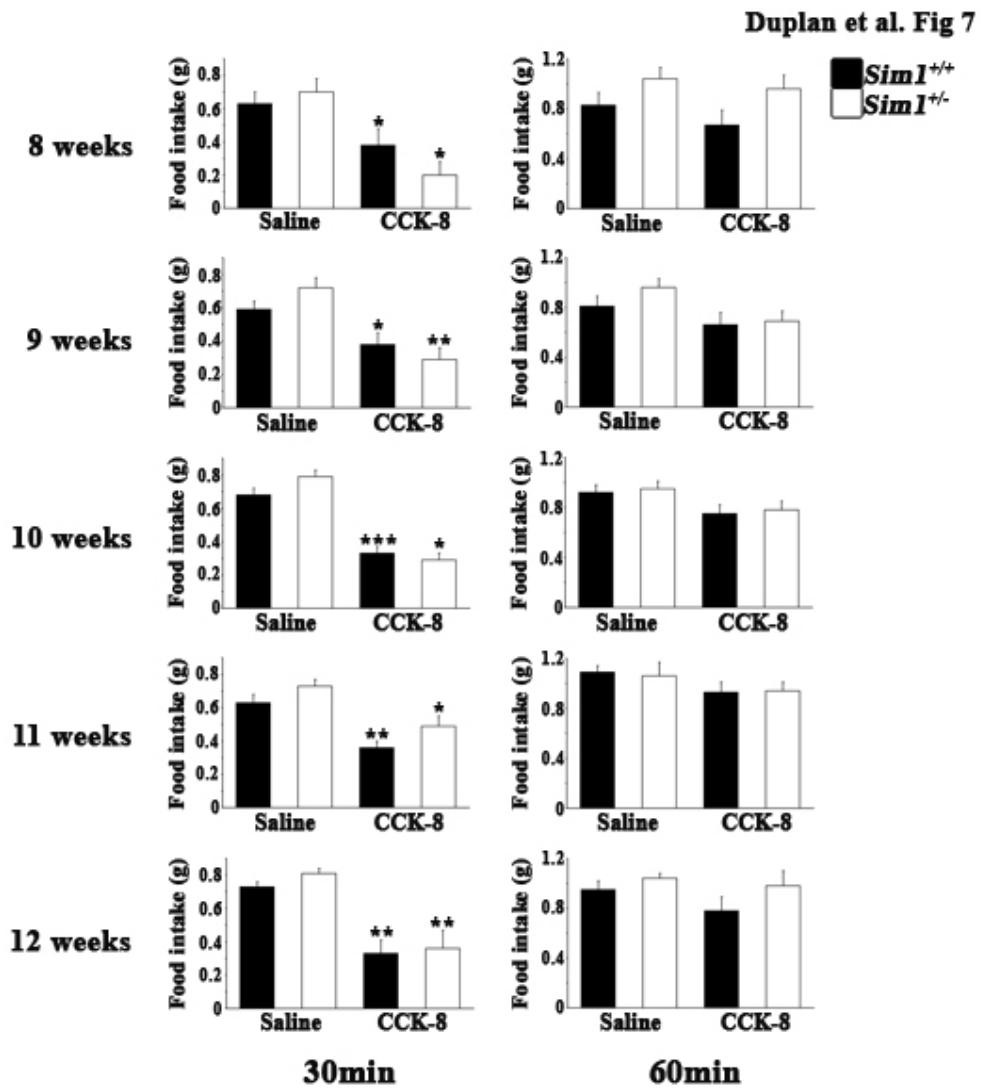


Figure 7. CCK-8 suppress food intake of C57/129SV *Sim1*^{+/+} and *Sim1*^{+/-} male mice.

**QUATRIÈME CHAPITRE:
CONCLUSIONS ET DISCUSSION GÉNÉRALES**

L'haploinsuffisance de *Sim1* induit une obésité hyperphagique chez la souris de même que chez l'humain. Cette hyperphagie pourrait être d'origine développementale. De fait, dans une étude antérieure, nous avons montré que le noyau PV des souris *Sim1*^{+/-} est hypodéveloppé. Cette observation suggère que des anomalies développementales pourraient perturber le fonctionnement du noyau PV. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que l'haploinsuffisance de *Sim1* engendre des anomalies de développement du noyau PV, lesquelles seraient par la suite responsable de l'hyperphagie des souris *Sim1*^{+/-}. Pour étayer cette hypothèse, nous avons caractérisé la composition cellulaire du noyau PV des souris *Sim1*^{+/-}. Nous avons observé une diminution des neurones magnocellulaires exprimant la VP et l'OT, de même qu'une diminution d'une population de neurones parvocellulaires qui se projettent sur le DVC. La perte de ces neurones parvocellulaires pourrait avoir un impact sur la régulation de la prise alimentaire.

1. Haploinsuffisance de *Sim1* et structure du noyau PV

1.1 Développement du noyau PV

Les facteurs de transcription sont des régulateurs critiques du développement. Des études antérieures en génétique ont permis d'identifier au moins cinq facteurs de transcription — *Otp*, *Brn2*, *Artn2*, *Sim1* et *Sim2* — essentiels au développement des neurones du noyau PV (Acampora et al., 1999; Wang & Lufkin, 2000; Schonemann et al., 1995; Nakai et al., 1995; Michaud et al., 2000; Hosoya et al., 2001; Michaud et al., 1998; Goshu et al., 2004). Chez les souris homozygotes pour un allèle nul de l'un ou l'autre de ces facteurs, le noyau PV, qui est composé d'au moins cinq types cellulaire distincts, identifiables par la production des hormones VP, OT, CRH, TRH et SS, est soit absent ou hypocellulaire. A titre d'exemple, il a été démontré que la perte du gène *Brn2* affecte spécifiquement le développement des cellules qui expriment la VP, l'OT et la CRH (Schonemann et al., 1995; Nakai et al., 1995), tandis que l'haploinsuffisance du gène *Sim2* diminue la production des cellules qui expriment la TRH et la SS (Goshu et al., 2004). Ces études ont proposé une cascade d'interactions entre ces facteurs de transcription lors du développement du noyau PV (voir figure 2 de l'annexe1). Cette cascade de facteurs de transcription prédit que la perte du gène *Sim1*, chez la souris, abolira le développement de toutes les cellules du noyau PV. Toutefois, Michaud et ses collègues (2001) ont démontré

qu'une diminution de l'expression de ce gène perturbe le développement d'une fraction des cellules de ce noyau. Ainsi, le noyau PV des souris *Sim1*^{+/-} est hypocellulaire contenant 24% moins de cellules (Michaud et al., 2001).

Notre étude complémentaire a permis de démontrer que l'haploinsuffisance du gène *Sim1* affecte la production d'au moins deux types cellulaires spécifiques dans le noyau PV, les neurones exprimant la VP et l'OT. Dans notre étude, nous avons noté, dans un premier temps chez les embryons *Sim1*^{+/-} de 18.5 jours, que l'expression de l'ARNm des gènes de la *Vp* et de l'*Ot* est diminuée de 65% ± 3.6 et de 61% ± 10.6, respectivement. Cependant, l'expression de l'ARNm de la *Crh* n'est pas affectée à ce stade embryonnaire. Dans un deuxième temps, nous avons démontré, chez la souris *Sim1*^{+/-} de 4 à 6 semaines, que le nombre de cellules produisant la VP et l'OT est diminué de 41.6% ± 9.1 et de 84.1% ± 2.8, respectivement. Toutefois, à ce même stade de vie, l'expression de l'ARNm des gènes de la *Trh* et de *Ss* est inchangée. Ceci suggère que l'haploinsuffisance du gène *Sim1* cause une diminution spécifique des populations neuronales exprimant la VP et l'OT. Notre hypothèse est corroborée par nos observations montrant que l'expression de l'ARNm des gènes de la *Vp* et de l'*Ot* est aussi diminuée dans le noyau SO des embryons hétérozygotes. Le noyau SO est composé principalement de neurones magnocellulaires exprimant les hormones VP et OT. Ces neurones, tout comme les neurones magno- et parvocellulaires du noyau PV, proviennent des cellules germinales du neuroépithélium situé autour de la fissure du diencephale ventral et expriment aussi le gène *Sim1* (Michaud et al., 1998; Ugrumov et al., 2002). Dans notre étude, nous avons noté une diminution de 51% ± 8.4 et de 52% ± 15.5 de l'expression des ARNm de la *Vp* et de l'*Ot*, respectivement, chez les embryons *Sim1*^{+/-}. De plus, nous avons aussi observé chez des souris *Sim1*^{+/-} adultes, une diminution du nombre de cellules exprimant la VP et l'OT dans le noyau SO. Toutefois, nous n'avons pas pu quantifier cette diminution pour des raisons techniques. Une étude récente de Kublaoui et ses collègues (2008) a confirmé nos résultats. Ces auteurs ont eux aussi, observé une diminution des cellules produisant l'OT dans les noyaux PV et SO des souris *Sim1*^{+/-} (Kublaoui et al., 2008).

Il est important de souligner qu'en plus d'affecter le développement des neurones VP et OT magnocellulaires du noyau PV, l'haploinsuffisance du gène *Sim1* abolit aussi le développement d'autres types cellulaires de ce noyau dont la

composition moléculaire n'a pas encore été caractérisée. De fait, les résultats de nos expériences de marquage rétrograde à partir du DVC, chez la souris de 4 à 6 semaines, montrent l'absence d'une fraction importante ($73\% \pm 2.9$) des neurones parvocellulaires du noyau PV qui se projettent sur le DVC. L'identité de ces neurones reste cependant à établir.

1.2 Développement des voies neuronales éfférentes du noyau PV qui régulent la prise alimentaire

1.2.1 Voie neuronale ocytocinergique

Le noyau PV régule la prise alimentaire via des projections neuronales au DVC. Chez le rat, il a été démontré qu'une population de neurones parvocellulaires ocytocinergiques du noyau PV se projette sur le DVC, particulièrement aux sous noyaux M, Gel et Com du NTS, et agit comme modulateur critique de la prise alimentaire (Rinaman, 1998; Blevins et al., 2003). De fait, Blevin et ses collègues (2003) ont démontré que l'injection i.p. de CCK augmente de façon significative l'expression de la protéine c-FOS dans les neurones des sous noyaux M et Gel du NTS. Ces sous noyaux reçoivent une dense innervation ocytocinergique du noyau PV (Rinaman, 1998; Blevins et al., 2003). Des données similaires non pas encore été rapportées chez la souris. Afin de déterminer si ces projections neuronales ocytocinergiques sont, d'une part, présentes chez la souris et, d'autre part, affectées dans leur développement chez la souris *Sim1*^{+/-}, nous avons utilisé un système de double marquage, en combinant un traceur neuronal rétrograde à l'immunohistochimie du neuropeptide OT. Par suite de l'injection du traceur neuronal rétrograde, nous avons noté que le nombre de neurones parvocellulaires du noyau PV qui se projette sur le DVC est diminué de $73.6\% \pm 2.9$ chez les souris *Sim1*^{+/-}, comparativement aux souris *Sim1*^{+/+}. Toutefois, un très faible nombre de cellules doublement marquées pour le neuropeptide OT, entre 0 et 3 cellules par souris, a été observé chez les souris *Sim1*^{+/+} et *Sim1*^{+/-}. Ces résultats portent à croire que l'haploinsuffisance du gène *Sim1* affecte le développement d'une population de neurones parvocellulaires du noyau PV, qui se projette sur le DVC (Swanson & Sawchenko, 1983) mais reste non caractérisée. Ainsi, nos résultats de double marquage, et particulièrement nos observations chez les souris *Sim1*^{+/-}, ne permettent pas de confirmer ni la présence de voies neuronales ocytocinergiques

chez la souris, ni que ces voies neuronales ne se développent pas lorsque l'on module le dosage du gène *Sim1*.

Plusieurs raisons pourraient expliquer cette apparente absence d'une voie neuronale PV-DVC ocytocinergique chez la souris.

1.2.1.1 Un problème technique?

Chez le rat les études utilisant des techniques de marquage similaire ont démontré que les neurones parvocellulaires ocytocinergiques du noyau PV se projettent sur la région médiale du DVC (Swanson & Sawchenko, 1983), particulièrement dans les sous noyaux M, Gel et Com du NTS (Rinaman, 1998; Blevins et al., 2003), et représentent approximativement 10% des afférences de cette région (Sofroniew & Schrell, 1981; Sawchenko & Swanson, 1982). Nos tentatives d'injection dans la région médiale du DVC de la souris se sont avérées létales. L'analyse des coupes histologiques du tronc cérébral a montré que la plupart de nos injections ont atteint les parties latérales du DVC. Dans quelques cas la région médiale du DVC a été atteinte par diffusion du traceur neuronal rétrograde, ce qui pourrait expliquer les quelques cellules doublement marquées que nous avons observées dans le noyau PV de quelques souris.

1.2.1.2 Une différence inter-espèces?

Certains systèmes neuronaux apparaissent organisés différemment chez la souris et chez le rat. Par exemple, chez le rat, il a été démontré qu'une population de neurones du DVC et de l'AP, qui expriment l'enzyme tyrosine hydroxylase, se projette sur la moelle épinière (Tucker et al., 1987; Kwiat & Basbaum, 1990). Par contre, chez la souris, VanderHorst & Ulfhake (2006) ont montré que les voies neuronales du DVC et l'AP vers la moelle épinière n'expriment pas cet enzyme (VanderHorst & Ulfhake, 2006). Par analogie, la voie neuronale ocytocinergique du noyau PV vers le DVC pourrait être absente chez la souris.

Contrairement à la localisation bien définie des neurones parvocellulaires ocytocinergiques dans le noyau PV du rat (Swanson & Sawchenko, 1983), il semble que ces neurones ne soient pas localisés dans des sous noyaux bien précis du noyau PV des souris, ni ne se projettent à des sous noyaux spécifiques du DVC, comme M, Gel et Com, du NTS. Des données préliminaires du Dre Rinaman (commentaire personnelle) suggèrent que, chez la souris, les cellules parvocellulaires ocytocinergiques sont dispersées parmi les cellules magno- et parvocellulaires du noyau PV. On sait aussi que, chez le rat, ces neurones ont un diamètre de 12 à 26 μm , comparativement à un diamètre de 20 à 35 μm pour les neurones magnocellulaires (Swanson & Kuyper, 1980; Sofroniew & Schrell, 1981). La dispersion d'un petit nombre de cellules de petites tailles pourrait expliquer la difficulté de les visualiser et de les quantifier chez la souris. Une analyse immunohistochimique plus approfondie de l'organisation structurale et/ou organisationnelle des noyaux PV et DVC de la souris sera nécessaire pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

2. Haploinsuffisance de *Sim1* et fonctions du noyau PV : homéostasie énergétique

2.1 L'haploinsuffisance de *Sim1* affecte principalement la prise alimentaire

Plusieurs études ont démontré que le noyau PV contribue au contrôle de la prise alimentaire. Il a été démontré que des lésions partielles et/ou complètes du noyau PV, induisent une obésité hyperphagique avec hyperinsulinémie chez le rat (Leibowitz et al., 1981; Cox & Powley, 1981; Aravich & Sclafani, 1983). Contrairement à d'autres modèles animaux d'obésité, causés par des lésions et/ou des manipulations génétiques dans d'autres régions hypothalamiques impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Vander Tuij et al., 1982; Nijijima et al., 1984; Sakaguchi et al., 1988), les rongeurs dont le noyau PV est lésé ne présentent aucune dysfonction du SNA ou dysfonction du système circadien et démontrent un taux d'activité physique normal. Par conséquent, l'hyperphagie, qui est caractérisée par une augmentation de l'apport calorique de ces rongeurs durant les phases diurne et nocturne du cycle nuit/jour, semble la cause principale, pour ne pas dire exclusive, de leur obésité (Cox & Powley, 1981; Tokunaga et al., 1986;

1990; Fukushima et al., 1987). C'est ce que suggère aussi l'étude de Cox & Powley (1981) montrant, à l'aide du protocole expérimental des apports caloriques pairés, qu'en présence d'une quantité restreinte de nourriture, les rats porteurs d'une lésion du noyau PV ne deviennent pas obèses (Cox & Powley, 1981). L'ensemble des résultats suggèrent fortement que le noyau PV contrôle principalement, sinon uniquement, une des deux composantes de l'homéostasie énergétique, c'est-à-dire la prise alimentaire.

De fait, dans notre propre étude, nous avons pu constater que, lorsque soumis au protocole expérimental des apports caloriques pairés, la masse pondérale des souris *Sim1^{+/-}* n'était pas significativement différente de celle des souris *Sim1^{+/+}*. De plus, l'analyse qualitative et quantitative des tissus adipeux blancs et des BAT n'a démontré aucune différence significative en ce qui a trait à la taille et à la masse de ces tissus chez les deux groupes. Finalement, le niveau d'insuline ainsi que le contenu en triglycérides du foie et des masses adipeuses ne sont pas apparus différents entre les souris *Sim1^{+/-}* et *Sim1^{+/+}*. Nos résultats montrent que l'hyperphagie, et non une diminution de la dépense énergétique, est la cause principale de l'obésité des souris *Sim1^{+/-}*. Par conséquent, ils suggèrent que *i)* l'haploinsuffisance de *Sim1* altère le développement du noyau PV, et *ii)* que ce noyau régule principalement la prise alimentaire.

2.2 Haploinsuffisance de *Sim1* et voies neuronales qui régulent la prise alimentaire

L'observation que chez les souris *Sim1^{+/-}* obèses la seule composante de la balance énergétique affectée soit la prise alimentaire suggère que l'haploinsuffisance de *Sim1* pourrait avoir altéré les voies neuronales et/ou la production des neuropeptides impliqués dans la régulation à long et/ou à court terme de la prise alimentaire. L'un des circuits neuronaux impliqué dans la régulation de la prise alimentaire est la voie neuronale noyau Arc-noyau PV—DVC. Chez le rat, de même que chez l'humain, plusieurs données littéraires suggèrent un rôle important de l'ocytocine et des neurones ocytocinergiques parvocellulaires dans la régulation de la prise alimentaire.

2.2.1 Régulation à court terme

L'analyse du patron de consommation des souris *Sim1*^{+/-} démontre que l'haploinsuffisance de *Sim1* cause une augmentation de l'apport calorique des souris *Sim1*^{+/-} lors de chaque repas, sans modifier leur fréquence de consommation. Ce phénotype suggère que les signaux qui normalement s'activent afin d'induire la fin du repas ne sont pas opérationnels. Ce patron de consommation est donc conforme à une dysfonction des circuits neuronaux qui contrôlent le centre de satiété.

Chez le rat, de nombreuses études physiologiques et pharmacologiques ont démontré que l'injection i.c.v de l'OT produit un patron d'expression de la protéine FOS, dans le NTS, similaire à celui observé lors de l'injection i.p. de CCK (Olson et al., 1993). Récemment, Blevins et ses collègues (2003) ont démontré que les sous noyaux Gel et M du NTS, où l'expression de *c-fos* est augmenté par suite de l'injection de CCK, reçoivent une dense innervation ocytocinergique (Blevins et al., 2003). Dans cette même étude, ces auteurs ont aussi montré que l'injection d'un antagoniste au récepteur de l'OT dans le 4^{ième} ventricule atténue l'effet satiétogène de la CCK, confirmant ainsi que l'OT exerce un effet stimulateur sur les neurones du NTS qui induit la satiété (Blevins et al., 2003).

Malgré toutes ces données impliquant la voie neuronale ocytocinergique dans la régulation de la prise alimentaire chez le rat, les souris nulles pour le gène d'*Ot* ne développent pas de phénotype d'obésité et ne sont pas hyperphagiques (Winslow et al., 1998; Winslow & Insel, 2002). De plus, il a été démontré que les souris *OT*^{-/-} sont sensibles à l'injection de CCK (Mantella et al., 2003). De fait, Mantella et ses collègues (2003) ont constaté que l'injection i.p. de CCK chez les souris *OT*^{-/-} induit, tout comme chez les souris sauvages, une inhibition de la prise alimentaire durant les 30 minutes suivant l'injection (Mantella et al., 2003). Nos résultats concordent avec ceux de ce groupe. Dans un premier temps, l'haploinsuffisance de *Sim1* induit une diminution des cellules ocytocinergiques du noyau PV (magno- et parvocellulaires). Dans un deuxième temps, l'injection i.p. de CCK à des souris *Sim1*^{+/-} induit aussi une diminution de la prise alimentaire durant les 30 minutes suivant l'injection.

Des compensations développementales et fonctionnelles dans le noyau PV pourraient expliquer le phénotype d'obésité hyperphagique observé chez nos souris *Sim1^{+/-}*, toutefois absent chez les souris *OT^{-/-}*.

Les études d'invalidation font appel à une approche d'invalidation d'un gène en particulier avant le processus de développement. Il est donc possible que des mécanismes développementaux compensatoires surviennent chez ces animaux afin de minimiser et/ou de compenser complètement l'impact structural et/ou fonctionnel de la perte du gène. Par exemple, en lien avec l'homéostasie énergétique, il a été observé que l'ablation du noyau PV, par des méthodes de stéréotaxie, chez des rongeurs nouveaux-nés, n'induit pas d'hyperphagie chez ces derniers. Toutefois, l'ablation de cette même région chez les rongeurs adultes produit une hyperphagie sévère (Luquet et al., 2005). Ces observations suggèrent une certaine plasticité des circuits hypothalamiques, durant la période périnatale, capable de compenser pour la perte de certains systèmes neuronaux. Ces mécanismes compensatoires pourraient impliquer des compensations par d'autres neuropeptides présent dans le noyau PV impliqués dans le processus de la prise alimentaire, par exemple la CRH, la TRH et possiblement SIM1. Ces mécanismes peuvent être intacts chez les souris *OT^{-/-}* mais défectueux chez les souris *Sim1^{+/-}*, pour lesquelles une sous-population de neurones parvocellulaires du noyau PV, qui projettent au DVC et dont la composition moléculaire est encore inconnue, est absente.

Finalement, les différents résultats obtenus chez le rat et chez la souris pourraient être expliquées par des différences méthodologiques. En effet, les études chez le rat, font appels à des techniques lésionnelles et pharmacologiques sur des rongeurs adultes. Les circuits neuronaux, chez ces derniers, sont déjà établis et fonctionnels. Par conséquent, l'ablation et/ou le blocage par des agents pharmacologiques de ces voies neuronales produit la perte de fonction du système ciblé.

Afin de déterminer la pertinence et l'implication de l'OT dans la régulation de la prise alimentaire chez la souris, les mêmes approches expérimentales utilisées chez le rat devraient être utilisées chez la souris adulte.

2.2.2 Régulation à long terme

Le mieux caractérisé des systèmes neuronaux hypothalamiques impliqués dans la régulation à long terme de l'homéostasie énergétique est la voie de la mélanocortine. Cette voie implique des neurones du noyau Arc qui expriment la POMC. Dans le noyau Arc, la leptine régule l'homéostasie énergétique en agissant directement, via son récepteur, sur deux populations neuronales. Une première population neuronale co-exprime le peptide CART et la POMC, précurseur de α -MSH. Les peptides CART et α -MSH stimulent les processus cataboliques et la leptine stimule leur production. Une seconde population neuronale co-exprime le NPY et AgRP. Ces peptides stimulent les processus anaboliques et la leptine supprime leur production. Une cible cruciale de ces deux populations neuronales est constituée par les neurones qui expriment le récepteur MC4R des mélanocortines dans les noyaux VM et PV. L' α -MSH est un ligand agoniste de ce récepteur alors que l'AgRP en est un antagoniste. Ainsi, l'activation des neurones qui expriment le récepteur MC4R va stimuler le catabolisme.

Plusieurs données suggèrent que *Sim1* et le récepteur MC4R et l'OT agissent de concert dans le noyau PV afin de contrôler la prise alimentaire. Chez la souris adultes, des études de neuro-anatomies ont démontré la colocalisation du gène *Sim1* et de la protéine OT dans une sous-population de neurones du noyau PV (Kublaoui et al., 2008), du gène du récepteur MC4R et de l'OT (Liu et al., 2003) et du gène *Sim1* et du gène du récepteur MC4R (Balthazar et al., 2005; Kublaoui et al., 2006a).

Ces observations sont corroborées par des données physiologiques. De fait, il a été démontré que les neurones du noyau PV, qui expriment le récepteur MC4R, médient l'effet régulateur du système mélanocortinergique sur la prise alimentaire. Balthazar et ses collègues (2005) ont démontré que la ré-activation de l'expression du récepteur MC4R spécifiquement dans les neurones du noyau PV exprimant *Sim1* normalise la consommation alimentaire, sans affecter la dépense énergétique chez les souris *MC4R^{-/-}* (Balthazar et al., 2005). De plus, l'étude de Kublaoui et ses collègues (2006a) démontre que les souris *Sim1^{+/-}* sont résistantes à l'effet

anorexigène du MTII, un ligand agoniste du récepteur MC4R. Ces observations suggèrent fortement que l'haploinsuffisance de *Sim1* puisse affecter le développement de la voie neuronale mélanocortinergique et, par conséquent, ses fonctions dans la régulation de la prise alimentaire.

Nos données neuro-anatomiques corroborent cette hypothèse à l'effet que l'haploinsuffisance de *Sim1* affecte possiblement le développement de la voie neuronale mélanocortinergique. Par immunohistochimie, nous avons observé une diminution de $41.6\% \pm 9.1$ et de $84.1\% \pm 2.8$ du nombre de cellules VP et OT, respectivement, dans le noyau PV des souris *Sim1*^{+/-} adultes. De plus, par marquage neuronal rétrograde, nous avons observé une diminution de $73.6\% \pm 2.9$ des projections axonales du noyau PV au DVC. Par conséquent, l'haploinsuffisance de *Sim1* induit possiblement une réduction des effecteurs de la voie mélanocortinergique endogène, ainsi qu'une réduction du nombre de récepteur MC4R dans le noyau PV.

Nos données fonctionnelles suggèrent aussi que l'haploinsuffisance de *Sim1* rend le système mélanocortinergique atonique, et non pas dysfonctionnel, du moins en ce qui concerne son rôle dans la régulation de la prise alimentaire. Contrairement aux observations de Kublaoui et ses collègues (2006a), nous avons observé que, tout comme les souris *Sim1*^{+/+}, les souris *Sim1*^{+/-} sont sensibles à l'effet anorexigène du MTII. De fait, même si l'ampleur de la diminution de l'apport calorique des souris *Sim1*^{+/-} n'atteint pas celle observée chez les souris *Sim1*^{+/+}, par suite de l'injection i.p. de MTII, leur apport calorique est significativement réduit. Ces observations laissent croire que l'haploinsuffisance de *Sim1* induit une diminution de l'activité du système mélanocortinergique chez la souris.

Remaniements fonctionnels

Au moins un mécanisme pourrait expliquer la sensibilité des souris *Sim1*^{+/-} au MTII : le remaniement fonctionnel des effecteurs du système mélanocortinergique. Durant le développement, certains effecteurs du système mélanocortinergique pourraient soit changer de fonction soit acquérir de nouvelles fonctions ou les deux, afin de compenser pour les anomalies développementales induites par l'haploinsuffisance de *Sim1*. Un tel mécanisme n'a pas encore été démontré dans le

cas des systèmes qui régulent l'homéostasie énergétique. Toutefois, il a été observé et proposé pour les systèmes GABAergiques du gyrus dentelé et du thalamus (Liang et al., 2008). De fait, il a été démontré que les souris dont le gène de la sous unité alpha-4 du récepteur GABA_A est invalide (souris *alpha-4*^{-/-}) présentent des comportements similaires à ceux des souris sauvages sous l'effet de l'éthanol. Chez ces souris l'expression de la sous unité gamma-2 du récepteur GABA_A est augmentée dans l'hippocampe et le thalamus. Ces observations suggèrent qu'un remaniement du système des récepteurs GABAergique secondaire à la perte de la sous unité alpha-4 prévient la perte d'une fonction importante à ce système (Liang et al., 2008).

L'haploinsuffisance de *Sim1* induit une diminution du nombre de cellules dans le noyau PV qui, par conséquent, réduit le nombre de récepteurs MC4R exprimé dans ce noyau. Toutefois, les souris *Sim1*^{+/-} demeurent sensibles aux effets alimentaires inhibiteurs du MTII. Par extrapolation, nous pouvons supposer qu'un mécanisme compensatoire similaire à celui proposé pour le système GABAergique puisse survenir au cours du développement du noyau PV des souris *Sim1*^{+/-}.

La famille des récepteurs de la mélanocortine comprend au moins cinq sous-types (MC1R-MC5R). Toutefois, seulement deux de ces récepteurs, MC3R et MC4R sont exprimés dans le SNC, et notamment dans l'hypothalamus (Butler & Cone, 2002). Tandis que le rôle du récepteur MC4R dans la régulation de la prise alimentaire est bien établi (Huszar et al., 1997), celui de MC3R demeure mal connu. Cependant, certaines données de la littérature suggèrent l'implication de ce récepteur dans l'homéostasie énergétique, particulièrement dans la dépense énergétique. Par exemple, il a été démontré que les souris *MC3R*^{-/-} développent un phénotype d'obésité malgré qu'elles soient hypophagiques. Cependant, aucune donnée sur le mécanisme grâce auquel le récepteur MC3R agit sur le métabolisme énergétique n'a été rapporté (Azzara et al., 2002; Zheng et al., 2005). De plus, il a été démontré que la gamma-MSH est un ligand agoniste au récepteur MC3R (Marks et al., 2006). Ces données désignent le récepteur MC3R du noyau PV comme médiateur potentiel de certaines fonctions du récepteur MC4R dans la régulation de la prise alimentaire.

3. Haploinsuffisance de *Sim1* et hyperphagie

De façon intéressante, les souris hétérozygotes pour un allèle nul du gène *Sim1* développent une obésité précoce, détectable entre la 4^{ème} et la 8^{ème} semaine de vie. Cette obésité est secondaire à une hyperphagie isolée sans diminution des dépenses énergétiques (Michaud et al., 2001). Au moins deux mécanismes pourraient expliquer cette hyperphagie chez les souris *Sim1*^{+/-}.

3.1 Mécanisme développemental : anomalies du développement du noyau PV

L'hyperphagie isolée des souris *Sim1*^{+/-} est compatible avec une perturbation de la fonction du noyau PV. Cette dysfonction pourrait avoir une origine développementale. Cette hypothèse est, toutefois, très peu explorée. De fait, l'impact d'une perte et/ou d'une diminution des autres facteurs de transcription impliqués dans le développement du noyau PV — *Otp*, *Brn2* et *Arnt2* — sur l'homéostasie énergétique n'a pas encore été étudié. De plus, il a été démontré que l'haploinsuffisance du gène *Sim2* n'affecte pas la croissance pondérale des souris (Goshu et al., 2002). Toutefois, l'hypothèse que des anomalies du développement puissent engendrer un phénotype d'obésité a déjà été proposée pour d'autres régions hypothalamiques impliquées dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Par exemple, les souris homozygotes pour une mutation dans le gène du facteur stéroïdogénique-1 (*SF-1*), qui code pour un récepteur nucléaire orphelin, présentent une obésité tardive, vers l'âge de 8 semaines (Majdic et al., 2002). Le gène *SF-1* est exprimé exclusivement dans le noyau VM. Chez les embryons de même que chez les souris adultes *SF-1*^{-/-}, il a été démontré que la cytoarchitecture du noyau VM est perturbée. De fait, les différents types cellulaires de ce noyau, identifiable par l'expression de marqueurs tels que les récepteurs à estrogène et le NPY, sont re-localisés dans des régions différentes du noyau VM et/ou dans des noyaux avoisinants (Ikeda et al., 1995; Dellovade et al., 2000; Tran et al., 2003; Davis et al., 2004). Cette perturbation de la migration et/ou du processus de différenciation cellulaire du noyau VM engendre probablement le phénotype d'obésité tardive. Le même raisonnement peut aussi être appliqué au noyau Arc. Il a été démontré que la perte de fonction du facteur de transcription *Nhlh2* diminue

l'expression du gène *POMC* dans le noyau Arc (Jing et al., 2004). De façon intéressante, les souris *Nhlh2*^{-/-} développent une obésité tardive (Good et al., 1997).

Par conséquent, il est tentant de postuler que l'haploinsuffisance de *Sim1* cause des anomalies du développement du noyau PV qui peuvent en perturber les fonctions, incluant la régulation de l'homéostasie énergétique, et contribuer ainsi au phénotype d'obésité.

3.2 Mécanisme physiologique : dysfonctions physiologiques de la protéine SIM1

Récemment, un rôle de la protéine SIM1, a été proposé, à l'effet que cette protéine puisse agir le long d'une voie physiologique dans le noyau PV afin de contrôler la prise alimentaire (Kublaoui et al., 2006a; 2006b; Yang et al., 2006). Plusieurs données corroborent cette hypothèse.

Tout d'abord, SIM1 est exprimée dans le noyau PV des souris adultes (Holder et al., 2004). En second lieu, il a été démontré que l'injection i.p. de MTII, chez les souris sauvages, d'une part, augmente spécifiquement l'expression de l'ARNm de *Sim1* de 80% dans l'hypothalamus, et d'autre part, diminue la consommation alimentaire de ces souris (Kublaoui et al., 2006a). Finalement, Yang et ses collègues (2006) ont démontré qu'en modulant l'expression du gène *Sim1* spécifiquement dans le noyau PV de souris adultes, par injection stéréotaxique d'adénovirus, il est possible de moduler la prise alimentaire de ces animaux (Yang et al., 2006). Ces résultats sont d'autant plus corroborés par l'étude de Kublaoui et ses collègues (2006b) qui démontre que l'augmentation de l'expression du gène *Sim1*, à l'aide d'un transgène dans divers modèles de souris obèses, élimine complètement l'hyperphagie de ces souris (Kublaoui et al., 2006b).

Nos résultats d'injection de MTII vont dans le sens de ces observations. Il est raisonnable de supposer que, chez les souris *Sim1*^{+/-}, l'injection de MTII induit, par un mécanisme encore inconnu, une augmentation de l'expression de la protéine SIM1 dans le noyau PV qui, par conséquent, agit le long d'une voie physiologique afin de réguler la prise alimentaire. Il est aussi tentant d'émettre l'hypothèse que le

gène *Sim1*, mis à part son rôle dans le développement du noyau PV, joue aussi un rôle physiologique, post-développemental, dans la régulation de la prise alimentaire. C'est en perturbant cette voie que l'haploinsuffisance de *Sim1* causerait une hyperphagie.

Les deux mécanismes, l'un développemental, l'autre physiologique, ne s'excluent pas nécessairement. En effet, des anomalies du développement ainsi que physiologiques, induites par l'haploinsuffisance de *Sim1*, pourraient contribuer à l'hyperphagie des souris *Sim1*^{+/-}. Tout comme la leptine à laquelle on reconnaît un rôle durant le développement ainsi qu'un rôle dans certaines fonctions physiologiques post-natales (Bourret et al., 2004a), il est possible que *Sim1* ait une double fonction chez l'animal et chez l'humain. Si tel est le cas, SIM1 vient donc s'ajouter à une liste, encore très peu élaborée, de protéines qui modulent à la fois le développement et les fonctions physiologiques du noyau PV.

La contribution respective des anomalies, développementale et physiologique, à l'induction de l'hyperphagie des souris *Sim1*^{+/-} reste à démontrer. Cette question pourrait être, en partie, résolue, en inactivant le gène *Sim1* après la naissance (conditional knockout). Cette approche expérimentale permettrait de comparer le phénotype des souris *Sim1*^{+/-} dont le gène *Sim1* est inactivé dans les cellules germinales, au phénotype des souris *Sim1*^{+/-} dont le gène *Sim1* est inactivé seulement après la naissance.

En conclusion, notre étude démontre que le développement du noyau PV est un déterminant important de la régulation de l'homéostasie énergétique et principalement de la prise alimentaire. Par conséquent, tout changement dans le programme développemental de ce noyau pourrait avoir un impact sur cette fonction physiologique. L'haploinsuffisance de plusieurs gènes, codant pour des facteurs de transcription, affecte le développement du noyau PV. Cependant, un phénotype d'obésité hyperphagique, associé à ces anomalies développementales, a été rapporté uniquement pour l'haploinsuffisance de *Sim1*. Par conséquent, les souris *Sim1*^{+/-} représentent un modèle animal intéressant pour définir le rôle du noyau PV dans la régulation de la prise alimentaire, de même que pour étudier certains aspects

du mécanisme en cause, c'est-à-dire l'hyperphagie, dans l'obésité liée aux mutations du gène *Sim1*.

Finalement, nos observations additionnées à ceux de la littérature nous permettent de suggérer un modèle, toutefois un peu simpliste, d'un circuit neuro-anatomique, allant de l'hypothalamus au tronc cérébral, et moléculaire allant du récepteur MC4R à *Sim1* à l'OT, impliqué dans la régulation de la prise alimentaire (voir figure 1).

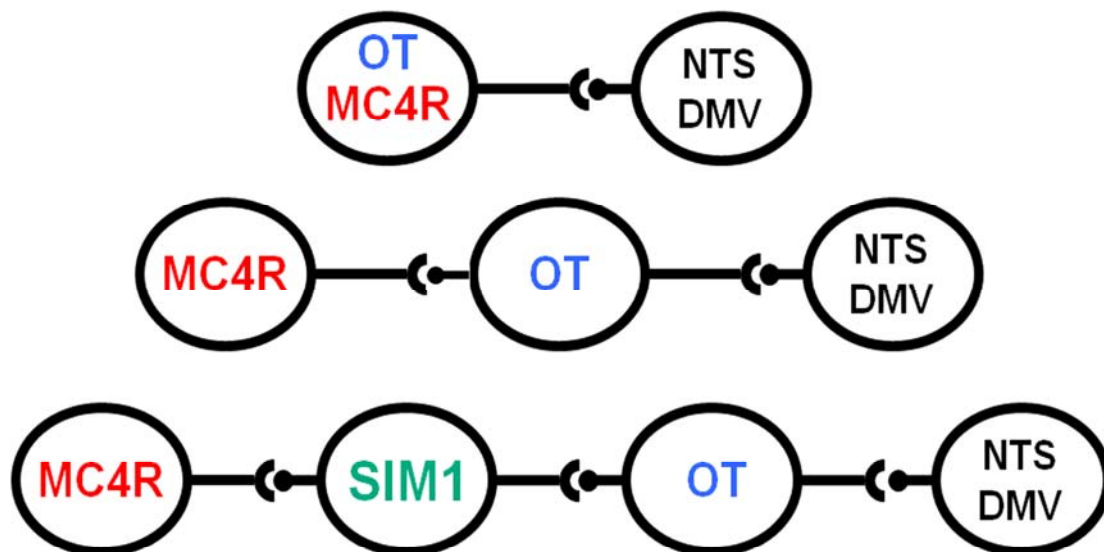


Figure 1 : Modèle d'un circuit neuronal et moléculaire régulant la prise alimentaire.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

Abbott, C.R., Small, C.J., Kennedy, A.R., Neary, N.M., Sajedi, A., Ghatei, M.A., & Bloom, S.R. (2005a). Blockade of the neuropeptide Y Y2 receptor with the specific antagonist BIIE0246 attenuates the effect of endogenous and exogenous peptide YY₃₋₃₆ on food intake. *Brain Research* 1643(3005): 139-144.

Abbott, C.R., Monteiro, M., Small, C.J., Sajedi, A., Smith, K.L., Parkinson J.R.C., Ghatei, M.A., & Bloom, S.R. (2005b). The inhibitory effects of peripheral administration of peptide YY₃₋₃₆ and glucagons-like peptide-1 on food intake are attenuated by ablation of the vagal-brainstem-hypothalamic pathway. *Brain Research* 1044: 127-131.

Acampora, D., Postiglione, M.P., Avantiaggiato, V., Di Bonito, M., Vaccarino, F.M., Michaud, J., & Simeone, A. (1999). Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the *Ortopedia* gene. *Genes Dev* 13(21): 2787-2800.

Aggleton, J.P., Hunt, P.R., Nagle, S., & Neave, N. (1996). The effects of selective lesions within the anterior thalamic nuclei on spatial memory in the rat. *Behav Brain Res.* 81(1-2); 189-198.

Ahima, R.S., & Lazar, M.A. (2008). Adipokines and peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol* (in press).

Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzonos, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., Flier, J.S. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382: 250-252.

Air, E.L., Benoit, S.C., Blake Smith, K.A., Clegg, D.J., & Woods, S.C. (2002). Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms. *Pharmacol Biochem Behav* 72: 423-429.

Altschuler, S.M., Ferenci, D.A., Lynn, R.B., & Miselis, R.R. (1991). Representation of the cecum in the lateral dorsal motor nucleus of the vagus nerve and commissural subnucleus of the nucleus tractus solitarii in rat. *J Comp Neurol* 304: 261-274.

Altschuler, S.M., Rinaman, L. & Miselis, R.R. (1992). Visceroropic representation of the alimentary tract in the dorsal and ventral vagal complexes in the rat. In S. Ritter, R.C. Ritter, and C.D. Barnes (eds): *Neuroanatomy and Physiology of abdominal vagal afferents*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 21-53.

Alvarez-Bolado, G., Zhou, X., Voss, A.K., Thomas, T., & Gruss, P. (2000). Winged helix transcription factor *Foxb1* is essential for access of mammillothalamic axons to the thalamus. *Development* 127(5): 1029-1038.

Anand, B.K. & Brobeck, J.R. (1951). Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24: 123-140.

Antin, J., Gibbs, J., Holt, J., Young, R.C., & Smith, G.P. (1975). Cholecystokinin elicits the complete behavioural sequence of satiety in rats. *J Comp Physiol Psychol* 89: 784-790.

Anubhuti, S.A. (2006). Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity- A review. *Neuropeptides* 40: 375-402.

Arase, K., Sakaguchi, T., & Bray, G.A. (1987). Lateral hypothalamic lesions and activity of the sympathetic nervous system. *Life Sci* 41: 657-662.

Aravich, P.F. & Sclafani, A. (1983). Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav Neurosci* 97(6): 970-983.

Armstrong, W.E. (2004). Hypothalamic supraoptic and paraventricular Nuclei. In "The rat nervous system" (Paxinos, G., Eds), pp. 369-388. Elsevier, San Diego.

Asakawa, A., Inui, A., Kaga, T., Yuzuriha, H., Nagata, T., Ueno, N., Makino, S., Fujimiya, M., Niuima, A., Fujino, M.A., & Kasuga, M. (2001). Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 120(2): 339-344.

Asensio, C.S., Arsenijevic, D., Lehr, L., giacobino, J.P., Muzzin, P., & Rohner-Jeanrenaud, F. (2008). Effects of leptin on energy metabolism in beta-leass mice. *Int J Obes (Lond)* (in press).

Asin, K.E., Bednarz, L., Nikkel, A.L., Gore, P.A., & Nadzan, A.M. (1992). A-71623, a selective CCK-A receptor agonist suppresses food in mouse, dog and monkey. *Pharmacol Biochem Behav* 42: 699-704.

Azzara, A.V., Sokolnicki, J.P., & Schwartz, G.J. (2002). Central melanocortin receptor agonist reduces spontaneous and scheduled meal size but does not augment duodenal preload-induced feeding inhibition. *Physiol Behav* 77: 411-416.

Bachman, E.S., Dhillon, H., Zhang, C-Y., Cinti, S., Bianco, A.C., Kobilka, Bk., & Lowell, B.B. (2002). betaAR signalling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science* 297(5582): 843-845.

Bagdade J.D., Bierman, E.L., & Porte, D. (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.

Balthasar, N., Coppari, R., McMinn, J., Liu, S.M., Lee, C.E., Vinsee, T., Kenny, C.D., McGovern, R.A., Chua, S.C., Elmquist, J.K., & Lowell, B.B. (2004). Leptin receptor signalling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* 42: 983-991.

Balthasar, N., Daigaard, L.T., Lee, C.E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R.A., Kenny, C.D., Christiansen, L.M., Edelstein, E., Chol, B., Boss, O., Aschkenasi, C., Zhang, C-Y., Mountjoy, K., Kishi, T., Elmquist, J.K., &

Lowell, B.B. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* 123: 493-505.

Bamshad, M., Song, C.K., & Bartness, T.J. (1999). CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 45: R1569-1578.

Banks, W.A., Kastin, A.J., Huang, W., Jaspan, J.B., & Maness, L.M. (1996). Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides* 17(2): 305-311.

Barrachina, M.D., Martinez, V., Wang, L., Wei, J.Y., & Taché, Y. (1997). Synergistic interaction between leptin and cholecystokinin to reduce short-term food intake in lean mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10455-10460.

Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, R., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., Cone, R.D., & Bloom, S.R. (2002). Gut hormone PYY₃₋₃₆ physiologically inhibits food intake. *Nature* 418: 650-654.

Batterham, R.L., Cohen, M.A., Ellis, S.M., Le Roux, C.W., Withers, D.J., Frost, G.S., Ghatei, M.A., & Bloom, S.R. (2003). Inhibition of the food intake in obese subjects by peptide YY₃₋₃₆. *N ENGL J Med* 349(10): 941-948.

Batterham, R.L., Heffon, H., Kapoor, S., Chivers, J.E., Chandarana, K., Herzog, H., Le Roux, C.W., Thomas, E.L., Bell, J.D., & Whithers, D.J. (2006). Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell metabolism* 4:223-233.

Baura, G.D., Foster, D.M., Porte, D., Kahn, S.E., Bergman, R.N., Cobelli, C., & 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.

Beinfeld, M.C., & Palkovits, M. (1981). Distribution of cholecystokinin in the hypothalamus limbic system of the rat. *Neuropeptides* 2: 123-128.

Benoit, S.C., Air E.L., Coolen L.M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D.J., Seeley, R.J., & Woods, S.C. (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J Neurosci* 22(20): 9048-9052.

Berthoud, H-R. (2002). Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 393-428.

Blevins, J.E., Eakin, T.J., Murphy, J.A., Schwartz, M.W., & Baskin, D.G. (2003). Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin. *Brain Res* 993: 30-41.

Blevins, J.E., Schwartz M.W., & Baskin, D.G. (2004). Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R87-R96.

Bourret, S.G., Draper, S.J., & Simerly, R.B. (2004a). Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci* 24: 2797-2805.

Bourret, S.G., Draper, S.J., & Simerly, R.B. (2004b). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304: 108-110.

Brief, D.J., & Davis, J.D. (1984). Reduction of food intake and body weight by chronic intraventricular insulin infusion. *Brain Res Bull* 12: 571-575.

Broadwell, R.D., & 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.

Browning, K.N., & Travagli, R. A. (2003). Neuropeptide Y and peptide YY inhibit excitatory synaptic transmission in the rat dorsal motor nucleus of the vagus. *Physiol* 549(3): 775-785.

Brüning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Müller-Wieland, D., & Kahn, C.R. (2000) Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289: 2122-2125.

Buffa, R., Solcia, E., & Go, V.L. (1976). Immunohistochemical identification of the cholecystokinin cell in the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 70: 528-532.

Buijs, R.M., Chun, S.J., Nijima, A., Romijn, H.J., & Nagai, K. (2001). Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: A role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *J Comp Neurol* 431: 405-423.

Burks, D.J., Font, de Moná, J., Schubert, M., Withers, D.J., Myers, M.G., Towery, H.H., Altamuro, S.L., Flint, C.L., & White, M.F. (2000). IRS-2 pathways integrate female reproduction and energy homeostasis. *Nature* 407(6802): 377-382.

Butler, A.A., & Cone, R.D. (2002). The melanocortin receptors: Lessons from knockout models. *Neuropeptides* 36(2-3): 77-84.

Cabanac, M. (2006). Sensory pleasure optimizes muscular work. *Clin Invest Med* 29: 110-116.

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

Cancello, R., Tounian, A., Poitou, Ch., & Clément, K. (2004). Adiposity signals, genetic and body weight regulation in humans. *Diabetes Metab* 30(3): 215-227.

Cannon, B., & Nedergaard, J. (2004). Brown adipose tissue: Function and physiological significance. *Physiol Rev* 84(1): 277-359.

Caqueret, A., Boucher, F., & Michaud, J.L. (2006). Laminar organization of the early developing anterior hypothalamus. *Dev Biol* 298: 95-106.

Cettout-Rose, P., & Rohner-Jeanrenaud, F. (2002). The leptin-like effects of 3d peripheral administration of a melanocortin agonist are more marked in genetically obese Zucker (*fa/fa*) than in lean rats. *Endocrinol* 143: 2277-2283.

Challis, B.G., Pinnock, S.B., Coll, A.P., Carter, R.N., Dickson, S.L., & O'Rahily, S. (2003). Acute effects of PYY₃₋₃₆ on food intake and hypothalamic neuropeptide expression in the mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 311: 915-919.

Challis, B.G., Coll, A.P., Yeo, G.S.H., Pinnock, S.B., Dickson, S.L., Thresher, R.R., Dixon, J., Zahn, D., Rochford, J.J., White, A., Oliver, R.L., Millington, G., Aparcio, S.A., Colledge, W.H., Russ, A.P., Carlton, M.B., & O'Rahily, S. (2004). Mice lacking pro-opiomelanocortin are sensitive to high-fat feeding but respond normally to the acute anorectic effect of peptide – YY₃₋₃₆. *PNAS* 101(13): 4695-4700.

Chavez, M., Kaiyala, K., Madden, L.J., Schwartz, M.W., & Woods, S.C. (1995). Intraventricular insulin and the level of maintained body weight in the rats. *Behav Neurosci* 109:528-531.

Chelikani, P.K., Haver, A.C., Reeve Jr, J.R., Keire, D.A., & Reidelberger, R.D. (2006). Daily, intermittent intravenous infusion of peptide YY₃₋₃₆ reduce daily food intake and adiposity in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R298-R305.

Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L., Wolf, E.A., Wenig, X., Ellis, S.J., Lakey, N.D., Culpepper, J., More, K.J., Brechtbart, R.E., Duyk, G.M., Tepper, R.I., & Morgenstern, J.P. (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.

Cheung, C.C., Clifton, D.K., & Steiner, R.A. (1997). Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. *Endocrinol* 138: 4489-4492.

Chrast, R., Scott, H.S., Chen, H., Kudoh, J., Rossier, C., Minoshima, S., Wang, Y., Shimizu, N., & Antonarakis, S.E. (1997) Cloning of two human homologs of the *drosophila single-minded* gene SIM1 on chromosome 6q and SIM2 on 21q within the Down syndrome chromosomal region. *Gen Res* 7: 615-624.

Chrast, R., Scott, H.S., Madani, R., Huber, L., Wolfer, D.P., Prinz, M., Aguzzi, A., Lipp, H-P., & Antonarakis, S.E. (2000). Mice trisomic for a bacterial chromosome with the single-minded 2 gene (*Sim2*) show phenotypes similar to some of those present

in the partial trisomy 16 mouse models of Down syndrome. *Hum Mol Genet* 9(12): 1853-1864.

Chua, S.C., Chung, W.K., Wu-peng, X.S., Zhang, Y., Liu, S.M., Tartaglia, L., & Leibel, R.L. (1996). Phenotypes of mouse diabetes and rat *fatty* due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* 271: 994-996.

Chua, S.C., Liu, S.M., Li, Q., Sun, A., DeNino, W.F., Heymsfield, S.B., & Guo, X.E. (2004). Transgenic complementation of leptin receptor deficiency. II. Increase leptin receptor transgene dose effects on obesity/diabetes and fertility/lactation in *lepr^{db/db}* mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E384-E392.

Cohen, P., Zhao, C., Cai, X., Montez, J.M., Rohani, S.C., Feinstein, P., Mombaerts, P., & Friedman, J.M. (2001). Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest* 108(8): 1113-1121.

Coleman, D.L. (1978). Obese and diabetes: Two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 14: 141-148.

Commins, S.P., Watson, P.M., Padgett, M.A., Dudley, A., Argyropoulos, G., & Gettys, T.W. (1999). Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin. *Endocrinol* 140(1): 292-300.

Corp, E.S., Curcio, M., Gibas, J., & Smith, G.P. (1997). The effect of centrally administered CCK-receptor antagonists on food intake in rats. *Physiol Behav* 61: 823-827.

Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Gordan, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., & Low, M.J., (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 433: 480-484.

Cox, J., & Powley, T. (1981). Intra-gastric pair feeding fails to prevent VMH obesity or hyperinsulinemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 240: 566-572.

Cox, J.E., & Randish, A. (2004). Enhancement of feeding suppression by PYY(3-36) in rats with area postrema ablations. *Peptides* 25: 985-989.

Crawley, J.N., & Beinfeld, M.C. (1983). Rapid development of tolerance to the behavioural actions of cholecystokinin. *Nature* 302: 703-706.

Crawley, J.N., & Corwin, R.L. (1994). Biological actions of cholecystokinin. *Peptides* 15: 731-755.

Crosby, E.C., & Woodburne, R.T. (1940). The comparative anatomy of the preoptic area and the hypothalamus. *Proc Assoc Res Nerv Mental Dis* 20: 52-169.

Cumming, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., & Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50: 1714-1719.

Cumming, D.E., Weigle, D.S., Frayo, R.S., Breen, P.A., Patchen Dellinger, M.K.E., & Purnell, J.Q. (2002). Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 346(21):1623-1630.

Date, Y., Murakami, N., toshinai, K., matsukura, S., Niuma, A., Matsuo, H., Kangawa, K., & Nakazato, M. (2002). The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 123(4): 1122-1127.

Davis, A.M., Seney, M.L., Stallings, N.R., Zhao, L., Parker, K.L., & 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.

Dellovade, T.L., Young, M., Ross, E.P., Henderson, R., Caron, K., Parker, K., & Tobet, S.A. (2000). Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. *J Comp Neurol* 423:579-589.

Dhillon, W.S. (2007). Appetite regulation: An overview. *Thyroid* 17(5): 433-445.

Dhillon, H., Zigman, J.M., Ye, C., Lee, C.E., McGovern, R.A., Tang, V., Kenny, C.D., Christiansen, L.M., White, R.D., Edeistein, E.A., Coppari, R., Balthasar, N., Cowley, M.A., Chua, S., Elmquist, J.K., & Lowell, B.B. (2006). Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. *Neuron* 49: 191-203.

Dulloo, A.G., Seydoux, J., & Jacquet, J. (2004). Adaptive thermogenesis and uncoupling proteins: a reappraisal of their roles in fat metabolism and energy balance. *Physiol Behav* 83(4): 587-602.

Edmond, M., Schwartz, G.J., Ladenheim, E.E., & Moran, T.H. (1999). Central leptin modulates behavioral and neural responsivity to CCK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 276: R1545-R1549.

Edwards, G.L., Ladenheim, E.E., & Ritter, R.C. (1986). Dorsomedial hindbrain participation in cholecystokinin-induced satiety. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 251(20): R971-R977.

Elias, C.F., Aschkenasi, C., Lee, C., Nelly, J., Ahima, R.S., Bjorback, C., Flier, J.S., Saper, C.B., & Elmquist, J.K. (1999). Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 23: 775-786.

Elias, C.F., Kelly, J.F., Lee, C.E., Ahima, R.S., Drucker, D.J., Saper, C.R., & Elmquist, J.K. (2000). Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. *J Comp Neurol* 423: 261-281.

Elmquist, J.K., Ahima, R.S., Elias, C. F., Flier, J.S., & Saper, C.B. (1998). Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 741-746.

Ema, M., Morita, M., Ikawa, S., Tanaka, M., Matsuda, Y., Gotoh, O., Saijoh, Y., Fujii, H., Hamada, H., Kikuchi, Y., & Fujii-Kuriyama, Y. (1996a). Two new members of the murine *Sim* gene family are transcriptional repressors and show different expression patterns during mouse embryogenesis. *Mol Cell Biol* 16(10): 5865-5875.

Ema, M., Suzuki, M., Morita, M., Hirose, K., Sogawa, K., Matsuda, Y., Gotoh, O., Saijoh, Y., Fujii, H., Hamada, H., & Fujii-Kuriyama, Y. (1996b). cDNA cloning of a murine homologue of *drosophila* single-minded, its mRNA expression in mouse development, and chromosome localization. *Biochem Biophys Res Comm* 218(2): 588-594.

Erickson, J.C., Hollopeter, G., & Palmiter, R.D. (1996). Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y. *Science* 274: 1704-1707.

Erlanson-Albertsson, C. (2003). The role of uncoupling proteins in regulation of metabolism. *Acta Physiol Scand* 178(4): 405-412.

Fan, C-M., Kuwana, E., Bulfone, A., Fletcher, C.F., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Crews, S., Martinez, S., Puelles, L., Rubenstein, J.L.R., & Tessier-Lavigne, M. (1996). Expression patterns of two murine homologs of *drosophila single-minded* suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. *Mol Cell Neurosci* 7: 1-16.

Farooqi, I.S., Yeo, G.S.H., Keogh, J.M., Aminian, S., Jebb, S.A., Butler, G., Cheerham, T., & O'Rahilly, S. (2000). Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 106: 271-279.

Figlewicz, D.P., Sipols, A.J., Seeley, R.J., Chavez, M., Woods, S.C., & Porte, D. (1995). Intraventricular insulin enhances the meal-suppressive efficacy of intraventricular cholecystokinin octapeptide in the baboon. *Behav Neurosci* 109(3): 567-569.

Figlewicz, D.P., Stein, L.J., West, D., Porte, D., & Woods, S.C. (1986). Intracisternal insulin alters sensitivity to CCK-induced meal suppression in baboons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 250: R856-R860.

Flier, J.S. (2004). Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 116: 337-350.

Fox, E.A., & Powley, T.L. (1985). Longitudinal columnar organization within the dorsal motor nucleus represents separate branches of the abdominal vagus. *Brain Res* 341: 269-282.

Freeman, P.H., & Wellman, P.J. (1987). Brown adipose tissue thermogenesis induced by low level electrical stimulation of hypothalamus in rats. *Brain Res Bull* 18: 7-11.

Friedman, J.M., & Halaas, J.L. (1988). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395: 763-770.

Friedman, M.I., & Stricker, E.M. (1976). The physiological psychology of hunger: A physiological perspective. *Psychol Rev* 83: 409-431.

Fruebis, J., Tsao, T.S., Javorschi, S., Ebbets-Reed, D., Erickson, M.R., Yen, F.T., Bihain, B.E., & Lodish, H.F. (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2005-2010.

Fry, M., Hoyda, T.D., & Ferguson, A.V. (2007). Minireview: Making sense of it: Roles of the sensory circumventricular organs in feeding and regulation of energy homeostasis. *Exp Biol Med* 232: 14-26.

Fry, M., Smith, P.M., Hoyda, T.D., Duncan, M., Ahima, R.S., Sharkey, K.A., & Ferguson, A.V. (2006). Area postrema neurons are modulated by the adipocyte hormone adiponectin. *J Neurosci* 26: 9695-9702.

Fukushima, M., Tokunaga, J., Lupien, J., Kemnitz, J.W. & Bray, G.A. (1987). Dynamic and static phases of obesity following lesions in PVN and VMH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 253(22): R523-R529.

Garlicki, J., Konturek, P.K., Majka, J., Kwiecien, N., & Konturek, S.J. (1990). Cholecystokinin receptors and vagal nerves in control of food intake in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 258(21): E40-E45.

Gerozissis, K. (2003). Brain insulin, regulation, mechanism of action and functions. *Cell Mol Neurobiol* 23(1):1-25.

Géloën, A., & Trayhurn, P. (1990a). Regulation of the level of uncoupling protein in brown adipose tissue by insuline. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 258(2 pt 2): R418-R424.

Géloën, A., & Trayhurn, P. (1990b). Regulation of the level of uncoupling protein in brown adipose tissue by insuline requires the mediation of the synmpathetic nervous system. *FEBS Lett* 267(2): 265-267.

Giacobino, J.P. (2002). Uncoupling proteins, leptin, and obesity: an updated review. *Ann N Y Acad Sci* 967: 398-402.

Gibbs, J., & Smith, G.P. (1977). Cholecystokinin and satiety in rats and rhesus monkeys. *Am J Clin Nutr* 30: 758-761.

Gibbs, J., Young, RC., Smith, G.P. (1973). Cholecystokinin decreases food intake in rats. *J Comp Physiol Psychol* 84: 488-495.

Gold, R.M. (1973). Hypothalamic obesity: The myth of the ventromedial nucleus. *Science* 182: 488-490.

- Good, D.J., Porter, F. D., Mahon, K.A., Parlow, A.F., Westphal, H., & Kirsh, I.R. (1997). Hypogonadism and obesity in mice with a targeted deletion of the *Hhh2* gene. *Nat Genet* 15(4): 397-401.
- Goshu, E., Jin, H., Fasnacht, R., Sepenski, M., Michaud, J.L., & Fan, C-M. (2002). *Sim2* mutants have developmental defects not overlapping with those of *Sim1* mutants. *Mol Cell Biol* 22(12): 4147-4157.
- Goshu, E., Jin, H., Lovejoy, J., Marion, J-F., M., Michaud, J.L., & Fan, C-M. (2004). *Sim2* contributes to the neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol Endocrinol* 18: 1251-1262.
- Graham, M., Shutter, J.R., Sarmiento, U., Sarosi, I. & Stark, K.L. (1997). Overexpression of *Agtr* leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* 17: 273-274.
- Grider, J.R. (1994). Role of cholecystokinin in the regulation of gastrointestinal motility. *J Nutr* 124: 1334S-1339S.
- Grill, H.J., & Norgren, R.(1978a). The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. *Brain Res* 143:281-297.
- Grill, H.J., & Norgren, R.(1978b). Chronically decerebrate rats demonstrate satiation but not bait shyness. *Science* 201: 267-269.
- Grill, H.J., Schwartz, M.W., Kaplan, J.M., Foxhall, J.S., Breininger, J., & Baskin, D.G. (2002). Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinol* 143(1): 239-246.
- Guan, X.M., Yu, H., Palyha, O.C., McKee, K.K., Feighner, S.D., Sirinathsinghji, D.J.S., Smith, R.G. Van der Ploeg, L.H.T., & Howard, A.D. (1997). Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Molecular Brain Research* 48: 23-29.
- Halass, J.L., Boozer, C., Blair-West, J., Fidahusein, N., Denton, D.A., & Friedman, J.M. (1997). Physiological response to long-term peripheral and central infusion in lean and obese mice. *Proc natl Acad Sci USA* 94: 8878-8883.
- Halaas, J.L., Gajiwala, K.S., Mafei, M., Cohen, S.L., Chait, B.T., Rabinowitz, D., Lallone, R.L., Burley, S.K., & Friedman, J.M. (1995). Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the *obese* gene. *Science* 269: 543-546.
- Halatchev, I.G., Ellacott, K.J., Fan, W., & Cone R.D. (2004). Peptide YY₃₋₃₆ inhibits food intake in mice through a melanocortin-4 receptor-independent mechanism. *Endocrinology* 145: 2585-2590.
- Hallbeck, M., & Blomqvist, A. (1999). Spinal cord-projecting vasopressinergic neurons in the rat paraventricular hypothalamus. *J Comp Neurol* 411: 201-211.

Hallbeck, M., Larhammar, D., & Blomqvist, A. (2001). Neuropeptide expression in rat paraventricular hypothalamic neurons that project to the spinal cord. *J Comp Neurol* 433: 222-238.

Harold, J.A. (2004). Hypothalamic control of energy balance. *Curr Drug Targets* 5: 207-219.

Havel, P.J. (2001). Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: Short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med* 226(11): 963-977.

Heinbecker, P., White, H.I. & Rolf, D. (1944). Experimental obesity in the dog. *Am J Physiol* 141: 549-565.

Herranz, R. (2003). Cholecystokinin antagonists: Pharmacological and therapeutic potential. *Med Res Rev* 23 (5): 559-605.

Hetherington, A.W., & Ranson, S.W. (1940) Hypothalamic lesions and adiposity in the rats. *Anat Rec* 78: 149-172.

Hewson, G., Leighton, G.E., Hill, R.G., & Hughes, J. (1988). The cholecystokinin receptor antagonist L364,718 increases food intake in the rat by attenuation of endogenous cholecystokinin. *Br J Pharmacol* 93:79-84.

Hewson, A.K., & Dickson, S.L. (2000). Systematic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *Journal of Neuroendocrinology* 12: 1047-1049.

Hirose, K., Morita, M., Ema, M., Mimura, J., Hamada, H., Fudji, H., Saijo, Y., Gotoh, O., Sogawa, K., & Fudji-kuriyama, Y., (1996). cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel Basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt). *Mol Cell Biol* 16(4): 1706-1713.

Hoffman, E.C., Reyes, H., Chu, F.F., Sander, F., Conley, L.H., Brooks, B.A., & Hankinson, O., (1991). Cloning of factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 252(5008): 954-958.

Hogenesch, J.B., Chan, W.K., Jackiw, V.H., Brown, R.C., Gu, Y.Z., Pray-Grant, M., Perdew, G.H., & Bradfield C.A., (1997). Characterization of subset of the basic-helix-loop-helix/PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 272(13): 8581-8593.

Hogenesch, J.B., Gu, Y.Z., Moran, S.M., Shimomura, K., Radcliffe, L.A., Takahashi, J.S., & Bradfield, C.A., (2000). The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J Neurosci* 20(13): RC83.

Holder, J.L., Butte, N.F., & Zinn, A.R. (2000). Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the *SIM1* gene. *Hum Mol Genet* 9(1): 101-108.

- Holder, J.L., Zhang, L., Kublaoui, B.M., DiLeone, R.J., Oz, O.K., Bair, C.H., Lee, Y-H., & Zinn, A.R. (2004). *Sim1* gene dosage modulates the homeostatic feeding response to increased dietary fat in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287: E105-E113.
- Hosoya, T., Oda, Y., Takahashi, S., Morita, M., Karachi, S., Ema, M., Yamamoto, M., & Fujii-Kuriyama, Y. (2001). Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of *Arnt2*-knockout mice. *Genes Cells* 6(4): 361-374.
- Hoyda, T.D., Fry, M., Ahima, R.S., & Ferguson, A. (2007). Adiponectin selectively inhibits oxytocin neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Physiol* 585: 805-816.
- Huang, Z.J., Edery, I., & Rosbash, M. (1993). PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature* 364: 259-262.
- Huszar, D., Lynch, C.A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J.H., Fang, Q., Berkemeir, L.R., Gu, W., Kesterson, R.A., Boston, B.A., Cone, R.D., Smith, F.J., Campfield, L.A., Bum, P., & Lee, F. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-141.
- Ikeda, Y., Luo, X., Abbud, R., Nilson, J.H., & Parker, K.L. (1995). The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 9:478-486.
- Ito, M., Gomori, A., Ishihara, A., Oda, Z., Mashiko, S., Matsushita, H., Yumoto, M., Ito, M., Sano, H., Tokita, S., Motiya, M., Iwaasa, H., & Kanatani, A. (2003). Characterization of MCH-mediated obesity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E940-E945.
- Ivy, A.C., & Oldberg, E. (1928). A hormone mechanism for gallbladder contraction and evacuation. *Am J Physiol* 86: 599-613.
- Jing, E., Nillni, E.A., Sanchez, V.C., Stuart, R.C., & Good, D.J. (2004). Deletion of the *Nhlh2* transcription factor decreases the levels of the anorexigenic peptides alpha melanocyte-stimulating hormone and thyrotropin-releasing hormone and implicates prohormone convertases I and II in obesity. *Endocrinol* 145(4): 1503-1513.
- Kadowaki, T., & Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocri Rev* 26:439-451.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., & Kubota, N. (2007). Minireview: The physiological and pathophysiological role of adiponectin and adiponectin receptors in the peripheral tissues and CNS. *FEBS Lett* 582: 74-80.
- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., & Wakabayashi, I. (2000). Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endo* 141(12): 4797-4800.

Koda, S., Date, Y., Murakami, N., Shimbara, T., Hanada, T., Toshinai, K., Nijima, A., Furuya, M., Inomata, N., Osuye, K., & Nakazato, M. (2005). The role of the vagal nerve in peripheral PYY₃₋₃₆ induced feeding reduction in rats. *Endocrinology* 146(5): 2369-2375.

Köhler, C., Haglund, L., & Swanson, L.W. (1984). A diffuse alpha MSH-immunoreactive projection to the hippocampus and spinal cord from individual neurons in the lateral hypothalamic area and zona incerta. *J Comp Neurol* 223(4): 501-514.

Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, N., & kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.

Kokkotou, E., Jeon, J.Y., wang, X., Marino, F.E., Carlson, M., Trombly, D.J., & 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-R124.

Komer, J., Savontaus, E., Chua, S.C., Leibel, R.L., & Wardlaw, S.L. (2001). Leptin regulation of *Agrp* and *Npy* mRNA in rat hypothalamus. *J neuroendocrinol* 13: 959-966.

Korbonits, M., Trainer, P.J., Little, J.A., Edwards, R., Kopelman, P.G., Besser, G.M., Svec, F., & Grossman, A.B. (1997). Leptin levels do not change acutely with food administration in normal or obese subjects, but are negatively correlated with pituitary-adrenal activity. *Clin Endocrinol* 46: 751-757.

Kos, K., Harte, A.L., da Silva, N.F., Tonchev, A., Chaldakov, G., James, S., Snead, D.R., Hoggart, B., O'Hare, J.P., McTernan, P.G., & Kumar, S. (2007). Adiponectin and resistin in human cerebrospinal fluid and expression of adiponectin receptors in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 1129-1136.

Kowalski, T.J., Liu, S.M., Leibel, R.L., & Chua, S.C. (2001). Transgenic complementation of leptin-receptor deficiency. I. Rescue of the obesity/diabetes phenotype of LEPR-null mice expressing a LEPR-B transgene. *Diabetes* 50: 425-435.

Kublaoui, B.M., Gemelli, T., Tolson, K.P., Wang, Y., & Zinn, A.R. (2008). Oxytocin deficiency mediates hyperphagic obesity of *Sim1* haploinsufficient mice. *Mol Endocrinol* 22(7): 1723-1734.

Kublaoui, B.M., Holder, J.L., Gemelli, T., & Zinn, A.R. (2006a). *Sim1* haploinsufficiency impairs melacortin-mediated anorexia and activation of paraventricular nucleus neurons. *Mol Endocrinol* 20: 2483-2492.

Kublaoui, B.M., Holder, J.L., Tolson, K.P., Gemelli, T., & Zinn, A.R. (2006b). *Sim1* overexpression partially rescues agouti yellow and diet-induced obesity by normalizing food intake. *Endocrinol* 147: 4542-4549.

Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Yano, W., Suzuki, R., Ueki, K., Takamoto, I., Satoh, H., Maki, T., Kubota, T., Moroi, M., Okada-Iwabu, M., Ezaki, O., Nagai, R., Ueta, Y., Kadowaki, T., & Noda, T. (2004). Insulin receptor substrate 2 play a crucial role in β cells and the hypothalamus. *J Clin Invest* 114(7): 917-927.

Kubota, N., Terauchi, Y., Yamauchi, T., Kubota, T., Moroi, M., Matsui, J., Eto, K., Yamashita, T., Kamon, J., Satoh, H., Yano, W., Froguel, P., Nagai, R., Kimura, S., Kadowaki, T., Noda, T. (2002). Disruption of adiponectin cause insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277: 25863-25866.

Kubota, N., Yano, W., Kubota, T., Yamauchi, T., Itoh, S., Kumagai, H., Kozono, H., Tahamoto, I., Okamoto, S., Shiuchi, T., Suzuki, R., Satoh, H., Tsuchida, A., Moroi, M., Sugi, K., Noda, T., Ebinuma, H., Ueta, Y., Kondo, T., Araki, E., Ezaki, O., Nagai, R., Tobe, K., Terauchi, Y., Ueki, K., Minokoshi, Y., & Kadowaki, T. (2007). Adiponectin stimulates AMP-activated protein in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 6:55-68.

Kwiat, G.C., & Basbaum, A.I. (1990). Organization of tyrosine hydroxylase-and serotonin-immunoreactive brainstem neurons with axon collaterals to the periaqueductal gray and the spinal cord of the rat. *Brain Res* 528: 83-94.

la Fleur, S.E., Kalsbeek, A., Wortel, J., & Buijs, R.M. (2000). Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. *Brain Res* 871: 50-56.

Larsson, L.I., & Rehfeld, J.F. (1978) Distribution of gastrin and CCK cells in the rat gastrointestinal tract. Evidence for the occurrence of three distinct cell types storing cooh-terminal gastrin immunoreactivity. *Histochemistry* 58: 23-31.

Le Gros Clark, W.E. (1938). Morphological aspects of the hypothalamus. In "The hypothalamus", (Le Gros Clark, W.E., Beattie, J., Riddoch, G., & Dott, N.M., Eds.), pp. 1-68. Oliver & Boyd, Edinburgh.

Le Roux, C.W., & Bloom, S.R. (2005). Peptide YY, appetite and food intake. *Proceeding of the Nutrition Society* 64: 213-216.

Leblanc, J., Lupien, D., Diamond, P., Macari, M., & Richard, D. (1986). Thermogenesis in response to various intake of palatable food. *Can J Physiol Pharmacol* 64 : 976-982.

Lee, G.H., Proenca, R., Montez, J.M., Carroll, K.M., Darvishzadeh, J.G., Lee, J.I., & Friedman, J.M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature* 379: 632-635.

Leibowitz, S.F., Hammer, N.J. & Chang, K. (1981). Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol Behav* 27(6): 1031-1040.

Levine, J.A. (2004). Nonexercise activity thermogenesis (NEAT): environment and biology. *Am J physiol Endocrinol Metab* 286: E675-E695.

Levine, J.A., Eberhardt, N.L., & Jensen, M.D. (1999). Role of nonexercise activity thermogenesis in resistance to fat gain in humans. *Science* 283: 212-214.

Li, B.H., & Rowland, N.E. (1995). Effects of vagotomy on cholecystokinin- and dexfenfluramine-induced Fos-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Res Bull* 37: 589-593.

Liang, J., Suryanarayanan, A., Chandra, D., Homanics, G.E., Olsen, R.W., & Spigelman, I. (2008). Functional consequences of GABAA receptor alpha 4 subunit deletion on synaptic and extrasynaptic currents in mouse dentate granule cells. *Alcohol Clin Exp Res* 32(1): 19-26.

Lin, X., Taguchi, A., Park, S., Kushner, J.A., Li, F., Li, Y., & White, M.F. (2004). Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in β cells and brain causes obesity and diabetes. *J Clin Invest* 114(7): 908-916.

Liddle, R.A., Goldfine, I.D., Rosen, M.S., Taplitz, R.A., & Williams J.A. (1995). Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *J Clin invest* 75: 1144-1152.

Liu, H., Kishi, T., Roseberry, A.G., Cai, X., Lee, C.E., Montez, J.M., Friedman, J.M., & Elmquist, J.K. (2003). Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci* 23: 7143-7157.

Lowell, B.B., & Bachman, E.S. (2003). Beta-adrenergic receptors, diet-induced thermogenesis, and obesity. *J Biol Chem* 278(32): 29385-29388.

Lucas, A. (1998). Programming by early nutrition: An experimental approach. In *Symposium: The effects of childhood diet on adult health and disease*. *J Nutr* 128: 401S-406S.

Ludwig, D.S., Tritos, N.A., Mastaitis, J.W., Kulkarni, R., Kokkotou, E., Elmquist, J., Lowell, B., Flier, J.S., & Maratos-Flier, E. (2001). Melanin-concentrating hormone overexpression in transgenic mice leads to obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 107: 379-386.

Lukaszewski, L., & Praissman, M. (1988). Effect of continuous infusions of CCK-8 on food intake and body and pancreatic weight in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 254(17): R17-R22.

Luquet, S., Perez, F.A., Hnasko, T.S., & Palmiter, R.D. (2005). NPY/AgRP neurons are essential for feeding in the adult mice but can be ablated in neonates. *Science* 310(5748): 683-685.

Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Honie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T., & Matsuzawa, Y. (2002). Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8:731-737.

Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., Kern, P.A., & Friedman, J.M. (1995) Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and *ob* RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1(11): 1155-1165.

Majdic, G., Young, M., Gomez-Sanchez, E., Anderson, P., Szczepaniak, L.S., Dobbins, R.L., McGarry, J.D., & Parker, K.L. (2002). Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinol* 143: 607-614.

Mantella, R.C., Rinaman, L., Vollmer, R.R., & Amico, J.A. (2003). Cholecystokinin and D-fenfluramine inhibit food intake in oxytocin-deficient mice. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 285: R1037-R1045.

Marion, JF., Yang, C., Caqueret, A., Boucher, F., & Michaud, JL. (2005). *Sim1* and *Sim2* are required for the correct targeting of mammillary body axons. *Development* 132(24): 5527-5537.

Marks, D.L., Hruby, V., Brookhart, G., & Cone, R.D. (2006). The regulation of food intake by selective stimulation of the type 3 melanocortin receptor (MC3R). *Peptides* 27(2): 259-264.

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., Shen, Z., Frazier, E.G., Yu, H., Metzger, J.M., Kuca, S.J., Shearman, L.P., Gopal-Truler, S., MacNeil, D.J., Strack, A.M., Macintyre, D.E., Van der Ploeg, L.H., & qian, S. (2002). Melanin-concentrating hormone 1 receptor-deficient mice are lean, hyperactive, and hyperphagic and have altered metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3240-3245.

Masuzaki, H., Ogawa, Y., Isse, I., Satoh, N., Okazaki, T., Shigemoto, M., Mori, K., Tamura, N., Hosoda, K., Yoshimasa, Y., & al. (1995). Humn obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. *Diabetes* 44(7): 855-858.

Matson, C.A., Wiater, M.F., Kuijper, J.L., & Weigle, D.S. (1997). Synergy between leptin and cholecystokinin (CCK) to control daily caloric intake. *Peptides* 18: 1275-1278.

Matzinger, D., Degen, L., Drewe, J., Meuli, J., Duebendorfer, R., Ruckstuhl, N., D'Amato, M., Rovati, L., & Beglinger, C. (2000). The role of long chain fatty acid in regulating food intake and cholecystokinin release in humans. *Gut* 46: 688-693.

McGowan, B.M.C., & Bloom, S.R. (2004). Peptide YY and appetite control. *Current Opinion in Pharmacology* 4: 583-588.

McGowan M.K., Andrews, K.M., & Grossman, S.P. (1992). Chronic intrahypothalamic infusions of insulin or insulin antibodies alter body weight and food intake in the rat. *Physiol Behav* 51: 753-766.

McLaughlin, J., Grazia Luca, M., Jones, M.N., D'Amato, M., Dockray, G.T., & Thompson, D.G. (1999). Fatty acid chain length determines cholecystokinin secretion and effect on human gastric motility. *Gastroenterology* 166: 46-53.

McMinn, J.E., Baskin, D.G., & Schwartz, M.W. (2000). Neuroendocrine mechanisms regulating food intake and body weight. *Obesity Rev* 1: 37-46.

Mercer, J.G., Farningham, D.A., & Lawrence, C.B. (1992). Effect of neonatal capsaicin treatment on cholecystokinin-(CCK8) satiety and axonal transport of CCK binding sites in the rat nerve. *Brain Res* 569: 311-316.

Mercer, J.C., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, C.T., & Trayhurn, P. (1996). Localization of leptin receptor mRNA and the long form slice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett* 387: 113-116.

Michaud, J.L., Boucher, F., Melnyk, A., Gauthier, F., Goshu, E., Lévy, E., Mitchell, G.A., Himms-Hagen, J., & Fan, C.M. (2001). *Sim1* haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* 10(14): 1465-1473.

Michaud, J.L., De Rossi, C., May, N.R., Holdener, B.C., & Fan, C.M. (2000). ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech Dev* 90(2): 253-261.

Michaud, J.L., Rosenquist, T., May, N.R., & Fan, C-M. (1998). Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev* 12: 3264-3275.

Mizuno, T.M., Kleopoulos, S.P., Bergen, H.T., Roberts, J.L., Priest, C.A., & Mobbs, C.V. (1998). Hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA is reduced by fasting and [corrected] in *ob/ob* and *db/db* mice, but is stimulated by leptin. *Diabetes* 47: 294-297.

Moffett, P., Davo, M., Reece, M., McCormick, M.K., & Pelletier, J. (1996). Characterization of *msim*, a murine homologue of the *drosophila sim* transcription factor. *Genomics* 35: 144-155.

Moffett, P., Reece, M., & Pelletier, J. (1997). The murine *Sim-2* gene product inhibits transcription by active repression and functional interference. *Mol Cell Biol* 17(9): 4933-4947.

Moffett, P., & Pelletier, J. (2000). Different transcriptional properties of mSim-1 and mSim-2. *FEBS Letters* 466: 80-86.

Moran, T.H., Ameglio, P.J., Schwartz, G.J., & McHugh, P.R. (1992). Blockade of type A, but not type B, CCK receptors attenuates satiety actions of exogenous and endogenous CCK. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 262: R46-R50.

Moran, T.H., Ameglio, P.J., Peyton, H.J., Schwartz, G.J., & McHugh, P.R. (1993). Blockade of type A, but not type B, CCK receptors postpones satiety in rhesus monkeys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 265: R620-R624.

Moran, T.H., Baldessarini, A.R., Salorio, C.F., Lowery, T., & Schwartz, G.J. (1997). Vagal afferent and efferent contributions to the inhibition of food intake by cholecystokinin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 272(41): R1245-R1251.

Morrison, S.F. (2004). Central pathways controlling brown adipose tissue thermogenesis. *News Physiol Sci* 19: 67-74.

Morton, G.J., Niswender, K.D., Rhodes, C.J., Myers, M.G., Blevins, J.E., Baskin, D.G., & Schwartz, M.W. (2003). Arcuate nucleus-specific leptin receptor gene therapy attenuates the obesity phenotype of Koletsky (fa^K/fa^K) rats. *Endocrinol* 144: 2016-2024.

Muccioli, G., Tschöp, M., Papotti, M., Deghenghi, R., Heiman, M., & Ghigo, E. (2002). Neuroendocrine and peripheral activities of ghrelin: implications in metabolism and obesity. *European Journal of Pharmacology* 440: 235-254.

Naggert, J.K., Fricker, L.D., Varloamov, O., Nishina, P.M., Rouille, Y., Steiner, D.F., Carroll, R.J., Paigen, B.J., & Leiter, E.H. (1995). Hyperproinsulinaemia in obese *fat/fat* mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity. *Nat Genet* 10: 135-142.

Nakai, S., Kawano, H., Yudate, T., Nishi, M., Kuno, J., Nagata, A., Jishage, K., Hamada, H., Fujii, H., Kawamura, K., Kiyotaka, S., & Noda, T. (1995). The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev* 9(24): 3109-3121.

Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., & Matsukura, S. (2001). A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 409: 194-198.

Nambu, J.R., Lewis, J.O., Wharton, K.A., & Crews, S.T. (1991). The drosophila *single-minded* gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *Cell* 67: 1157-1167.

Nedergaard, J., Bengtsson, T., & Cannon, B. (2007). Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E444-E452.

Nijijima, A., Rohner-Jeanrenaud, F., & Jeanrenaud, B. (1984). Role of ventromedial hypothalamus on sympathetic efferents of brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 247 (4 pt 2): R650-R654.

Nilaweera, K.N., Ellis, C., Barelt, P., Mercer, J.G., & Morgan, P.J. (2002). Hypothalamic bHLH transcription factors are novel candidates in the regulation of energy balance. *Eur J Neurosci* 15: 644-650.

Nishimura, H., & Oomura, Y. (1987). Effects of hypothalamic stimulation on activity of dorsomedial medulla neurons that respond to subdiaphragmatic vagal stimulation. *J Neurophysiol* 58: 655-675.

Niswender, K.D., Morrison, C.D., Clegg, D.J., Olson, R., Baskin, D.G., Myers, M.G., Seeley, R.J., & Schwartz, M.W. (2003). Insulin activation of phosphatidylinositol 3-kinase in the hypothalamic arcuate nucleus. A key mediator of insulin-induced anorexia. *Diabetes* 52: 227-231.

Niswender, K.D., Morton, G.J., Stearns, W.H., Rhodes, C.J., Myers, M.G., & Schwartz, M.W. (2001). Key enzyme in leptin-induced anorexia. *Nature* 413: 794-795.

Nobel, F., Wank, S.A., Crawley J.N., Bradwejn, J., Seroogy, K.B., Hamon, M., & Roques, B.P. (1999). International union of pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol rev* 51:745-781.

Norgren, R., & Smith, G.P. (1988). Central distribution of subdiaphragmatic vagal branches in the rat. *J Comp Neurol* 273: 207-223.

Obici, S., Zhaohui, F., Karknias, G., Baskin, D.G., & Rossetti, L. (2002). Decreasing hypothalamic insulin receptor causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nature Neurosci* 5(6): 566-572.

Oldfield, B.J., Allen, A.M., Davern, P., Giles, M.E., & Owens, N.C. (2007). Lateral hypothalamic "command neurons" with axonal projections to regions involved in both feeding and thermogenesis. *Eur J Neurosci* 25: 2404-2412.

Oldfield, B.J., Giles, M.E., Watson, A., Anderson, C., Colvill, L.M., & McKinley, M.J. (2002) The neurochemical characterisation of hypothalamic pathways projecting polysynaptically to brown adipose tissue in the rat. *Neurosci* 110(3): 515-526.

Ollmann, M.M., Wilson, B.D., Yang, Y-K., Kerns, J.A., Chen, Y., Gantz, I. & Barsh, G.S. (1997). Antagonism of the central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* 278: 135-138.

Olson, B.R., Freilino, M., Hoffman, G.E., Stricker, E.M., Sved, A.F., & Verbalis, J.G. (1993). C-fos expression in the rat brain and brainstem nuclei in response to treatments that alter food intake and gastric mobility. *Mol Cell Neurosci* 4: 93-106.

Palkovits, M., Záborszky, L., Ferminger, A., Mezey, E., Fekete, M.I., Herman, J.P., Kanyicska, B., & Szabo, D. (1980). Noradrenergic innervation of the rat hypothalamus: Experimental biochemical and electron microscopic studies. *Brain Res* 191(1): 161-171.

Pekins, M.N., Rothwell, N.J., Stock, M.J., & Stone, T. (1981). Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. *Nature* 289: 401-402.

Pelleymounter, M.A., Cullen, M.J., Baker, M.B., Hecht, R., Winters, D., Boone, T., & Collins, F. (1995). Effects of the *obese* gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science* 269: 540-543.

Pittner, R.A., Moore, C.X., Bhavsar, S.P., Gedulin, B.R., Smith, P.A., Jodka, C.M., Parkers, D.G., Paterniti, J.R., Srivastava, V.P. & Young, A.A. (2004). Effects of PYY₃₋₃₆ in rodent models of diabetes and obesity. *International Journal of Obesity* 28: 963-971.

Polak, J.M., Bloom, S.R., Rayford, P.L., Pearse, A.G., Buchan, A.M., & Thompson, J.C. (1975). Identification of cholecystokinin-secreting cells. *Lancet* 2: 1916-1018.

Polonsky, K.S., Given, B.D., Hirsch, L., Shapiro, E.T., Tillil, H., Beebe, C., Galloway, J.A., Frank, B.H., Karrison, T., & Van Cauter, E. (1988). Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 81: 435-442.

Qi, Y., Takahashi, N., Hileman, S.M., Patel, H.R., Berg, A.H., Pajvani, U.B., Scherer, P.E., & Ahima, R.S. (2004). Adiponectin acts in the brain to decrease body weight.

Rehfeld, J.F., Bundgaard, J.R., Frus-Hansen, L., & Goetze, J.P. (2003). On the tissue-specific processing of procholecystokinin in the brain and gut- A short review. *J Physiol Pharmacol* 54 (suppl 4): 73-79.

Richard, D. (2007). Energy expenditure: a critical determinant of energy balance with key hypothalamic controls. *Minerva Endocrinol* 32:173-183.

Ricquier, D., & Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem J* 345 pt2: 161-179.

Rinaman, L. (1998). Oxytocinergic inputs to the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the vagus in neonatal rats. *J Comp Neurol* 399: 101-109.

Rinaman, L. (2001). Postnatal development of catecholamine inputs to the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. *J Comp Neurol* 438:411-422.

Rinaman, L. (2006). Ontogeny of hypothalamic-hindbrain feeding control circuits. *Dev Psychobiol* 48: 389-396.

Rinaman, L. & Levitt, P. (1993). Establishment of vagal sensory-motor circuits during fetal development in rats. *J Neurobiol* 24: 641-659.

Rinaman, L., Card, J.P., Schwaber, J.S., & Miselis, R.R. (1989). Ultrastructural demonstration of a gastric monosynaptic vagal circuit in the nucleus of the solitary tract in rat. *J Neurosci* 9: 1985-1996.

Rinaman, L., Vollmer, R.R., Karam, J., Phillips, D., Li, X., & Amico, J.A. (2005). Dehydration anorexia is attenuated in oxytocin-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R87-R96.

Ritter, R.C., & Ladenheim, E.E. (1985). Capsaicin pre-treatment attenuates suppression of food intake by cholecystokinin octapeptide, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 248(17): R501-R504.

Robinson, S. W., Dinulescu, D. M., & Cone, R. D. (2000). Genetic models of obesity and energy balance in the Mouse. *Annu Rev Genet* 34: 387-745.

Sakaguchi, T., Bray, G.A. (1988). Sympathetic activity following paraventricular injections of glucose and insulin. *Brain Res Bull* 21: 25-29.

Sakaguchi, T., Bray, G.A., & Eddlestone, G. (1988). Sympathetic activity following paraventricular or ventromedial hypothalamic lesions in rats. *Brain Res Bull* 20: 461-465.

Sakata, I., Yanazaki, M., Inoue, K., Hayashi, Y., Kangawa, K., & Sakai, T. (2003). Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion. *Neuroscience Letters* 342:183-186.

Saper, C.B. (2004). Central Autonomic system. In "The rat nervous system" (Paxinos, G., Eds), pp. 761-796. Elsevier, San Diego.

Saper, C.B., Swanson, L.W., & Cowan, W.M. (1976). The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J Comp Neurol* 169(4): 409-442.

Sawchenko, P.E. (1983). Central connections of the sensory and motor nuclei of the vagus nerve. *J Auton Nerv Syst* 9: 13-26.

Sawchenko, P.E., & Swanson, L.W. (1982). Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol* 205: 260-272.

Sawchenko, P.E., Swanson, L.W., & Vale, W.W. (1984). Corticotropin-releasing factor: co-expression within distinct subsets of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of male rat. *J Neurosci* 4(4): 1118-1129.

Scarpaga, P.J., Matheny, M., Pollock, B.H., & Tümer, N. (1997). Leptin increases uncoupling protein expression and energy expenditure. *Am J physiol Endocrinol Meta* 36: E226-E230.

Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., & Lodish, H.F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270: 26746-26749.

Schonemann, M.D., Ryan, A.K., McEvelly, R.J., & O'Connell, C.A. (1995). Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor BRN2. *Genes & Dev* 9: 3122-3135.

Schwartz, G.J. (2000). The role of gastrointestinal vagal afferents in the control of food intake: current prospects. *Nutr* 16: 866-873.

Schwartz M.W., Bergman, R.N., Kahn, S.E., Taborsky, G.J., Fisher, L.D., Sipols, A.J., Woods, S.C., Steil, G.M., & Porte, D. (1991). Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. *J Clin Invest* 88: 1272-1281.

Schwartz, M.W., Seeley, R.T., Woods, S.C., Weigle, D.S., Campfield, L.A., Burn, P., & 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., Kahn, S.E., Lattemann, D.F., Taborsky, G.J., Bergman, R.N., Woods, S.C., & Perte, D. (1990). Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 259(22): E378-E383.

Schwartz, M.W., Sipols, A., Marks, J.L., Sanacora, G., White, J.D., Scheurink, A., Kahn, S.E., Baskin, D.G., Woods, S.C., Figlewicz, D.P., & Porte, D. (1992). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinol* 130: 3608-3616.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Seeley, R.J., Barsh, G.S., Baskin, D.G., & Leibel, R.I. (2003). Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? *Diabetes* 52: 232-238.

Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., & Baskin, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-671.

Scott, V., Kimura, N., Stark, J.A., & Luckman, S.M. (2005). Intravenous peptide YY₃₋₃₆ and Y2 receptor antagonism in the rat: Effects on feeding behaviour. *Journal of Neuroendocrinol* 17: 453-457.

Segal-Lieberman, G., Bradley, R.L., Kokkotou, E., Carlson, M., Trombly, D.J., Wang, X., Bates, S., Myers, M.G., Flier, J.S., & Maratos-Flier, E. (2003). Melanin-concentrating hormone is a critical mediator of the leptin-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(17): 10085-10090.

Shapiro, R.E. & Miselis, R.R. (1985). The central organization of the vagus nerve innervating the stomach of the rat. *J Comp Neurol* 238: 473-488.

Shimada, M., Tritos, N.A., Lowell, B.B., Flier, J.S., & Maratos-Flier, E. (1998). Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature* 396: 670-674.

Shimazu, T., & Takahashi, A. (1980). Stimulation of hypothalamic nuclei has differential effects on lipid synthesis in brown and white adipose tissue. *Nature* 284(5751): 62-63.

Shintani, M., Ogawa, Y., Ebihara, K., Aizawa-Abe, M., Miyanaga, F., Takaya, K., Hayashi, T., Inoue, G., Hosada, K., Kojima, M., Kangawa, K., & Nakao, K. (2001).

Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 50: 227-232.

Shuto, Y., Shibasaki, T., Otagiri, A., Kuriyama, H., Ohata, H., Tamura, H., Kamegai, J., Sugihara, H., Oikawa, S., & Wakabayashi, I. (2002). Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding and adiposity. *The Journal of Clinical Investigation* 109(11): 1429-1436.

Simerly, R.B. (2004). Anatomical substrates of the hypothalamic integration. In "The rat nervous system" (Paxinos, G., Eds.), pp. 335-368. Elsevier, San Diego.

Sipols, A.J., Baskin, D.G., & Schwartz, M.W. (1995). Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* 44(2): 147-151.

Small, C.J., Kim, M.S., Standley, S.A., Mitchell, R.D., Murphy, K., Morgan, G.A., Glantei, M.A., & Bloom, S.R. (2001). Effects of chronic central nervous system administration of agouti-related protein in pair-fed animals. *Diabetes* 50:248-254.

Smith, G.P. (1996). The direct and indirect controls of meal size. *Neurosci Biobehav Rev* 20(1): 41-46.

Smith, G.P. (2000a). The controls of eating: brain meanings of food stimuli. *Prog Brain Res* 122: 173-186.

Smith, G.P. (2000b). The controls of eating: A shift from nutritional homeostasis to behavioural neuroscience. *Nutr* 16: 814-820.

Smith, G.P., Jerome, C., & Norgren, R. (1985). Afferent axons in abdominal vagus mediate satiety effect of cholecystikinin in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 249(18): R638-R641.

Sofroniew, M.V., & Schrell, U. (1981). Evidence for a direct projection from oxytocin and vasopressin neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus to the medulla oblongata: Immunohistochemical visualization of both the horseradish peroxidase transported and the peptide produced by the same neurons. *Neurosci Lett* 22: 211-217.

South, E.H., & Ritter, R.C. (1988). Capsaicin application to central or peripheral vagal fibers attenuates CCK satiety. *Peptides* 9: 601-612.

Spiegelman, B.M., & Flier, J.S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104: 531-543.

Spranger, J., Verma, S., Gohring, I., Bobbert, T., Seifert, J., Sindler, A.L., Pfeiffer, A., Hileman, S.M., Tschöp, M., & Banks, W.A. (2006). Adiponectin does not cross the blood-brain-barrier but modifies cytokine expression of brain endothelial cells. *Diabetes* 55: 141-147.

Stellar, E. (1954). The physiology of motivation. *Psychol Rev* 61: 5-22.

Stephens, T.W., Basinski, M., Bristow, P.K., Bue-Valleskey, J.M., Burgett, S.G., Craft, L., Hale, J., Hoffmann, J., Hsiung, H.M., Kriaucunas, A., MacKellar, W., Rosteck, P.R., Schoner, B., Smith, D., Tinsley, F.G., Zhang, X-Y., & Helman, M. (1995). The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the *obese* gene product. *Nature* 377: 530-532.

Stock, M.J., & Rothwell, N.J. (1986). The role of brown fat in diet-induced thermogenesis. *Int J Vitam Nutr Res* 56(2): 205-210.

Strader, A.D., & Woods, S.C. (2005). Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 128: 175-191.

Strubbe, J.H., & Mein, C.G. (1977). Increase feeding in response to bilateral injection of insulin antibodies in the VMH. *Physiol Behav* 19: 309-313.

Swaab, D.F., Nijveldt, F., & Pool, C.W. (1975). Distribution of oxytocin and vasopressin cells in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. *J Endocrinol* 67: 461-462.

Swanson, L.W. (1987). The hypothalamus. In "Handbook of chemical neuroanatomy" (Björklund, A., Hökfelt, T., & Swanson, L.W., Eds.), vol.5, Part I, pp. 1-124. Elsevier, Amsterdam/New York.

Swanson, L.W., & Kuypers, H.G. (1980). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194(3): 555-570.

Swanson, L.W., & Sawchenko, P.E. (1980). Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinol* 31(6): 410-417.

Swanson, L.W., & Sawchenko, P.E. (1983). Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nucleus. *Ann Rev Neurosci* 6: 269-324.

Swanson, L.W., Sawchenko, P.E., Wiegand, S.J., & Price, J.L. (1980). Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla or spinal cord. *Brain Res* 198: 190-195.

Takeda, S., Eleftheriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K.L., Armstrong, D., Ducy, P., & Karsenty, G. (2002). Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 111: 306-317.

Thornton, J.E., Cheung, C.C., Clifton, D.K., & Steiner, R.A. (1997). Regulation of hypothalamic proopiomelanocortin mRNA by leptin in *ob/ob* mice. *Endocrinol* 138: 5063-5066.

Tokunaga, K., Fukushima, M., Kemnitz, J.W. & Bray, G.A. (1986). Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am J physiol Regul Integr Comp Physiol* 251(20): R1221-R1227.

Tokunaga, K., Matsuzawa, Y. & Bray, G.A. (1990). Behavioural, endocrinological and metabolic characterization of VMH- and PVN-lesioned obese rats. In "Progress in Obesity Research" (Oomura, Y., Tarui, S., Inoue, S., et al., Eds.), pp. 431-434. John Libbey and Co., London.

Torsoni, M.A., Calvalheira, J.B., Pereira-Da-Silva, M., de Carvalho-Filho, M.A., Saad, M.J., & Velloso, L.A. (2003). Molecular and functional resistance to insulin in the hypothalamus of rats exposed to cold. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E216-E223.

Tran, P.V., Lee, M.B., Marin, O., Xu, B., Jones, K.R., Reichardt, L.F., Rubenstein, J.R., & Ingraham, H.A. (2003). Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. *Mol Cell Neurosci* 2003;22:441-453

Trayhurn, P., & Fuller, L. (1980). The development of obesity in genetically diabetic-obese (*db/db*) mice pair-fed with lean siblings. *Diabetologia* 19: 148-153.

Tschöp, M., Castaneda, T.R., Joost, H.G., Thöne-Reineke, C., Ortmann, S., Klaus, S., Hagan, M.M., Chandler, P.C., Oswald, K.D., Benoit, S.C., Seeley, R.J., Kinzic, K.P., Moran, T.H., Beck-Sickinger, A.G., Koglin, N., Rodgers, R.J., Blundell, J.E., Ishii, Y., Beattie, A.H., Holch, P., Allison, D.B., Raun, K., Madsen, K., Wulff, B.S., Stidsen, C.E., Birringer, M., Kreuzer, O.J., Schindler, M., Arndt, K., Rudolf, K., Mark, M., Deng, X.Y., Whitcomb, D.C., Halem, H., Taylor, J., Dong, J., Datta, R., Culler, M., Craney, S., Flora, D., Smiley, D. & Heiman, M.L. (2004). Physiology: Does gut hormone PYY(3-36) decrease food intake in rodents? *Nature* 430:165-167.

Tschöp, M., Smiley, D.L., & Helman, M.L. (2000). Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 407: 908-913.

Tucker, D.C., Saper, C.B., Ruggiero, D.A., & Reis, D.j. (1987). Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of the ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord. *J Comp Neurol* 259: 591-603.

Ugrumov, M.V. (2002). Magnocellular vasopressin system in ontogenesis: Development and regulation. *Micros Res Tech* 56: 164-171.

Vaisse, C., Clément, K., Durand, E., Hereberg, S., Guy-Grand, B. & Froguel, P. (2000). Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 106: 253-262.

Vaisse, C., Halaas, J.L., Horvath, C.M., Darnell, J.E., Stoffel, M., & Friedman, J.M. (1996). Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nature genetics* 14: 95-97.

- Valverde, F., Garcia, C., Lopez-Mascaraque, L., & De Carlos, J.A. (2000). Development of the mammillothalamic tract in normal and Pax-6 mutant maize. *J Comp Neurol* 419(4): 485-504.
- Vanderhorst, V.G., & Ulfhake, B. (2006). The organization of the brainstem and spinal cord of the mouse: Relationship between monoaminergic, cholinergic, and spinal projection systems. *J Chem Neuroanat* 31(1): 2-36.
- Vandesande, F., & Dierickx, K. (1975). Identification of the vasopressin producing and of the oxytocin producing neurons in the hypothalamic neurosecretory system of the rat. *Cell Tiss Res* 164: 153-162.
- Van Dijk, G., Thiele, T.E., Donahey, J.C.K., Campfield, L.A., Smith, F.J., Burn, P., Bernstein, I.L., Woods, S.C., & Seeley, R.J. (1996). Central infusion of leptin and GLP-1 (7-36) amide differentially stimulate c-Fos-like immunoreactivity in the rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 271: R1096-R1100.
- Vander Tuig, J.G., Knehans, A.W., & Romsos, D.R. (1982). Reduced sympathetic nervous system activity in rats with ventromedial hypothalamic lesions. *Life Sci* 30(11): 913-920.
- Vann, S.D., & Aggleton, J.P. (2003). Evidence of a spatial encoding deficit in rats with lesions of the mammillary bodies or mammillothalamic tract. *J Neurosci* 23(8): 3506-3514.
- Vann, S.D., & Aggleton J.P. (2004). The mammillary bodies: Two memory systems in one? *Nat Rev Neurosci* 5(1); 35-44.
- Veening, J.G., Swanson, L.W., Cowan, W.M., Nieuwenhuys, R., & Geeraedts, L.M.G. (1982). The medial forebrain bundle of the rat. II. An autoradiographic study of the topography of the major descending and ascending components. *J Comp Neurol* 206: 82-108.
- Vickers, M.H., Gluckman, P.D., Coveny, A.H., Hofman, P.L., Cutfield, W.S., Gertler, A., Breier, B.H., & Harris, M. (2005). Neonatal leptin treatment reverses developmental programming. *Endocrinol* 146(10): 4211-4216.
- Voorn, P., & Buijs, R.M. (1983). An immuno-electronmicroscopical study comparing vasopressin, oxytocin, substance P and enkephalin containing nerve terminals in the nucleus of the solitary tract of the rats. *Brain Res* 270: 169-173.
- Wang, J., Alexander, J.T., Zheng, P., Yu, H.J., Dourmashkin, J. & Leibowitz, S.F. (1998a). Behavioral and endocrine traits of obesity-prone and obesity-resistant rats on macronutrient diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 274(37): E1057-E1066.
- Wang, L., Martinez, V., Barrachina, M., & Taché, Y. (1998b). Fos expression in the brain induced by peripheral injection of CCK or leptin plus CCK in fasted lean mice. *Brain Res* 791: 157-166.

Wang, L., Saint-Pierre, D.H., & Taché, Y. (2002). Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y- synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters* 325: 47-51.

Wang, W., & Lufkin, T. (2000). The murine otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol* 227(2): 432-449.

Weigle, D.S., Bukowski, T.R., Foster, D.C., Holderman, S., Kramer, J.M., Lasser, G., Lofton-Day, C.E., Prunkard, D.E., Raymond, C., & Kuijper, J.L. (1995). Recombinant *ob* protein reduces feeding and body weight in the *ob/ob* mouse. *J Clin Invest* 96: 2065-2070.

West, D.B., Fey, D., & Woods, S. (1984). Cholecystokinin persistently suppresses meal size but not food intake in free-feeding rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 15: R776-R787.

West, D.B., Greenwood, M.R., Sullivan, A.C., Prescod, L., Marzullo, L.R., & Triscani, J. (1987). Infusion of cholecystokinin between meals into free-feeding rats fails to prolong the intermeal interval. *Physiol Behav* 39: 111-115.

Williams, G., Bing, C., Cai, X.J., Harrold, J.A., King, P.J., & Liu, X.H. (2001). The hypothalamus and the control of energy homeostasis. Different circuits, different purposes. *Physiol Behav* 74: 683-701.

Winslow, J.T., & Insel, T.R. (2002). The social deficits of the Oxytocin knockout mouse. *Neuropeptides* 36(2-3): 221-229.

Winslow, J.T., Young, L.J., Hearn, E., Gingrich, B., Wang, Z., Guo, Q., Matzuk, M.M., & Insel, T.R. (1998). Phenotypic expression of an oxytocin peptide null mutation in mice. *Adv Exp Med Biol* 449: 241-243.

Woods, S.C., Decker, E., & Vasselli, J.R. (1974). Metabolic hormones and regulation of body weight. *Psychol Rev* 81: 26-43.

Woods, S.C., Lotter, E.C., McKay, L.D., & Porte, D. (1979). Chronic intracerebroventricular infusion reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503-505.

Woods, S.C., Lutz, T.A., Geary, N., & Langhans, W. (2006). Pancreatic signals controlling food intake: Insulin, glucagon and amylin. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci* 361 (1471): 1219-1235.

Woods, S.C., & Seeley, R.J. (2000). Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* 16(10): 894-902.

Wren, A.M., Seal, L.J., Cohen, M.A., J., Brynes, A.E., Frost, G.S., Murphy, K.G., Dhillo, W.S., Ghatei, M.A., & Bloom, S.R. (2001a). Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 812: 5992-5995.

Wren, A.M., Small, C.J., Abbott, C.R., Dhillon, W.S., Seal, L.J., Cohen, M.A., Batterham, R.L., Taheri, S., Stanley, S.A., Ghatei, M.A., & Bloom, S.R. (2001b). Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats. *Diabetes* 50: 2540-2547.

Yamaki, A., Noda, S., Kudoh, J., Shindoh, N., Maeda, H., Minoshima, S., Kawasaki, K., Shimizu, Y., & Shimizu, N. (1996). The mammalian *single-minded (Sim)* gene: mouse cDNA structure and diencephalic expression indicate a candidate gene for Down syndrome. *Genomics* 35: 136-143.

Yamauchi, T., Nio, Y., Maki, T., Kobayashi, M., Takazawa, T., Iwabu, m., Akada-Iwabu, M., Kawamoto, S., Kubota, N., Kubota, T., Ito, Y., Kamon, J., Tsuchida, A., Katsuyoshi, K., Hozono, H., Hada, Y., Ogata, H., Tokuyama, K., Tsunod, M., Ide, T., murakami, K., Awazawa, M., Takamoto, I., Froguel, P., Hara, K., Tobe, K., Ryozi, N., Ueki, K., & kadowaki, T. (2007). Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 13:332-339.

Yang, C., Gagnon, D., Vachon, P., Tremblay, A., Levy, E., Massie, B., Michaud, J.L. (2006). Adenoviral-mediated modulation of *Sim1* expression in the paraventricular nucleus affects food intake. *J Neurosci* 26(26): 7116-7120.

Yasuda, T., Masaki, T., Kakuma, T., & Yoshimatsu, H. (2004). Hypothalamic melanocortin system regulates sympathetic nerve activity in brown adipose tissue. *Exp Biol Med* 229: 235-239.

Yaswer, L., Diehi, N., Brennan, M.B. & Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency reponds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5(9): 1066-1070.

Yoshida, T., kemnitz, J.W., & Bray, G.A. (1983). Lateral hypothalamic lesions and norepinephrine turnover in rats. *J Clin Invest* 72: 919-927.

Yura, S., Itoh, H., Sagawa, N., Yamamoto, H., Masuzaki, H., Nakao, K., Kawamura, M., Takemura, M., Kakui, K., Ogawa, Y., & Fulli, S. (2005). Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* 1(6): 371-378.

Zhang, D.M., Bula, W., & Stellar, E. (1986). Brain cholecystokinin as a satiety peptide. *Physiol Behav* 36: 1183-1186.

Zhang, L.L. & Ashwell, K.W.S. (2001a). The development of cranial nerve and visceral afferents to the nucleus of the solitary tract in the rat. *Anat Embryol* 204: 135-151.

Zhang, L.L. & Ashwell, K.W.S. (2001b). Development of the cyto- and chemoarchitectural organization of the rat nucleus of the solitary tract. *Anat Embryol* 203:265-282.

Zhang, X., Fogel, R., & Renehan, W.E. (1999). Stimulation of the paraventricular nucleus modulates the activity of gut-sensitive neurons in the vagal complex. *Am J Physiol Gastrointes Liver Physiol* 277: G79-G90.

Zhang, X., Shi, T., Holmberg, K., Landry, M., Huang, W., Xiao, H., Ju, J., & Hokfelt, T. (1997). Expression and regulation of the neuropeptide Y Y2 receptor in sensory and autonomic ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 729-734.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffel, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.

Zhao, A.Z., Huan, J.N., Gupta, S., Pal, R., & Sahu, A. (2002). A phosphatidylinositol 3-kinase-phosphodiesterase 3B-cyclic AMP pathway in hypothalamic action of leptin on feeding. *Nature Neurosci* 5(8): 727-728.

Zheng, H., Patterson, L.M., Phifer, C.B., & 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(1): R247-R258.

**ANNEXE 1 :
ARTICLE DE REVISION**

**Looking for Trouble: A Search for Developmental Defects of the
Hypothalamus**

Publié dans: *Hormone Research* 64(5): 222-230, 2005

Mini Review

Looking for Trouble: A Search for Developmental Defects of the Hypothalamus

Aurore Caqueret, Chun Yang, Sabine Duplan, Francine Boucher,
Jacques L. Michaud

Research Center, Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada

Address of Corresponding Author

Dr. Jacques L. Michaud
Research Center, Hôpital Sainte-Justine
3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, Qué., H3T 1C5 (Canada)
Tel. +1 514 345 4727, Fax +1 514 345 4766

OUTLINE

- Abstract
- Key Words
- Introduction
- Patterning of the Hypothalamus by Extrinsic Signals
- Transcriptional Control of Cell-Type Specification in the Hypothalamus
 - Paraventricular and Supraoptic Nuclei
 - Arcuate Nucleus
 - Ventromedial Nucleus
- Physiological Relevance of Transcriptional Regulators of Hypothalamus Development
- Establishment of Circuitries
- Imprinting and Hypothalamic Development
- Conclusion
- References
- Legends
- Figures

ABSTRACT

The hypothalamus is a critical integrator of several homeostatic processes that are required for the survival of vertebrates. Disruption of the development of the hypothalamus thus has the potential of perturbing important physiological processes with lifelong consequences. We review current knowledge about how cell types are specified and circuits are formed within the developing hypothalamus. We emphasize the potential clinical impact of the perturbations of these pathways using the regulation of energy balance as a model. We predict that disruption of hypothalamic development is a common, previously unsuspected cause of disorders of homeostatic processes such as obesity and high blood pressure.

Key Words : hypothalamus, developmental defects, transcription factor, imprinting, energy balance.

INTRODUCTION

The hypothalamus is an evolutionary ancient integrator of homeostasis that regulates basic processes such as food and water intake, energy expenditure, the response to stress, blood pressure, and reproduction. Structurally, the hypothalamus is composed of a dozen small nuclei interspaced between less defined regions. A great body of work involving physiological and genetic studies has assigned specific functions to each of these nuclei and regions (see summary in fig. 1). In contrast, relatively little attention has been paid to how the different components of the hypothalamus are specified and connected. Understanding the development of the hypothalamus has the potential of shedding light on frequent pathological processes that can manifest even late in life. An immediate illustration of this principle is provided by classical work done on the development of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons and its disruption in some conditions affecting puberty [1]. Here, we review basic knowledge about other aspects of hypothalamic development focusing on how cell types are specified and axonal connections are established. The potential clinical impact of the perturbations of these pathways is illustrated using the regulation of energy balance as a model.

PATTERNING OF THE HYPOTHALAMUS BY EXTRINSIC SIGNALS

Axial signals provided by the mesendoderm underlying the rostral neural plate are required to divide the primordial single eye field into two eyes [2]. Failure of this process causes holoprosencephaly, the most frequent brain malformation [3]. Because these axial signals are also required to induce development of the hypothalamus between the two eyes, it is not surprising that it is either missing or lacking in structures in holoprosencephalic brains. In fact, endocrine deficiencies, caused by hypothalamic and/or pituitary dysfunction, can be the only clinical problem in milder forms of holoprosencephaly. Currently, mutations in eight genes have been shown to cause holoprosencephaly in humans [4]. Three of these genes (*SHH*, *PTC1*, *GLI2*) encode members of the Sonic Hedgehog signaling pathway, whereas two others have the potential of interacting with this pathway (*SIX3*, *ZIC2*). The other genes (*TDGF1*, *FAST1*, *TGIF*) appear to interact with the Nodal/TGF- β signaling

pathway. Consistent with the pathophysiology of holoprosencephaly, SHH and Nodal are axial signals that are required for hypothalamus induction (reviewed in [2]). Interestingly, these signals also appear to function for subsequent regionalization of the hypothalamus. Although the severe midline defect observed in *Shh*- and Nodal-mutant mice precluded investigation of such a role, recent studies in fish suggest that hedgehog and Nodal signaling pattern the prospective hypothalamus into distinct domains [5] (reviewed in [2]). Experiments performed in fish also indicate that inhibition of *Wnt* signaling in the neural plate is required, likewise, for the specification of the hypothalamus anlage and also for its regionalization [6]. The identification of signals that regionalize the hypothalamus represents a critical step towards the elucidation of mechanisms underlying its organization into a set of small nuclei.

Another source of organizing signals for the hypothalamus is the anlage of the anterior pituitary. Coculture experiments have shown that the development of ACTH/MSH cells of the prospective arcuate nucleus (ARC), located in the ventromedial hypothalamus, is enhanced by a signal provided by the Rathke's pouch [7]. Also, Hermes et al. [8] have characterized a *Hesx1* regulatory element that directs the expression of a reporter transgene in the ventral hypothalamus of mice, in a region that lies in direct contact with Rathke's pouch [8]. In tissue recombination experiments, the pouch can induce expression of the transgene in the neurectoderm isolated from other sites of the developing forebrain, suggesting that the *Hesx1* element responds to a signal emanating from the pouch. It is not yet clear whether the signal produced by the pouch that enhance the development of ACTH/MSH cells is the same as that required for the transgene expression in the ventral hypothalamus. Based on these observations, a prediction can be made that disruption of the development of the pouch might affect the development of the ventral hypothalamus.

TRANSCRIPTIONAL CONTROL OF CELL-TYPE SPECIFICATION IN THE HYPOTHALAMUS

Differentiation of neurons typically involves cascades of transcription factors that progressively define their phenotypes. Such cascades have been characterized in cells that populate hypothalamic nuclei.

Paraventricular and Supraoptic Nuclei

The homeobox-containing transcription factor OTP and the heterodimeric complex formed by the bHLH-PAS transcription factors SIM1 and ARNT2 are required for the development of (1) virtually all neurons of the paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei, including those identifiable by the production of thyrotropin-releasing hormone (TRH), corticotropin-releasing hormone (CRH), oxytocin (OT), and arginine vasopressin (AVP); (2) somatostatin (SS) parvocellular neurons of the anterior periventricular nucleus, which is contiguous to the PVN; and (3) other populations of hypothalamic TRH neurons found in the lateral areas and preoptic region [9,10,11,12,13,14]. SIM1:ARNT2 and OTP function along parallel pathways to control multiple aspects of the development of these cell types, including the proliferation of their progenitors, differentiation, and migration [9,10,11,12,13,14]; Caqueret et al., unpubl. data].

SIM1:ARNT2 and OTP act upstream to maintain the expression of *Brn2*, a POU domain transcription factor, and *Sim2*, a close homolog of *Sim1*, which, in turn, control the differentiation of distinct populations of hypothalamic neurons (fig. 2). *Brn2* is required for the differentiation of CRH, OT, and AVP neurons of the PVN/SON [15, 16]. The fact that *Brn2* regulates the activity of the *Crh* promoter in vitro suggests that it acts at the final stage of differentiation [15]. In contrast, these PVN populations of OT-, AVP-, and CRH-expressing cells are not affected in *Sim2*^{-/-} embryos but TRH cells as well as the SS cells of the anterior periventricular nucleus are decreased by 43 and 83%, respectively, in these embryos [17]. The interplay between *Sim1* and *Sim2* is complex. *Sim1* acts upstream to maintain *Sim2* expression, but it can also compensate, albeit ineffectively, for loss of *Sim2*. It is unclear whether TRH and SS cells that require *Sim2* for their development and those that do not require *Sim2* have different properties or function.

Brn2 and *Sim2* are thus required for the differentiation of distinct cell types. The domain of *Brn2* expression is located anteriorly compared to that of *Sim2*, correlating with the spatial distribution of the cell types in which they function [17]. These observations provide novel insight into the emergence of the neuronal topography of the anterior hypothalamus.

Arcuate Nucleus

The ARC is composed of distinct cell types whose identity and spatial distribution have not yet been fully resolved [18]. Early on during development, signals produced by the axial mesendoderm induce the expression of the homeobox-containing transcription factor NKX2.1 in the overlying presumptive hypothalamus [19,20,21]. In turn, *Nkx2.1* functions to specify the anlage of the ventral hypothalamus that will give rise to arcuate and the ventromedial nuclei [19, 22]. A set of homeobox-containing transcription factors has been shown to function downstream to specify some of the cell types populating the ARC (fig. 3). For instance, *Gsh1* is required for *Ghrh* (growth-hormone-releasing hormone) expression in the ARC, whereas in vitro studies indicate that it can regulate *Ghrh* expression directly by interacting with its promoter [23]. *Hmx2* and *Hmx3* together are also required for *Ghrh* expression, at least in part, by maintaining *Gsh1* expression [24]. *Otp* affects the development of another cell type in the ARC identifiable by the production of SS [13, 14]. As mentioned above, *Otp* also affects *Ss* expression in other regions of the diencephalon, including the anterior periventricular nucleus and zona incerta. It is likely that *Gsh1*, *Hmx2/Hmx3*, and *Otp* not only function to regulate the expression of *Ghrh* and *Ss*, but also have a more global impact on the differentiation of the cells in which they are expressed.

Ventromedial Nucleus

Steroidogenic factor 1 (SF1), an orphan member of the nuclear receptor family, is required for the development of several endocrine systems. *Sf1*-homozygous mice lack gonads and adrenals and have impaired function of pituitary gonadotropes [25, 26]. The only site of *Sf1* expression in the brain is the ventromedial nucleus (VMN). The VMN of *Sf1*^{-/-}embryos, but not of heterozygotes, shows a complex phenotype [25,27,28,29,30,31]. VMN-mutant neurons are generated during development in appropriate number but their spatial distribution is altered with more neurons located medially and dorsally [30, 31]. The fact that the axonal projections originating from the VMN are absent in these mutants suggest that *Sf1* not only affects migration of neurons but also their differentiation.

PHYSIOLOGICAL RELEVANCE OF TRANSCRIPTIONAL REGULATORS OF HYPOTHALAMUS DEVELOPMENT

Loss of all known regulators of PVN/SON development - *Sim1*, *Arnt2*, *Otp*, *Brn2* and *Sim2* - in mice result in perinatal lethality. The severe PVN/SON defects found in mutants, such as *Sim1* or *Otp*, might underlie their lethality. In contrast, *Sim1*^{+/-} mice survive and develop early onset obesity, with increased linear growth, hyperinsulinemia, and hyperleptinemia. These mice are hyperphagic, even before they show increased weight gain [32, 33]. A balanced translocation interrupting *SIM1* was found in a child with a similar phenotype [34]. Like *Sim1*^{+/-} mice, this child had early onset obesity, increased linear growth, and a voracious appetite, suggestive of hyperphagia. Mouse models suggest that *SIM1* haploinsufficiency is responsible for the obesity in this child. The description of morbid obesity in children with chromosomal deletions in the 6q16 region, which contains *SIM1*, further strengthens this conclusion [35,36,37]. Interestingly, a genome-wide search for childhood obesity traits has shown significant linkage on chromosome 6q22-q23, near the *SIM1* locus [38]. The mechanisms underlying the hyperphagia associated with *Sim1* haploinsufficiency are still under investigation. One possibility is that dysfunction of the PVN causes this hyperphagia (fig. 1). This dysfunction could be of developmental origin. Indeed, the PVN of *Sim1*^{+/-} mice is hypocellular, containing 24% fewer cells [32]. However, since *Sim1* and its dimerizing partner *Arnt2* are expressed continuously in the postnatal PVN, the possibility that *Sim1* controls food intake physiologically is not excluded.

Brn2 is also expressed in the postnatal PVN/SON. The regulation of *Crh* expression by *Brn2* in cultured cells and the fact that *Avp* and *Ot* mRNA levels are reduced in *Brn2*-heterozygous mice raise the possibility that *Brn2* participates in physiological processes by controlling the expression of these effectors dynamically [15, 16]. However, overexpression of *Brn2* in the PVN using adenoviral vectors does not affect expression levels of *Avp* and *Crh* [39]. Also, the expression of *Brn2* is not changed in a stress model associated with increased production of CRH [40]. Nevertheless, the possibility that *Brn2* regulates *Crh* expression in the postnatal PVN/SON in response to specific stimuli needs further exploration. For instance, it has been shown that *Brn2* overexpression is not sufficient per se to induce *CRH*

expression but is required for retinoic-acid-induced *CRH* expression in a neuroblastoma cell line [41].

Sf1^{-/-} mice can be rescued from adrenal insufficiency at birth by corticosterone replacement or adrenal transplantation [29]. These rescued mice show increased weight gain by 8 weeks of age and eventually weighed almost twice as much as wild-type controls. *Sf1*^{-/-} mice are not hyperphagic but show decreased locomotor activity. This model will be useful for the dissection of the role of VMN in the regulation of energy balance.

ESTABLISHMENT OF CIRCUITRIES

During development, attractive and repulsive cues guide axons towards their targets. Very little, however, is known about the molecules that guide hypothalamic axons. Recent studies have shed some light on how one set of axons, those originating from GnRH neurons, reach their target. GnRH neurons originate from the olfactory epithelium, migrate following olfactory/vomeronasal axons and settle in a continuum from the olfactory bulbs to the hypothalamus. Specification and migration of GnRH neurons has been reviewed elsewhere and will not be further discussed here [1]. The majority of GnRH neurons projects to the median eminence (ME). Explant and transplantation studies indicate that the ME produces a diffusible attractive signal for GnRH axons [42]. A prototypical guidance molecule is netrin-1, a secreted protein that attracts axons by interacting with its receptor DCC. Netrin-1 is produced in medial areas flanking the third ventricle in which GnRH axons progress as well as in the prospective ME, whereas GnRH neurons express DCC [43]. Loss of netrin-1 or DCC reduces dramatically the number of GnRH axons that reach the ME, suggesting that netrin-1 is a major cue for the guidance of these axons towards their target [43]. In contrast, CRH and AVP axons grow normally into the ME and posterior pituitary, respectively, of these mutants. Previous studies have established that dopaminergic, GHRH, and SS neurons restrict their projections to certain subregions of the ME (reviewed in [44]). Altogether, these observations suggest the existence of a complex network of cues produced by distinct domains of the prospective ME that each attracts different sets of hypothalamic axons.

Whereas axon projections to the ME and infundibulum are established by the time of birth in rodents, recent studies indicate that this is not the case for all hypothalamic projections. Bouret et al. [45] have found that ARC projections to the PVN, lateral hypothalamic area, and the dorsal medial nucleus develop during the first 2 weeks of postnatal life in mice. These ARC projections are critical mediators of the action of leptin on food intake. The fact that these projections are not yet completely developed at this stage of life might explain the insensitivity of the neonatal hypothalamus to the massive surge of leptin levels observed during the first week of life in rodents [46]. Interestingly, Bouret et al. [47] found that leptin actually acts as a trophic signal that stimulates ARC axon outgrowth. More specifically, the density of ARC projections to the PVN, lateral hypothalamic area, and dorsal medial nucleus is decreased in leptin-deficient mice during the first 2 weeks of life, before weaning, and remains so in adulthood. Administration of leptin during the first 2 weeks, but not later in life, increases the number of ARC projections in leptin-deficient mice, which results in decreased food intake in the long term. Obesity secondary to leptin deficiency thus appears to involve a developmental component.

Interspecies comparisons of various features of neural development indicate that the brain of newborn mice is immature, corresponding to that of human fetuses at the beginning of the third trimester of pregnancy [48,49,50]. From a clinical point of view, factors that modulate levels of leptin in human fetuses or premature babies would thus be predicted to affect the development of ARC projections, with the potential of having long-lasting effect on energy balance. Alternatively, the development of these ARC projections after birth could represent a conserved feature of mammalian development, also present in humans, that defines a phase during which food intake would not be subjected to the same regulatory circuitries than later on, possibly reflecting the need to maximize food intake in the immediate postnatal period.

Projections of parvocellular OT neurons of the PVN to the dorsal vagal complex, a group of brainstem nuclei that comprises the dorsal motor nucleus of the vagus and the nucleus of the solitary tract, also increases during the first 2 weeks of postnatal life in rodents [51]. These axons have also been shown to mediate in part the effect of leptin on food intake [52]. An interesting possibility will be that the

development of these projections is also stimulated by leptin during the first weeks of life. A functional correlate of the immaturity of this circuit has been proposed by Rinaman [51]. There is good evidence that OT-containing projections from the PVN to the dorsal vagal complex are required for the anorexic response that accompanies dehydration [53]. Interestingly, this response does not emerge until after the first 2 weeks of postnatal development, possibly because of the lack of OT projections [51].

IMPRINTING AND HYPOTHALAMIC DEVELOPMENT

Analysis of chimeric embryos and mice containing normal and uniparental cells have shown that parthenogenetic (complete maternal disomy) and androgenetic (complete paternal disomy) cells contribute to complementary regions of the brain [54, 55]. Although at 10 days of embryonic development, androgenetic cells appear widely distributed in the brain of chimeras, they subsequently become restricted to the hypothalamus. Conversely, parthogenetic cells are progressively excluded from the hypothalamus during development of chimeric brains, while they are found abundantly in the cortex. The stage during which these complementary distributions of uniparental cells are established coincides with the proliferation and differentiation of hypothalamic neural cells. This observation suggests that paternal expression of some genes is required for development of the hypothalamus.

Interestingly, at least two genes with monoallelic expression from the paternal allele, *Peg3* and *Ndn*, might be required for the development of the hypothalamus. *Peg3* is a critical regulator of several apoptotic pathways. Loss of the paternal copy of *Peg3* in mice causes a decrease of activation of the sympathetic nervous system, presumably via the hypothalamus, that is associated with lower core body temperature and metabolic activity as well as with an increase of white and brown adipose tissue [56]. *Peg3* is expressed at high levels during the development of several regions of the hypothalamus that regulate energy balance. It is thus tempting to speculate that the loss of *Peg3* disrupts normal hypothalamic development through its role in apoptotic pathways, leading to a cascade of energy balance dysfunctions.

NDN (encoding necdin) and *MAGEL2* are two of four protein-coding genes lost in individuals with Prader-Willi syndrome (PWS), a sporadic chromosome deletion disorder characterized by hypothalamic dysfunction with hyperphagia and severe obesity [57]. Necdin and *MAGEL2*, which are part of a multiprotein family related by a MAGE homology domain, are expressed in hypothalamic areas, such as the ARC and PVN, that are involved in the regulation of energy balance [58,] [59]. Lee et al. [60] have recently found that necdin physically interacts with components of the centrosomes, which play a role in organizing microtubules during axonal outgrowth. As it might be expected from this observation, axons from necdin-null neurons elongate more slowly and are less bundled when grown in culture and several axonal tracts are reduced or misrouted in the brain of necdin-null embryos [60]. These interesting observations raise the possibility that the hypothalamic dysfunction of PWS patients is caused by abnormal axonal connections. Hypothalamic axonal defects were not described in these mice, possibly because these projections do not form easily detectable bundles. Their visualization requires specific labeling, the use of which has not yet been reported. Another possibility is that *MAGEL2* plays a similar role during development and that disruption of hypothalamus connections are observed only when both necdin and *MAGEL2* expression is lost, explaining the lack of single mutations in PWS. Of note, necdin physically interacts with *BBS4*, one of the several genes mutated in Bardet-Biedl syndrome, raising the possibility that similar axonal defects exist in this condition also characterized by early onset obesity [60]. Finally, a decrease of OT and GnRH cells has been observed in hypothalamus of *Necdin*-mutant mice, also possibly contributing to PWS phenotype [61].

Although loss of these genes individually does not have a dramatic effect on hypothalamic development, it is possible that the combined loss of several genes that are only expressed from the paternal allele, as found in parthenogenetic cells, could have more severe consequences, explaining the absence of these cells in chimeric hypothalamus late during development. Why then are imprinted genes required for hypothalamus development? One theory interprets imprinting as a tug-of-war between the interests of each parent through their genome [62]. Paternally derived alleles would enhance the offspring's own fitness, favoring greater maternal investment whether or not this investment occurs before or after weaning. In the

context of this theory, building a functional hypothalamus would allow optimal growth and survival of offspring, which is to the advantage of the father.

CONCLUSION

The study of hypothalamus development can foster insight into critical physiological processes and their disorders, as it has been shown for other regulatory centers of homeostasis such as the pituitary and pancreas [63, 64]. First, pathways that control differentiation, especially at the later stages, can be maintained in mature cells for the regulation of physiological effectors, like hormones or neurotransmitters, representing critical targets for therapies. Second, subtle developmental defects affecting the number of hypothalamic cells, their differentiation, or their axonal projections have the potential of causing metabolic and physiological disorders which can be isolated and expressed relatively late in life. As discussed in this review, instances of developmental defects of the hypothalamus affecting energy balance have been reported. We predict that disruption of hypothalamic development can also cause other phenotypes, such as high blood pressure or abnormal responses to stress, that are not as readily detectable as dysregulation of energy balance in animal models. Given that small groups of hypothalamic neurons like the PNV or ARC can participate in the regulation of multiple homeostatic processes, we would also predict that disruption of a single developmental pathway could generate several phenotypes that may coexist in an animal model or in a patient.

REFERENCES

1. Wray S: Development of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Front Neuroendocrinol* 2002;23:292-316.
2. Wilson SW, Houart C: Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* 2004;6:167-181.
3. Roessler E, Muenke M: How a hedgehog might see holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 2003;12:R15-R25.
4. Ming JE, Muenke M: Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet* 2002;71:1017-1032.
5. Ohkubo Y, Chiang C, Rubenstein JL: Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4 SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* 2002;111:1-17.
6. Kapsimali M, Caneparo L, Houart C, Wilson SW: Inhibition of Wnt/Axin/beta-catenin pathway activity promotes ventral CNS midline tissue to adopt hypothalamic rather than floorplate identity. *Development* 2004;131:5923-5933.
7. Daikoku S, Chikamori M, Adachi T, Okamura Y, Nishiyama T, Tsuruo Y: Ontogenesis of hypothalamic immunoreactive ACTH cells in vivo and in vitro: role of Rathke's pouch. *Dev Biol* 1983;97:81-88.
8. Hermes E, Williams-Simons L, Mahon KA: A novel inducible element activated by contact with Rathke's pouch is present in the regulatory region of the Rpx/Hesx1 homeobox gene. *Dev Biol* 2003;260:68-78.
9. Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan CM: Development of neuroendocrine lineages requires the BHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev* 1998;12:3264-3275.
10. Michaud JL, DeRossi C, May NR, Holdener BC, Fan CM: ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech Dev* 2000;90:253-261.
11. Hosoya T, Oda Y, Takahashi S, Morita M, Kawauchi S, Ema M, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y: Defective development of secretory neurones in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes Cells* 2001;6:361-374.
12. Keith B, Adelman DM, Simon MC: Targeted mutation of the murine arylhydrocarbon receptor nuclear translocator 2 (Arnt2) gene reveals partial redundancy with Arnt. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6692-6697.

13. Acampora D, Postiglione MP, Avantaggiato V, Di Bonito M, Vaccarino FM: Michaud J, Simeone A: Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev* 1999;13:2787-2800.
14. Wang W, Lufkin T: The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol* 2000;227:432-449.
15. Schonemann MD, Ryan AK, McEvelly RJ, O'Connell CA: Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor BRN2. *Genes Dev* 1995;9:3122-3135.
16. Nakai S, Kawano H, Yodate T, Nishi M, Kuno J, Nagata A, Jishage K, Hamada H, Fujii H, Kawamura K: The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev* 1995;9:3109-3121.
17. Goshu E, Jin H, Lovejoy J, Marion JF, Michaud JL, Fan CM: Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol Endocrinol* 2004;18:1251-1262.
18. Dickson SL, Luckman SM: Induction of c-fos messenger ribonucleic acid in neuropeptide Y and growth hormone (GH)-releasing factor neurons in the rat arcuate nucleus following systemic injection of the GH secretagogue GH-releasing peptide-6. *Endocrinology* 1997;138:771-777.
19. Kimura S, Hara Y, Pineau T, Fernandez-Salguero P, Fox CH, Ward JM, Gonzalez FJ: The T/Ebp null mouse: thyroid-specific enhancer-binding protein is essential for the organogenesis of the thyroid lung ventral forebrain and pituitary. *Genes Dev* 1996;10:60-69.
20. Ericson J, Muhr J, Placzek M, Lints T, Jessell TM, Edlund T: Sonic hedgehog induces the differentiation of ventral forebrain neurons: a common signal for ventral patterning within the neural tube. *Cell* 1995;81:747-756.
21. Pabst O, Herbrand H, Takuma N, Arnold HH: NKX2 gene expression in neuroectoderm but not in mesodermally derived structures depends on Sonic Hedgehog in mouse embryos. *Dev Genes Evol* 2000;210:47-50.
22. Marin O, Baker J, Puelles L, Rubenstein JL: Patterning of the basal telencephalon and hypothalamus is essential for guidance of cortical projections. *Development* 2002;129:761-773.
23. Li H, Zeitler PS, Valerius MT, Small K, Potter SS: Gsh-1 an orphan Hox gene is required for normal pituitary development. *EMBO J* 1996;15:714-724.

24. Wang W, Grimmer JF, Van De Water TR, Lufkin T: Hmx2 and Hmx3 homeobox genes direct development of the murine inner ear and hypothalamus and can be functionally replaced by *Drosophila* Hmx. *Dev Cell* 2004;7:439-453.
25. Shinoda K, Lei H, Yoshii H, Nomura M, Nagano M, Shiba H, Sasaki H, Osawa Y, Ninomiya Y, Niwa O: Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. *Dev Dyn* 1995;204:22-29.
26. Ingraham HA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Shen WH, Nachtigal MW, Abbud R, Nilson JH, Parker KL: The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. *Genes Dev* 1994;8:2302-2312.
27. Dellovade TL, Young M, Ross EP, Henderson R, Caron K, Parker K, Tobet SA: Disruption of the gene encoding SF-1 alters the distribution of hypothalamic neuronal phenotypes. *J Comp Neurol* 2000;423:579-589.
28. Ikeda Y, Luo X, Abbud R, Nilson JH, Parker KL: The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Mol Endocrinol* 1995;9:478-486.
29. Majdic G, Young M, Gomez-Sanchez E, Anderson P, Szczepaniak LS, Dobbins RL, McGarry JD, Parker KL: Knockout mice lacking steroidogenic factor 1 are a novel genetic model of hypothalamic obesity. *Endocrinology* 2002;143:607-614.
30. Tran PV, Lee MB, Marin O, Xu B, Jones KR, Reichardt LF, Rubenstein JR, Ingraham HA: Requirement of the orphan nuclear receptor SF-1 in terminal differentiation of ventromedial hypothalamic neurons. *Mol Cell Neurosci* 2003;22:441-453.
31. Davis AM, Seney ML, Stallings NR, Zhao L, Parker KL, Tobet SA: Loss of steroidogenic factor 1 alters cellular topography in the mouse ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Neurobiol* 2004;60:424-436.
32. Michaud JL, Boucher F, Melnyk A, Gauthier F, Goshu E, Levy E, Mitchell GA, Himms-Hagen J, Fan CM: *Sim1* haploinsufficiency causes hyperphagia obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* 2001;10:1465-1473.
33. Holder JL Jr, Zhang L, Kublaoui BM, DiLeone RJ, Oz OK, Bair CH, Lee YH, Zinn AR: *Sim1* gene dosage modulates the homeostatic feeding response to increased dietary fat in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E105-E113.
34. Holder JL Jr, Butte NF, Zinn AR: Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the *SIM1* gene. *Hum Mol Genet* 2000;9:101-108.

35. Villa A, Urioste M, Bofarull JM, Martinez-Frias ML: De novo interstitial deletion Q16.2q21 on chromosome 6. *Am J Med Genet* 1995;55:379-383.
36. Turleau C, Demay G, Cabanis MO, Lenoir G, de Grouchy J: 6q1 monosomy: a distinctive syndrome. *Clin Genet* 1988;34:38-42.
37. Gilhuis HJ, van Ravenswaaij CM, Hamel BJ, Gabreels FJ: Interstitial 6q deletion with a Prader-Willi-like phenotype: a new case and review of the literature. *Eur J Paediatr Neurol* 2000;4:39-43.
38. Meyre D, Lecoecur C, Delplanque J, Francke S, Vatin V, Durand E, Weill J, Dina C, Froguel P: A genome-wide scan for childhood obesity-associated traits in French families shows significant linkage on chromosome 6q22.31-Q23.2. *Diabetes* 2004;53:803-811.
39. Wong LF, Murphy D: Adenoviral-mediated over-expression of Brn2 in the rat paraventricular nucleus: no effect on vasopressin or corticotrophin releasing factor RNA levels. *Mol Cell Endocrinol* 2003;200:165-175.
40. Kovacs KJ, Sawchenko PE: Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 1996;16:262-273.
41. Ramkumar T, Adler SA: Requirement for the POU transcription factor Brn-2 in corticotropin-releasing hormone expression in a neuronal cell line. *Mol Endocrinol* 1999;13:1237-1248.
42. Rogers MC, Silverman AJ, Gibson MJ: Gonadotropin-releasing hormone axons target the median eminence: in vitro evidence for diffusible chemoattractive signals from the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 1997;138:3956-3966.
43. Deiner MS, Sretavan DW: Altered midline axon pathways and ectopic neurons in the developing hypothalamus of netrin-1- and DCC-deficient mice. *J Neurosci* 1999;19:9900-9912.
44. Markakis EA: Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* 2002;23:257-291.
45. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB: Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci* 2004;24:2797-2805.
46. Proulx K, Richard D, Walker CD: Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology* 2002;143:4683-4692.

47. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB: Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 2004;304:108-110.
48. Gluckman PD: Maturation of hypothalamic-pituitary function in the ovine fetus and neonate. *Ciba Found Symp* 1981;86:5-42.
49. Clancy B, Darlington RB, Finlay BL: Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 2001;105:7-17.
50. Avishai-Eliner S, Brunson KL, Sandman CA, Baram TZ: Stressed-out or in (utero)? *Trends Neurosci* 2002;25:518-524.
51. Rinaman L: Postnatal development of hypothalamic inputs to the dorsal vagal complex in rats. *Physiol Behav* 2003;79:65-70.
52. Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG: Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R87-R96.
53. Rinaman L, Vollmer RR, Karam J, Phillips D, Li X, Amico JA: Dehydration anorexia is attenuated in oxytocin-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:R1791-R1799.
54. Allen ND, Logan K, Lally G, Drage DJ, Norris ML, Keverne EB: Distribution of parthenogenetic cells in the mouse brain and their influence on brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10782-10786.
55. Keverne EB, Fundele R, Narasimha M, Barton SC, Surani MA: Genomic imprinting and the differential roles of parental genomes in brain development. *Brain Res Dev Brain Res* 1996;92:91-100.
56. Curley JP, Pinnock SB, Dickson SL, Thresher R, Miyoshi N, Surani MA, Keverne EB: Increased body fat in mice with a targeted mutation of the paternally expressed imprinted gene *Peg3*. *FASEB J* 2005;19:1302-1304.
57. Goldstone AP: Prader-Willi syndrome: advances in genetic pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol Metab* 2004;15:12-20.
58. Andrieu D, Watrin F, Niinobe M, Yoshikawa K, Muscatelli F, Fernandez PA: Expression of the Prader-Willi gene *necdin* during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and *P75NTR* expression. *Gene Expr Patterns* 2003;3:761-765.
59. Lee S, Walker CL, Wevrick R: Prader-Willi syndrome transcripts are expressed in phenotypically significant regions of the developing mouse brain. *Gene Expr Patterns* 2003;3:599-609.

60. Lee S, Walker CL, Karten B, Kuny SL, Tennese AA, O'Neill MA, Wevrick R: Essential role for the Prader-Willi syndrome protein *necdin* in axonal outgrowth. *Hum Mol Genet* 2005;14:627-637.
61. Jay P, Rougeulle C, Massacrier A, Moncla A, Mattei MG, Malzac P, Roeckel N, Taviaux S, Lefranc JL, Cau P, Berta P, Lalande M, Muscatelli F: The human *necdin* gene *NDN* is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet* 1997;17:357-361.
62. Haig D: Genomic imprinting and kinship: how good is the evidence? *Annu Rev Genet* 2004;38:553-585.
63. Pulichino AM, Vallette-Kasic S, Couture C, Gauthier Y, Brue T, David M, Malpuech G, Deal C, Van Vliet G, De Vroede M, Riepe FG, Partsch CJ, Sippell WG, Berberoglu M, Atasay B, Drouin J: Human and mouse *TPIT* gene mutations cause early onset pituitary ACTH deficiency. *Genes Dev* 2003;17:711-716.
64. Habener JF, Kemp DM, Thomas MK: Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology* 2005;146:1025-1034.
65. Elmquist JK, Elias CF, Saper CB: From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron* 1999;22:221-232.
66. Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS, Bjorbaek C, Flier JS, Saper CB, Elmquist JK: Leptin differentially regulated NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron* 1999;23:775-786.
67. Cowley MA, Pronchuk N, Fan W, Dinulescu DM, Colmers WF, Cone RD: Integration of NPY/AGRP and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. *Neuron* 1999;24:155-163.
68. Billington CJ, Briggs JE, Grace M, Levine AS: Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 1991;260:R321-R327.
69. Graham M, Shutter JR, Sarmiento V, Sarosi I, Stark KL: Over-expression of *Agrt* leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* 1997;17:273-274.
70. Ollmann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsin GS: Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by Agouti-related protein. *Science* 1997;278:135-138.
71. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD: Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997;385:165-168.

72 . Kristensen P, Judge ME, Thim L, Ribel U, Christjansen KN, Wulff BS, Clausen JT, Jensen PB, Madsen OD, Vrang N, Larsen PJ, Hastrup S: Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 1998;393:72-76.

LEGENDS

Figure 1. **Structural and functional relationship between hypothalamic nuclei.**

The paraventricular (PVN) and supraoptic nuclei contain magnocellular neurons (in red), producing either OT or AVP, that project to the posterior pituitary. The PVN also contains parvocellular neurons (in blue) that project to the medial eminence (ME) where they secrete a number of factors, including TRH and CRH, that are taken up by the small vasculature of the ME and transported to the anterior pituitary. These factors modulate secretion of anterior pituitary hormones. A second population of parvocellular neurons project to preganglionic neurons of the autonomic nervous system. The ARC, which is located just dorsal to the ME, projects axons to the PVN, the dorsal median nucleus (DMN) and the lateral hypothalamic area (LHA), whereas the ventromedial nucleus (VMN) projects to several intra- and extrahypothalamic sites. The adiposity signal leptin reduces food intake at least in part by acting in the ARC. ARC neurons expressing *Npy/Agrp* and *Cart/Msh* project to the PVN [65, 66]. Electrophysiological studies have shown that individual neurons within the PVN are capable of detection and integration of the NPY and MSH signals [67]. Leptin decreases the expression of *Npy* and *Agrp* transcripts in medial cells and increases the expression of *Cart* and *Msh* transcripts in lateral cells of the ARC [65]. Genetic and physiological studies indicate that both NPY and AgRP increase food intake and decrease energy expenditure [68,69,70,] whereas CART and MSH, which is derived from POMC, have the opposite effects [71, 72]. These changes of expression are expected to generate a similar physiological response as that of leptin - decrease of food intake and increase of energy expenditure.

Figure 2. **Transcriptional regulation of anterior hypothalamic development.**

SIM1:ARNT2 and OTP function in parallel to control the development of virtually all neurons of the PVN/SON, of TRH-producing neurons of the preoptic region and of SS-producing neurons of the anterior periventricular nucleus, which is located ventrally contiguous to the PVN. These two complexes are required to maintain *Brn2* expression, which, in turn, directs the development of CRH-, OT- and AVP-producing neurons of the PVN and SON. SIM1:ARNT2 and OTP also act upstream of SIM2 for the development of subsets of TRH cells located in the PVN and preoptic region and of SS cells found in the anterior periventricular nucleus.

Figure 3. **Transcriptional regulation of arcuate nucleus development.** *Nkx2.1* functions early during development to specify the ventral anlage of the caudal hypothalamus, which includes the ARC. *Hmx2* and *Hmx3* together act upstream of *Gsh1* for the expression of *GhRH*, whereas *Otp* is required for *Ss* expression in the ARC.

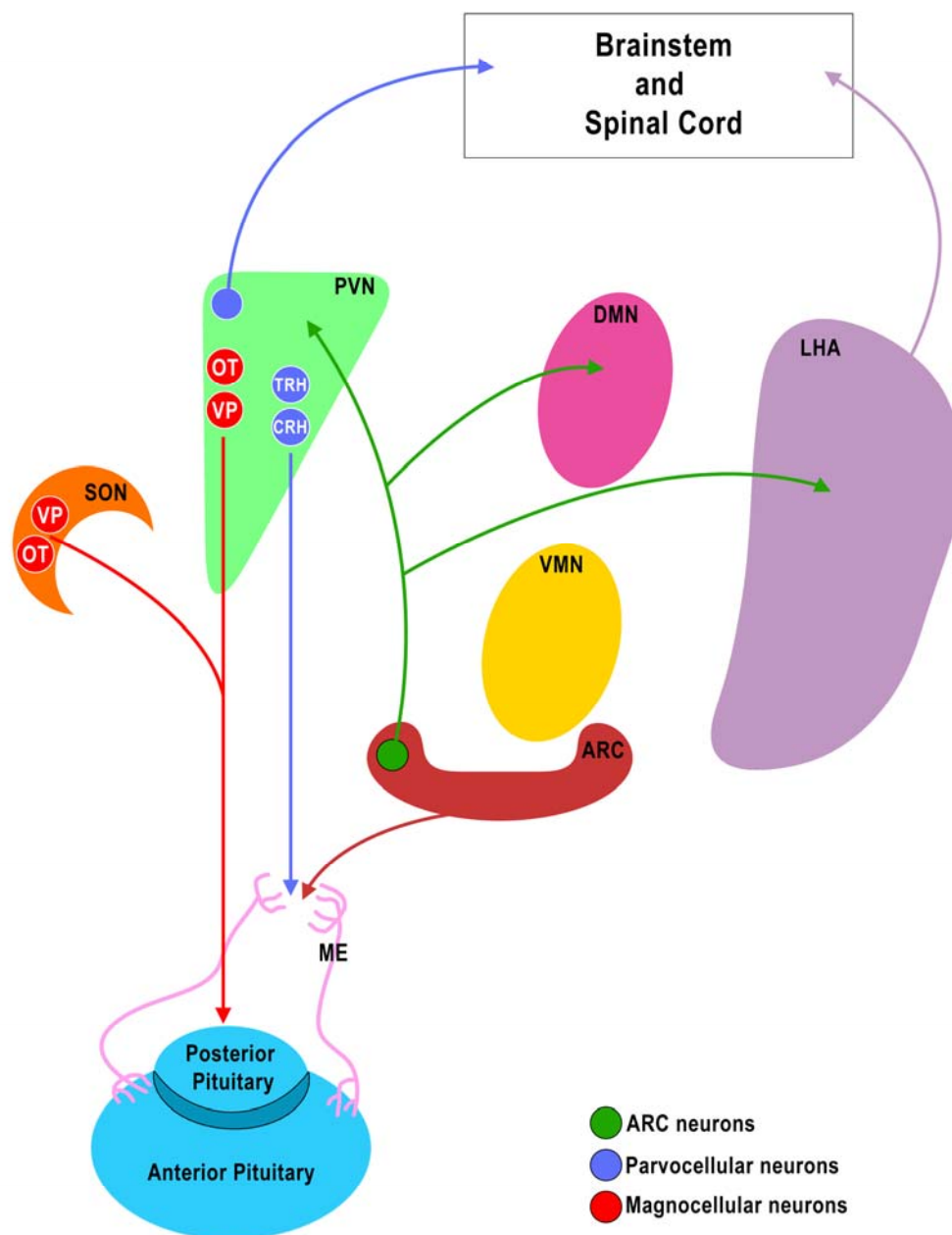


Figure 1

Figure 1. Structural and functional relationship between hypothalamic nuclei.

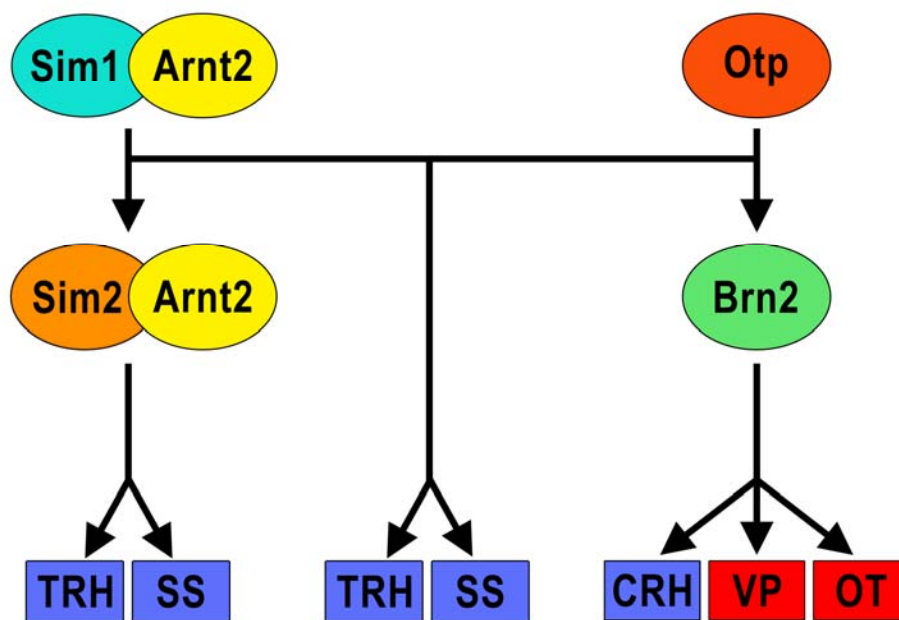


Figure 2

Figure 2. Transcriptional regulation of anterior hypothalamic development.

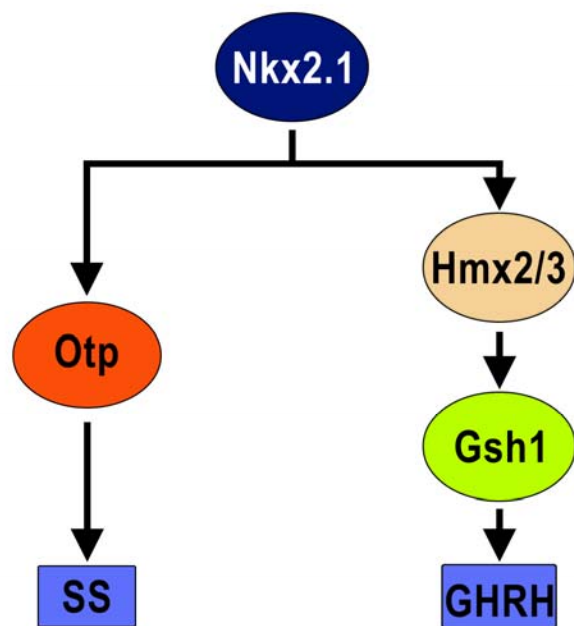


Figure 3

Figure 3. Transcriptional regulation of arcuate nucleus development.