



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE
ET DE LA SANTÉ**

UPR3212



THÈSE

Présentée par :

Marion MILLET

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Spécialité : Neurosciences

Mécanismes moléculaires du transport de la leptine par les tanocytes hypothalamiques

Soutenue le 7 Septembre 2020, devant le jury ci-dessous :

DIRECTEURS DE THÈSE :

Dr GASMAN Stéphane Directeur de recherche INSERM, Université de Strasbourg

Dr ORY Stéphane Chargé de recherche CNRS, Université de Strasbourg

PRÉSIDENTE :

Dr SIMONNEAUX Valérie Directeur de recherche CNRS, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Dr ROUILLÉ Yves Directeur de recherche CNRS, Université de Lille

Dr SAUVONNET Nathalie Directeur de recherche, Institut Pasteur de Paris

EXAMINATEUR :

Dr LANGLET FANNY Maître-Assistant, Université de Lausanne

« Rien n'a de sens en biologie, si ce n'est à la lumière de l'évolution »

Theodosius Dobzhansky (1900 – 1975)

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord exprimer mes remerciements à l'ensemble des membres du jury qui ont accepté de juger mon travail de thèse. En tant que scientifique, c'est un plaisir d'avoir un jury aussi éclectique, et la discussion est/s'annonce déjà passionnante et enrichissante.

Je tiens à remercier le Dr Stéphane Gasman d'avoir accepté une Ch'ti dans l'équipe pour mener à bien ce tout nouveau projet tanocytes. J'ai apprécié en tant que directeur de thèse ta disponibilité et l'accompagnement scientifique tout au long de ces 4 ans de travail au laboratoire mais aussi l'environnement de travail dans lequel l'équipe évolue, propice au développement d'un futur chercheur je pense. Je retiendrai aussi les différents congrès auxquels j'ai eu l'opportunité de participer et les discussions diverses que l'on a pu avoir allant de sujets sérieux comme l'avenir de la recherche jusqu'à nos discussions « paris sportifs du week-end ». On a pensé gagner à un moment, *mais finalement, non !*

Je veux également remercier le Dr Stéphane Ory qui m'a guidé au jour le jour à la paillasse et sans qui l'aboutissement de cette thèse ne serait pas le même. J'ai pu apprendre énormément d'un point de vue scientifique, que ce soit sur le plan technique ou sur le trafic intracellulaire qui était pour moi un petit mystère. J'ai beaucoup apprécié au quotidien ton intérêt et ton enthousiasme pour le développement de nouvelles techniques ou méthodes de recherche qui nous ont amené d'ailleurs à travailler sur les systèmes polarisés. Tu es toujours disponible pour une discussion, qu'elle soit scientifique ou personnelle, et j'ai également apprécié le partage de tes expériences post-doctorat et tes nombreux conseils.

Je veux remercier le Dr Nicolas Vitale, co-directeur de l'équipe, pour ta sympathie et nos discussions sport toujours agréables.

Je veux remercier les autres chercheurs de la Team G/V, Pétra et Sylvette pour leur disponibilité en cas de questions, leur écoute et leur gentillesse.

Je remercierai également Tam, Claudine et Sabahat pour leur sympathie.

Je tiens à remercier la team cafète, Laura, Emeline, Audrey, et Anne Marie, pour tous les midis qu'on a partagés et votre sympathie, ces moments font partis des joies de la vie au laboratoire. Et je ne les oublierai pas.

Je remercie également Michael pour ta sympathie, même si on aura partagé le même bureau que quelques temps, bon courage pour la suite de ta thèse.

Merci à mon squad d'italiennes, avec lesquelles j'ai passé ces deux dernières années. Merci pour les « petits moments café » et les « gros moments restau ». Moi la nordiste, je me suis comme sentie adoptée par le sud de l'Italie. Fabi, Rosie et Marghi, les 3 supers Nanas. Vous allez sans aucun doute me manquer mais on se donne déjà rendez-vous bientôt pour des vacances à Singapour et partout où ce sera possible.

Margh, un petit mot particulier pour toi ma coloc. Ces deux années ont filé et tu m'as littéralement accompagnée jour et nuit ! J'ai découvert avec toi les secrets de la Dolce vita...mais à Strasbourg, et c'était bien dépaysant ☺. Si je dois résumer, c'était beaucoup de plats italiens avec ma chef cuisto, dont les pizze ! Je suis contente d'avoir participé un peu à ton d'apprentissage de la langue française qui impressionne tout de monde, et finalement non, je ne t'ai pas appris que des gros mots ! Je ne vais pas exagérer en te disant que tu vas me manquer à l'autre bout de la France ou du Monde mais je sais que n'importe où notre amitié durera. ♡

Je n'oublie pas non plus mes copines de Master, Valérie (à la maison) à Lille, et Elisabeth alias Micheline à Turin. C'est nécessaire pour moi de partager avec vous les galères et les joies du labo ou de la vie en général. A vivre la même chose disons simplement qu'on se comprend. Je vous kiffe !

Enfin, je veux dédier cette thèse à ma famille et à la personne qui m'accompagne depuis si longtemps. Rien ne serait possible sans vous et votre soutien. Vous êtes ma force pour franchir les barrières et à la fois mon refuge quand tout semble difficile. Vous êtes ma richesse, ce que j'ai de plus précieux.

J'ai bien sur un mot spécial pour toi mon Nam, mon confident, mon meilleur ami, mon repère. Tu n'as jamais cessé de me pousser que ce soit avant ou pendant la thèse, et je sais que tu continueras à le faire encore après. Merci d'être toi, de me supporter chaque jour et de toujours m'encourager à faire mieux. Tu as participé pleinement à cette réussite.

SOMMAIRE

Abréviations	- 2 -
Liste des figures	- 4 -
Avant-propos	- 6 -
Introduction	- 8 -
CHAPITRE 1- 8 - Centre de régulation de l'homéostasie énergétique	- 8 -
I. L'hypothalamus	- 10 -
I.1. Généralités	- 10 -
I.2. Les noyaux hypothalamiques	- 11 -
I.3. Interface sang/cerveau hypothalamique	- 15 -
II. Les tanycytes hypothalamiques	- 20 -
II.1. Historique	- 20 -
II. 2. Caractéristiques	- 21 -
III. Régulation de la balance énergétique	- 27 -
III.1. Les hormones impliquées dans la régulation de la prise alimentaire	- 27 -
III.2. Les nutriments	- 28 -
CHAPITRE 2- 32 - La leptine, hormone de la satiété	- 32 -
I. Historique	- 34 -
II. Mode d'action de la leptine	- 35 -
II.1. Le récepteur à la leptine Ob-R	- 36 -
II.2. La signalisation Ob-Rb	- 38 -
III. Leptine et obésité	- 42 -
III.1. L'obésité	- 42 -
IV.2. Mise en place de la résistance à la leptine	- 42 -
CHAPITRE 3- 46 - Le transport intracellulaire du récepteur à la leptine	- 46 -
I. Voie d'endocytose dépendante de la clathrine	- 48 -
I.1. Composition des vésicules à clathrine	
I.2. Formation des vésicules à clathrine	- 51 -
II. Endocytose et trafic intracellulaire du récepteur à la leptine Ob-R	- 57 -
II.1. Localisation et mécanisme d'endocytose du récepteur Ob-R	- 57 -

II.2. Recyclage et dégradation du récepteur Ob-R _____	- 58 -
III. La transcytose : voie de transport dans les cellules polarisées _____	- 61 -
III.1. Rôle des jonctions serrées _____	- 62 -
III.2. L'exocytose _____	- 64 -
Résultats _____	- 68 -
PARTIE 1 MÉCANISMES DU TRANSPORT DE LA LEPTINE DANS LES TANYCYTES HYPOTHALAMIQUES _____	- 68 -
I. Internalisation de la leptine par les tanocytes <i>in vitro</i> _____	- 70 -
I.1. Caractérisation et validation des cultures primaires de tanocytes comme modèle d'étude	- 70 -
I.2. La leptine est-elle internalisée par son récepteur Ob-R ? _____	- 74 -
I.3. L'endocytose de la leptine est-elle dépendante de la clathrine ? _____	- 76 -
II. Transport intracellulaire de la leptine dans les tanocytes hypothalamiques ____	- 84 -
II.1. La leptine transite-t-elle par la voie des endosomes précoces ? _____	- 84 -
II.2. Quelle destination après les endosomes précoces ? _____	- 86 -
II.4. Les protéines SNAREs sont-elles impliquées dans la sécrétion de la leptine ? _____	- 90 -
III. Implication des voies de signalisation dans le trafic intracellulaire de la leptine-	92 -
III.1. L'internalisation de la leptine est-elle dépendante de la signalisation du récepteur ? ____	- 92 -
III.2. La signalisation du récepteur Ob-R régule-t-elle le transport de leptine ? _____	- 92 -
III.3. L'activation de la voie ERK et de la voie de l'EGFR sont-elles nécessaires pour le transport de la leptine dans les tanocytes ? _____	- 98 -
IV. Conclusion et Article _____	- 99 -
PARTIE 2 - MISE EN PLACE D'UN SYSTÈME DE CULTURE CELLULAIRE POUR L'ÉTUDE DU TRANSPORT POLARISE DE LA LEPTINE DANS LES TANYCYTES _____	- 148 -
I. Modèle de culture 3D avec gel de matrice extracellulaire _____	- 150 -
I.1. Formation des prolongements tanocytaires à travers la membrane _____	- 150 -
I.2. Les tanocytes forment-ils une barrière tanocyttaire sur la membrane basale ? _____	- 153 -
I.3. La leptine est-elle transportée par les tanocytes cultivés sur membrane ? _____	- 156 -
II. Culture des tanocytes sur puces microfluidiques _____	- 159 -
II.1. Organisation des tanocytes dans la puce _____	- 159 -
II.2. La leptine est internalisée par les prolongements tanocytaires et transite par les endosomes précoces _____	- 159 -
III. Conclusion _____	- 159 -

Discussion générale	- 162 -
I. Récepteur à la leptine Ob-R et internalisation	- 163 -
I.1 – Expression du récepteur à la leptine dans les tanocytes	- 163 -
I.2- Rôle physiologique du récepteur Ob-R dans les tanocytes	- 165 -
I.3 – Endocytose de la leptine, une seule voie impliquée ?	- 167 -
I.4 – Endocytose de la leptine, action de la dynamine ?	- 170 -
II. Signalisation de la leptine et trafic intracellulaire	- 171 -
II.1 – Implication de la voie des MAPK dans le trafic intracellulaire	- 171 -
II.2 – Quel lien entre la voie de l’EGFR et de la leptine ?	- 172 -
III. Les voies de transport intracellulaires	- 174 -
III.1- Une seule voie pour le trafic de la leptine ?	- 174 -
III.2. Quels compartiments pour la sécrétion de la leptine ?	- 176 -
II.3 – Nécessité d’un système cellulaire polarisé ?	- 180 -
Conclusion générale	- 184 -
Matériels et méthodes	- 186 -
I. Culture cellulaire	- 187 -
I.1. Protocole de culture primaire de tanocytes de rat	- 187 -
I.2. Cinétique d’internalisation de la leptine fluorescente	- 187 -
I.3. Cinétique de sécrétion de la leptine	- 189 -
I.4. Techniques de transfection et d’infection virale	- 189 -
II. Techniques biochimiques	- 191 -
II.1. Test ELISA	- 191 -
II.2. Western blot	- 191 -
III. Techniques d’immunofluorescence	- 193 -
IV. Culture cellulaire sur insert et puce microfluidique	- 194 -
IV.1. Puce microfluidique	- 194 -
IV.2. Culture sur insert et extrait de membrane basale	- 194 -
IV. Microscopie et analyse d’image	- 196 -
V.1. Microscopie	- 196 -
V.2. Traitement et analyse d’images	- 198 -
Bibliographie	- 200 -

ABREVIATIONS

3 ^{ème}	Troisième
4 ^{ème}	Quatrième
AA	Acide aminé
AgRP	Agouti-gene related peptide
ALH	Aire latérale hypothalamique
Akt	Protéine kinase B
AMPK	Kinase activée par l'AMP
BDNF	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BBS	Bardet-Biedl syndrom
BoNT	<i>Botulinum neurotoxin</i>
CART	<i>Cocaine and amphetamine regulated transcript</i>
CRH	Hormone corticotropine
DARPP32	<i>Dopamine- and cyclic AMP-regulated phosphoprotein</i>
<i>db</i>	Gène <i>diabetes</i>
DIO	<i>Diet-induced obesity</i>
DMH	Noyau dorso-median
EEA1	<i>Early endosome antigen-1</i>
EGF	Epidermal growth factor
EM	Éminence médiane
Eps15	Epsine 15
FGF	Facteur de croissance de fibroblastes
FnIII	Domaine Fibronectine III
GH	Hormone de croissance
GnRH	Gonadolibérine
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
iBot	<i>iBot induced botulin toxin</i>
ICV	Intraventriculaire
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IMC	Indice de Masse Corporelle
IR	Récepteur à l'insuline
IRS	Substrats du récepteur à l'insuline
JAK	Janus kinase
JS	Jonction serrée
KO	<i>Knockout</i>
LAMP1	<i>Lysosomal associated membrane protein 1</i>

LCR	Liquide céphalo-rachidien
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCH	<i>Melanin concentrating hormone</i>
MC-R	Récepteur à la mélanocortine
ME	Microscopie électronique
MECA-32	<i>Mouse panendothelial cell antigen</i>
MMPs	Métalloprotéases matricielles
MSH	Mélanocortine
MVB	Multivesicular bodies
NA	Noyau arqué
NPY	Neuropeptide Y
<i>ob</i>	Gène <i>obese</i>
Ob-R	Récepteur à la leptine
OCV	Organe circumventriculaire
OMS	Organisme Mondial de la Santé
PIP3	Phosphoinositol(3,4,5)Phosphate 3
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PK	Protéine kinase
POMC	Pro-opiomélanocortine
PRL	Prolactine
PTP1B	Protein tyrosine phosphatase 1B
PVH	Noyau paraventriculaire
Rab	Ras-related protein
SHP2	<i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11</i>
SOCS3	<i>Suppressor of cytokine signaling-3</i>
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
SNARE	<i>Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor</i>
SNC	Système nerveux central
TeNT	<i>Tetanus neurotoxin</i>
TfnR	<i>Transferrine receptor</i>
Ti-VAMP	<i>Tetanus neurotoxin insensitive-vesicle associated membrane protein</i>
VAMP	<i>vesicle-associated membrane protein</i>
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VMH	Noyau ventromédian
ZO	Zonula occludens

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Organisation anatomique de l'hypothalamus en connexion avec la glande pituitaire.	- 12 -
Figure 2 : Connexions entre les différents noyaux hypothalamiques de la régulation du ME.	- 16 -
Figure 3 : Organisation des vaisseaux sanguins de la BHE et de l'EM	- 19 -
Figure 4 : Organisation de l'éminence médiane.	- 19 -
Figure 5 : Organisation des tanocytes et des cellules épendymaires hypothalamiques	- 23 -
Figure 6 : Transport des facteurs métaboliques par les tanocytes.	- 25 -
Figure 7 : Circuit de régulation de la balance énergétique.	- 31 -
Figure 8 : Représentation des différents isoformes du récepteur à la leptine Ob-R.	- 37 -
Figure 9 : Voies de signalisation activées par le récepteur Ob-Rb.	- 41 -
Figure 10 : Structure de la clathrine et du complexe AP-2.	- 49 -
Figure 11 : Processus de formation d'une vésicule à clathrine.	- 52 -
Figure 12 : Les différents compartiments intracellulaires.	- 56 -
Figure 13 : Distribution des protéines SNAREs sur les différents compartiments intracellulaires.	- 66 -
Figure 14 : Caractérisation de la culture primaire de tanocytes de rat.	- 71 -
Figure 15 : Internalisation et accumulation de la leptine dans les tanocytes <i>in vitro</i> .	- 73 -
Figure 16 : Présence du récepteur à la leptine Ob-R dans les tanocytes et internalisation de la leptine	- 75 -
Figure 17 : L'inhibition de l'Epsine 15 bloque l'internalisation de la leptine par les tanocytes <i>in vitro</i> .	- 77 -
Figure 18 : Colocalisation de la leptine et du Ob-R avec la clathrine.	- 79 -
Figure 19 : Inhibition de la clathrine par utilisation de lentivirus shRNA.	- 80 -
Figure 20 : L'endocytose de la leptine est dépendante de la clathrine.	- 82 -
Figure 21 : Le dynasore inhibe l'internalisation de la leptine fluorescente par les tanocytes <i>in vitro</i> .	- 83 -
Figure 22 : La leptine transite dans les endosomes précoces.	- 85 -
Figure 23 : La leptine transite par les endosomes de recyclage.	- 87 -
Figure 24 : La leptine transite dans les endosomes tardifs et les lysosomes.	- 88 -
Figure 25 : La bafilomycine inhibe le transport de la leptine dans les tanocytes.	- 89 -
Figure 26 : La toxine botulique C bloque la sécrétion de la leptine par les tanocytes <i>in vitro</i> .	- 91 -
Figure 27 : Internalisation de la leptine mutée LAN par les tanocytes <i>in vitro</i> .	- 93 -
Figure 28 : Le relargage de la leptine par les tanocytes <i>in vitro</i> dépend des voies de signalisation.	- 93 -
Figure 29 : La signalisation de Ob-R est impliquée dans le relargage de la leptine.	- 95 -
Figure 30 : L'inhibition de ERK1/2 bloque la sortie de la leptine des endosomes précoces.	- 98 -
Figure 31 : L'inhibition de la voie de l'EGFR ralentit la sortie de la leptine des tanocytes.	- 99 -
Figure 32 : Optimisation du système de culture de tanocytes en 3D.	- 152 -
Figure 33 : Organisation des tanocytes en culture sur insert et extension des prolongements	- 154 -
Figure 34 : Les tanocytes en culture sur la membrane basale s'organisent en barrière et forment des JS.	- 155 -
Figure 35 : La leptine est internalisée par les tanocytes en culture sur insert.	- 157 -
Figure 36 : Figure : Les tanocytes émettent des prolongements dans les canaux de la puce microfluidique.	- 160 -
Figure 37 : Les tanocytes émettent des prolongements dans les canaux de la puce microfluidique.	- 161 -
Figure 38 : La leptine colocalise avec la cavéoline dans les tanocytes <i>in vitro</i> .	- 169 -
Figure 39 : Internalisation de la leptine et de l'EGF fluorescent par les tanocytes <i>in vitro</i> .	- 174 -
Figure 40 : La leptine colocalise avec LAMP-1.	- 176 -
Figure 41 : Expression des protéines VAMP et inhibition de la protéine VAMP-2 dans les tanocytes <i>in vitro</i>	- 179 -
Figure 42 : Description de l'organisation d'une puce microfluidique Xona.	- 195 -
Figure 43 : Organisation de l'insert de culture 3D Millicell.	- 195 -

AVANT-PROPOS

La survie de tout organisme résulte dans sa capacité à s'adapter rapidement aux variations externes de son environnement et à maintenir un état d'équilibre interne appelé homéostasie. Le maintien de cet équilibre est rendu possible grâce au dialogue permanent qui existe entre la périphérie et le cerveau, lequel est orchestré par la circulation sanguine.

Ce phénomène d'homéostasie se retrouve également dans le cadre de la régulation de la prise alimentaire. La leptine, hormone satiétogène est au centre de cette régulation : elle renseigne l'hypothalamus sur le statut d'adiposité général de l'organisme et induit une réponse métabolique adaptée en agissant directement sur les neurones cibles du noyau arqué, afin de réduire la prise alimentaire et de rationaliser les dépenses énergétiques.

Or, il existe des cellules spéciales responsables du transport de la leptine de la périphérie vers le cerveau : les tanocytes.

J'ai découvert les tanocytes en Master, au sein du laboratoire du Dr Vincent Prévot à Lille, où j'ai particulièrement étudié l'organisation de la barrière tanocytaire chez la souris obèse et sa plasticité au cours du cycle ovarien chez la femelle. J'ai par la suite rejoint l'équipe du Dr Stéphane Gasman à l'institut des Neurosciences cellulaires et intégratives (INCI, CNRS UPR3212) de Strasbourg, pour développer un tout nouveau projet visant à étudier précisément les mécanismes de transport intracellulaires de la leptine par les tanocytes.

Les tanocytes sont capables grâce à leur position préférentielle dans l'éminence médiane, le long du 3^e ventricule, de contrôler l'accès des molécules métaboliques vers le noyau arqué. Considérés comme des « gardiens » de la porte d'entrée dans l'hypothalamus, les tanocytes forment une barrière étanche qui empêche la diffusion des molécules vers le reste du cerveau et joue *de facto* un rôle central dans la régulation des échanges entre la périphérie et le cerveau. Les tanocytes participent activement au transport par transcytose des hormones métaboliques telles que la leptine et la ghréline. Cependant, ce mécanisme de transport n'avait jamais été réellement étudié.

Mes travaux ont donc consisté à mettre en exergue les mécanismes moléculaires impliqués dans le transport de la leptine par les tanocytes *in vitro*.

Pour ce faire, j'ai mis en place un système de culture primaire de tanocytes de rat, modèle sur lequel j'ai disséqué les différentes étapes de la transcytose, à savoir l'endocytose ainsi que le transport intracellulaire de la leptine jusqu'à son relargage, pour en découvrir les principaux acteurs. En parallèle, j'ai également élaboré un système unique de culture polarisée pour les tanocytes *in vitro*.

La présente thèse s'articule comme suit : après avoir présenté l'organisation de l'hypothalamus, de l'éminence médiane, ainsi que les acteurs de la régulation de la balance énergétique, je présenterai en détails la leptine ainsi que son partenaire, le récepteur Ob-R qui, ensemble, régulent le métabolisme énergétique. Je me focaliserai ensuite sur les différentes étapes du transport intracellulaire que ce complexe leptine/Ob-R peut emprunter dans la cellule. Enfin, je conclurai ce manuscrit par une discussion sur les questions importantes soulevées par mes résultats et observations et je proposerai des perspectives d'étude à court et à long terme.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1

CENTRE DE REGULATION DE L'HOMÉOSTASIE ENERGETIQUE

I. L'HYPOTHALAMUS

I.1. GENERALITES

L'hypothalamus représente une petite zone située à la base du système nerveux central (SNC) et distribuée de part et d'autre du 3^e ventricule. Considéré comme le principal organe endocrine, il régule les grandes fonctions physiologiques de l'organisme telle que la reproduction, le métabolisme énergétique, la température corporelle, la pression sanguine et l'horloge circadienne afin de maintenir une homéostasie. L'hypothalamus est relié à l'hypophyse, une autre glande endocrine également appelée glande pituitaire avec laquelle il communique par la tige pituitaire formant ainsi l'axe hypothalamo-hypophysaire. Sa fonction première est de sécréter des facteurs de régulation, les neurohormones hypothalamiques, dans la circulation sanguine ou dans le système porte hypothalamo-hypophysaire qui seront transportées jusqu'à la glande pituitaire antérieure pour adapter et coordonner la sécrétion hormonale des différentes glandes du corps¹. L'ensemble participe au dialogue constant qui existe entre le système nerveux central et le système endocrinien.

Ce n'est qu'au début du 20^e siècle que l'importance de l'hypothalamus dans la régulation du contrôle de l'homéostasie énergétique a été démontrée. Il était jusqu'alors difficile de différencier le rôle de l'hypothalamus de celui de l'hypophyse physiquement liés. Dans les années 1930, des études utilisant la stimulation électrique pour induire des lésions irréversibles ont montré l'implication de l'hypothalamus dans la régulation de la prise alimentaire. Une lésion induite dans les régions de l'hypothalamus ventromédian comprenant le noyau arqué (NA) ou l'hypothalamus dorsomédian, induit chez les animaux la mise en place d'une hyperphagie et de l'obésité². Inversement, Anand et Brobeck ont montré en 1951 qu'une lésion de l'aire latérale de l'hypothalamus pouvait engendrer une inhibition de la faim associée à une perte de poids importante allant jusqu'à la mort des animaux³. Découlant de ces travaux, l'identification dans l'hypothalamus de fonctions associées spécifiquement à certaines régions ont été mises en avant, définissant ainsi l'aire latérale de l'hypothalamus comme le « centre de la faim » et l'hypothalamus ventromédian comme le « centre de la satiété »⁴. Historiquement, ces travaux ont été les premiers à démontrer le rôle clé de l'hypothalamus dans l'intégration des signaux énergétiques et la régulation du métabolisme énergétique.

L'hypothalamus est aujourd'hui connu comme le centre intégrateur majeur des signaux endocrins du cerveau afin de maintenir l'homéostasie⁵. Dans l'organisme, le maintien de cet état d'équilibre énergétique est en grande partie possible grâce à la complexité physiologique et anatomique de cette région du SNC (figure 1). En effet, il se compose d'un vaste réseau neuronal distribué dans des noyaux hypothalamiques qui communiquent les uns avec les autres par l'expression de neuropeptides spécifiques et modulés par des signaux reflétant en permanence le statut énergétique de l'organisme^{6,7}. Cette organisation lui permet l'intégration des signaux sensoriels périphériques qui sont ensuite traités, et une réponse physiologique est adaptée par la sécrétion de signaux régulateurs autonomes et de peptides neuroendocrines pour maintenir l'homéostasie⁸.

1.2. LES NOYAUX HYPOTHALAMIQUES

L'hypothalamus est constitué d'un ensemble de noyaux symétriquement répartis autour du 3^e ventricule et qui regroupe spécifiquement diverses populations neuronales. De récents travaux de recherche ont mis en évidence la composition neuronale des noyaux hypothalamiques et leur rôle notamment dans la régulation du métabolisme énergétique permettant de mieux comprendre leur fonction. Ces structures peuvent être de 1^{er} ordre, c'est le cas du noyau arqué (NA) qui se projette ensuite sur les structures de 2nd ordre, comprenant les noyaux tel que le noyau ventromédian (VMH), le noyau dorso-médian (DMH), l'aire hypothalamique latérale (ALH) et le noyau para-ventriculaire (PVH) formant un réseau complexe capable de répondre de manière synchronisée aux variations énergétiques de l'organisme (figure 2)^{9,10}.

1.2. A – Noyau de 1er ordre - Le noyau arqué

Le noyau arqué (NA), situé dans l'hypothalamus médiobasal est le premier noyau à recevoir l'information périphérique qu'il va ensuite transmettre aux autres noyaux hypothalamiques¹¹. Son emplacement privilégié, accolé au 3^e ventricule et à l'éminence médiane (voir détails chapitre I, partie 3), un organe circumventriculaire qui contient un réseau dense de vaisseaux sanguins fenêtrés, lui permet d'intégrer les signaux périphériques hormonaux et nutritifs qui passent dans le LCR ou dans le sang¹². Le NA présente un nombre important de récepteurs aux différentes hormones métaboliques comme la leptine¹³, la ghréline¹⁴ ou encore l'insuline¹⁵ et qui sont présents sur les neurones impliqués dans la régulation de la balance énergétique.

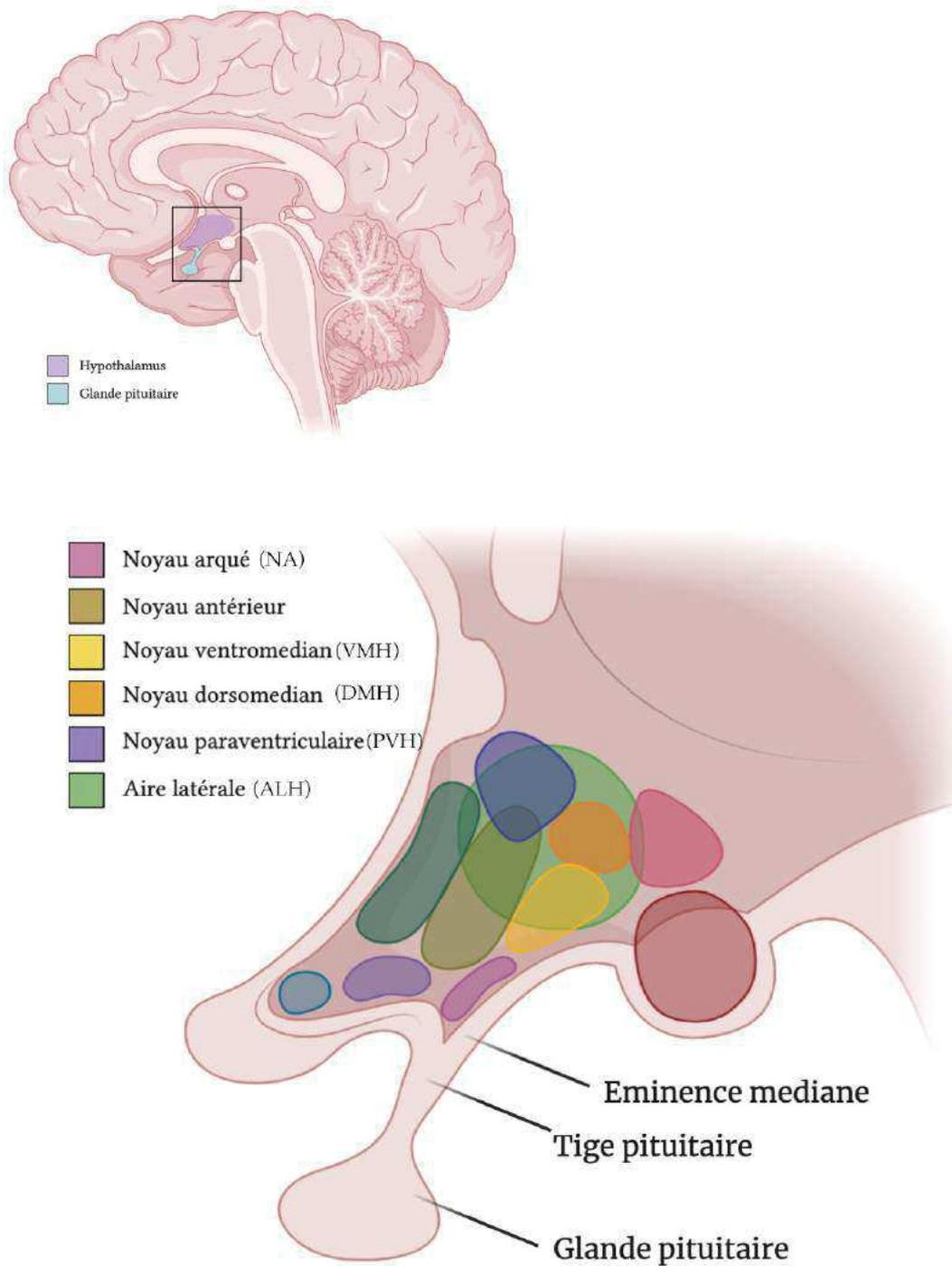


Figure 1 : Organisation anatomique de l'hypothalamus en connexion avec la glande pituitaire. L'hypothalamus se situe à la base du cerveau et est associé avec la glande pituitaire. L'hypothalamus se compose de nombreux noyaux hypothalamiques tels que le noyau arqué (NA), le noyau ventromedian (VMH), le noyau dorsomedian (DMH), le noyau paraventriculaire (PVH) l'aire latérale hypothalamique (ALH) et de l'éminence médiane. La tige pituitaire relie l'hypothalamus à la glande pituitaire, formant ainsi l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Parmi les populations neuronales mises en jeu, deux populations majeures ont été décrites. Les neurones dits anorexigènes, expriment la *proopiomélanocortine* (POMC) et le transcrit *Cocaine and Amphetamine-Related Transcript* (CART). La POMC est le précurseur des hormones de stimulation *Melanocyte Stimulating Hormone* (α -MSH et β -MSH) qui ont pour effet de diminuer la prise alimentaire et de favoriser la dépense énergétique *via* l'activation des récepteurs à la mélanocortine MC3-R et MC4-R^{16,17}. La seconde population, composée de neurones dits orexigènes, sécrète le neuropeptide Y (NPY) et la protéine *Agouti-related protein* (AgRP)¹⁸ qui stimulent la prise alimentaire et inhibent la dépense énergétique¹⁹. De plus, AgRP se fixe également sur les récepteurs MC3-R et MC4-R et agit comme antagoniste compétitif capable d'inhiber l'effet anorexigène de l' α -MSH^{20,17}.

L'ensemble des neurones de 1^{er} ordre constituant le noyau arqué jouent un rôle très important dans le relai de l'information. En effet, ils doivent intégrer cette information et la relayer aux neurones de 2nd ordre sur lesquels ils se projettent (figure 2)⁷.

I.2. B – Noyau de 2nd ordre – Le noyau ventromédian

Le noyau ventromédian (VMH) représente le noyau hypothalamique le plus volumineux. Situé dorsalement au NA²¹, il est considéré comme le « centre de la satiété ». Le VMH fait partie du circuit de régulation de la prise alimentaire et son altération entraîne une hyperphagie et une obésité²². Il contient notamment des récepteurs à mélanocortine et des récepteurs au NPY sécrété par le NA à proximité²³. De plus, il est également proche du 3^e ventricule, ce qui lui permet d'être atteint directement par la leptine²⁴. Le VMH contient un nombre important de neurones glucosensibles lui conférant également des propriétés de senseur de glucose. En effet, il joue un rôle dans l'adaptation de la réponse aux variations de la glycémie^{25,26} et une chute importante de glucose sanguin entraîne une stimulation de la prise alimentaire²⁷. On peut également citer la présence du facteur anorexigène, le neurotrophique *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) dans le VMH qui est exprimé par certains neurones et qui participe à la régulation de la prise alimentaire^{28,29}.

A son tour, le VMH émet des projections vers les autres noyaux tels que le noyau dorsomédian, paraventriculaire et l'aire latérale hypothalamique⁷. La liaison avec ALH lui permet notamment d'agir sur le comportement alimentaire, et plus spécifiquement sur la taille et la fréquence des repas²⁴.

I.2. C - Noyau de 2nd ordre – Le noyau dorsomédian

Le noyau dorsomédian (DMH) est situé de chaque côté du 3^e ventricule, dorsalement au VMH. Il peut être divisé en 3 parties, antérieure, ventrale et postérieure. Différents types de neurones le composent dont notamment des neurones à galanine, un neuropeptide orexigène dont une proportion répond à la leptine³⁰. Il faut noter qu'une lésion du DMH induit une hypophagie et réduit l'accumulation de masse grasse³¹. Le DMH va initier la prise alimentaire et joue donc un rôle dans la régulation de la prise alimentaire.

Le DMH reçoit des projections NPY/AgRP et POMC du NA et émet de nombreuses connexions directes sur les noyaux hypothalamiques médians (PVH) et latéraux (ALH) impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire^{32,33}. L'ensemble de ces connexions font de ce noyau un centre intégrateur impliqué dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel^{32,31}.

I.2. D - Noyau de 2nd ordre – Noyau paraventriculaire

Le noyau paraventriculaire (PVH) se situe dans l'hypothalamus antérieur et dans la partie supérieure du 3^e ventricule. Il joue un rôle important dans la restriction de la prise alimentaire, et sa destruction conduit, chez l'animal, à une suralimentation et à l'obésité³⁴. Le PVH communique directement avec le NA duquel il reçoit de nombreuses projections de neurones NPY/AgRP et POMC¹⁰. Cette relation particulière avec le NA semble être centrale dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Chez l'animal, une injection de NPY dans le PVN stimule la prise alimentaire alors qu'une injection de l' α -MSH l'inhibe^{19,35}.

Le PVH exprime de façon importante les récepteurs à la mélanocortine MC4- R^{36,37} et chez la souris, sa suppression dans le PVH entraîne une hyperphagie associée à une réduction de la dépense énergétique et à une altération de l'homéostasie du glucose³⁸. On peut noter également que l'hormone libérant de la corticotropine (CRH)³⁹ et l'hormone libérant la thyrotropine (TRH)⁴⁰ sont des neuropeptides anorexigènes de 2nd ordre sécrétés dans le PVH. Ils sont également impliqués dans l'activation de MC4-R et participent donc à la régulation de la prise alimentaire.

Le PVN a pour fonction d'intégrer de nombreux signaux et de réguler la prise alimentaire et modifie le comportement alimentaire grâce notamment à sa communication avec le tronc cérébral.

I.2. E - Noyau de 2nd ordre – L'aire latérale de l'hypothalamus

Historiquement considéré comme le centre de la faim, le noyau de l'aire latérale de l'hypothalamus (ALH) se situe latéralement aux autres noyaux hypothalamiques. Des expériences de stimulation neuronale ou pharmacologique de cette aire entraînent une motivation accrue à manger. Il a été démontré qu'une lésion de l'ALH conduit à une perte de poids et à la mort des animaux par restriction calorique^{41,42}. L'ALH contient deux populations neuronales qui expriment les peptides *melanin-concentrating hormone* (MCH) et l'orexine (A et B)⁴³ qui favorise la prise alimentaire (figure 2). Elle comporte également des terminaisons neuronales exprimant le NPY qui proviennent du NA. La présence d'un récepteur au NPY (Y5R) lui permet notamment de répondre à l'action orexigène de ce peptide⁴⁴. L'aire latérale se compose également de neurones glucosensibles lui permettant de répondre aux variations du niveau de glucose circulant et de participer plus généralement à la régulation de l'homéostasie glucidique⁴⁵. Elle va émettre des projections vers les autres noyaux et d'autres structures hypothalamiques tels que le noyau du tractus solitaire ou le noyau du raphé mais également vers le tronc cérébral et la moelle épinière contrôlant ainsi la composante parasympathique du système nerveux autonome et la régulation de la prise alimentaire à court et à long terme.

La communication du NA avec les autres noyaux hypothalamiques est primordiale pour la transmission des signaux et l'adaptation permanente de la réponse énergétique (figure 2). Dans ce contexte, l'accès des facteurs métaboliques périphériques au NA est une étape importante dans la régulation de la balance énergétique et implique des zones d'échanges entre la périphérie et l'hypothalamus telles que la barrière hémato-encéphalique et l'éminence médiane.

1.3. INTERFACE SANG/CERVEAU HYPOTHALAMIQUE

Au sein de l'hypothalamus médiobasal et de l'éminence médiane, les échanges avec la périphérie sont nombreux et font intervenir différents acteurs qui sont à l'interface entre le sang et le cerveau.

I.3. A - La barrière hémato-encéphalique

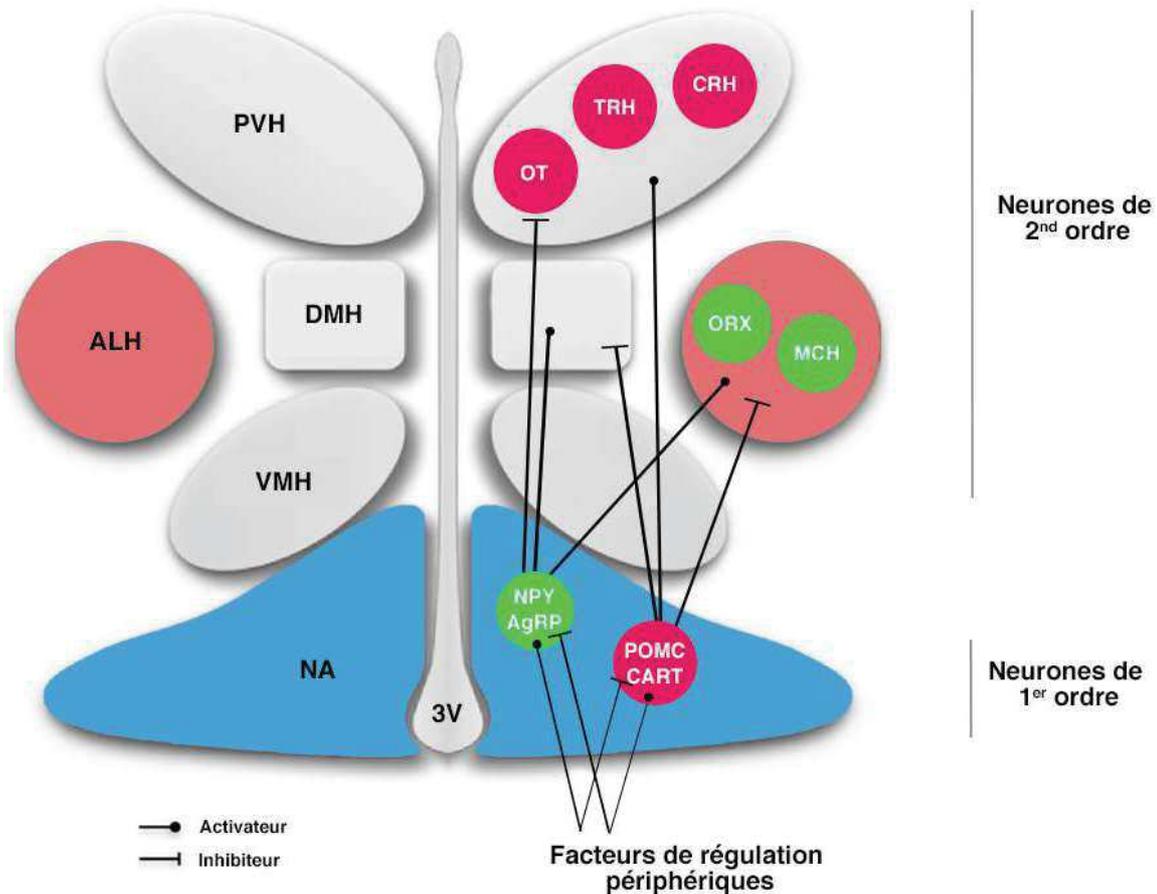


Figure 2 : Connexions entre les différents noyaux hypothalamiques de la régulation du métabolisme énergétique. Représentation des neurones de 1^{er} ordre, le noyau arqué, qui communique avec et les neurones de second ordre, comprenant le VMH, le DMH, le PVH, et ALH. Les neurones du NA expriment les peptides NPY/AgRP, orexigéniques et les neurones exprimant POMC et CART sont anorexigènes. Les neurones de second ordre produisent des peptides anorexigènes OT (ocytocine), TRH (thyrotropine-releasing hormone, corticotropin-releasing hormone (CRH) dans le PVN et des peptides orexigènes ORX (orexin) et MCH (melanin-concentrating hormone) dans l'ALH. L'ensemble participe à la régulation de la prise alimentaire et des dépenses énergétiques. NA : noyau arqué ; VMH : hypothalamus ventro-médian ; DMH : hypothalamus dorso-médian ; ALH : aire latérale hypothalamique. *Adapté de Le thuc et al., 2017.*

La barrière hématoencéphalique (BHE) est primordiale pour le maintien de l'homéostasie du cerveau et permet de prévenir l'exposition des différents neurones hypothalamiques aux molécules circulantes.

Présente dans l'hypothalamus ainsi que dans les autres régions du cerveau, elle se compose de cellules endothéliales présentant des jonctions serrées qui sont entourées d'une épaisse lame basale, d'astrocytes et de péricytes (figure 3)^{46,47}. L'ensemble de ces cellules joue un rôle crucial dans la formation des propriétés de barrière de la BHE. Les cellules endothéliales et les péricytes sécrètent directement la lame basale composée de collagène de type IV, de fibronectine et de laminine, éléments essentiels à la différenciation des cellules endothéliales et à la formation des jonctions serrées⁴⁸.

Il faut noter qu'à ce niveau, les cellules endothéliales ne présentent pas de pores fenêtrés dans leur membrane, empêchant ainsi la diffusion passive des molécules qui ne peuvent pas franchir la BHE imperméable⁴⁹. Un transport spécifique et régulé est donc nécessaire pour atteindre le cerveau à travers la BHE.

I.3. B – L'éminence médiane

L'éminence médiane est définie comme un organe circumventriculaire (OCV) et se situe à la base du 3^e ventricule. Contrairement à la BHE, elle se compose d'un plexus capillaire riche qui présente des fenestrations⁵⁰ et les cellules endothéliales sont dépourvues de jonctions serrées (figure 3). Cette organisation spécifique permet la libre diffusion des molécules dans le parenchyme de l'EM et les propriétés de barrière protectrices sont ici reportées au niveau de cellules épendymo-gliales, appelées tanocytes (voir chapitre 1, partie II). L'EM possède une fonction clé dans la communication entre le sang et le cerveau. En effet, cette zone d'échange importante joue un rôle de porte d'accès aux molécules circulantes (hormones et nutriments) vers les cellules nerveuses du NA et par conséquent, est directement impliquée dans la régulation de l'homéostasie énergétique.

L'EM est une structure hautement organisée. Le plancher du 3^e ventricule est formé par les corps cellulaires des tanocytes qui présentent des jonctions serrées, limitant ainsi le libre passage des molécules vers le LCR^{49,51}. De plus, les tanocytes émettent des prolongements dans la zone externe de l'EM qui sont en contact avec les capillaires fenêtrés, établissant un lien anatomique entre le compartiment sanguin et le LCR. D'autres cellules gliales, comme les astrocytes ou encore des terminaisons neuronales participent également à l'organisation complexe de l'EM (figure 4).

L'hypothalamus

L'hypothalamus est le centre principal de régulation de l'homéostasie énergétique.

Il se compose de noyaux dont le principal est le noyau arqué. Il est le premier noyau rejoint par les signaux métaboliques qu'il intègre puis relaye l'information aux noyaux de 2nd ordre.

L'hypothalamus contient différentes interfaces avec le sang, importantes pour les échanges avec la périphérie, comme la barrière hémato-encéphalique (BHE) ou l'éminence médiane (EM).

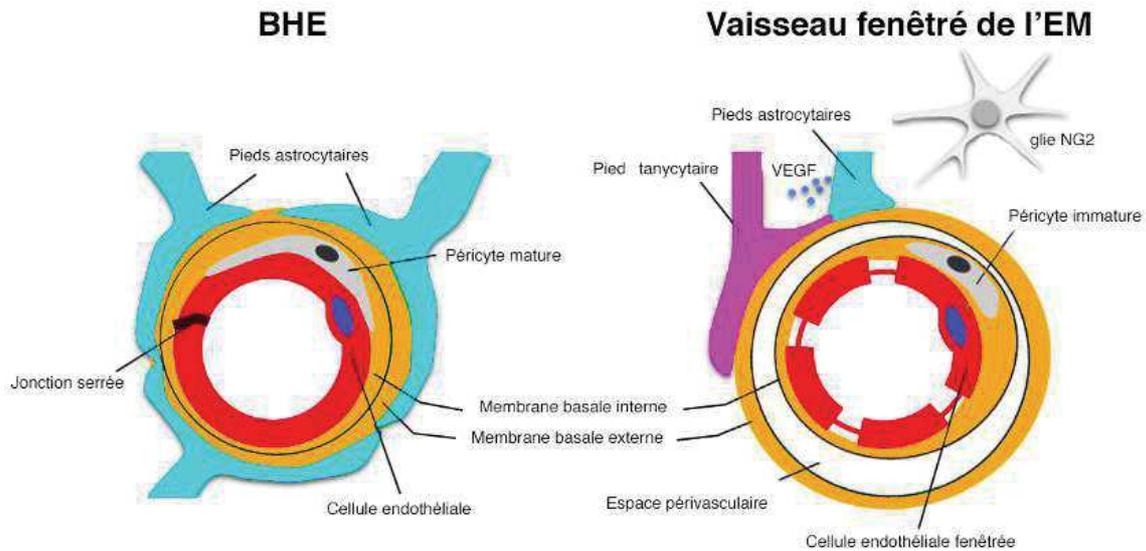


Figure 3 : Organisation des vaisseaux sanguins de la barrière hémato-encéphalique et des vaisseaux fenêtrés de l'éminence médiane. Schéma représentant les cellules endothéliales entourées de péricytes matures constituant la BHE. Ils sont entourés d'une épaisse lame basale et de pieds astrocytaires. Les cellules endothéliales de la BHE possèdent des jonctions serrées alors que les cellules endothéliales de l'EM présentent des fenestrations. Les astrocytes entourent les vaisseaux de l'EM et sont au contact de la membrane basale externe qui délimite un espace périvasculaire. Les vaisseaux de l'EM sont également en contact avec les pieds tancytaires. *Adapté de Morita-Takemura and Wanaka, 2019.*

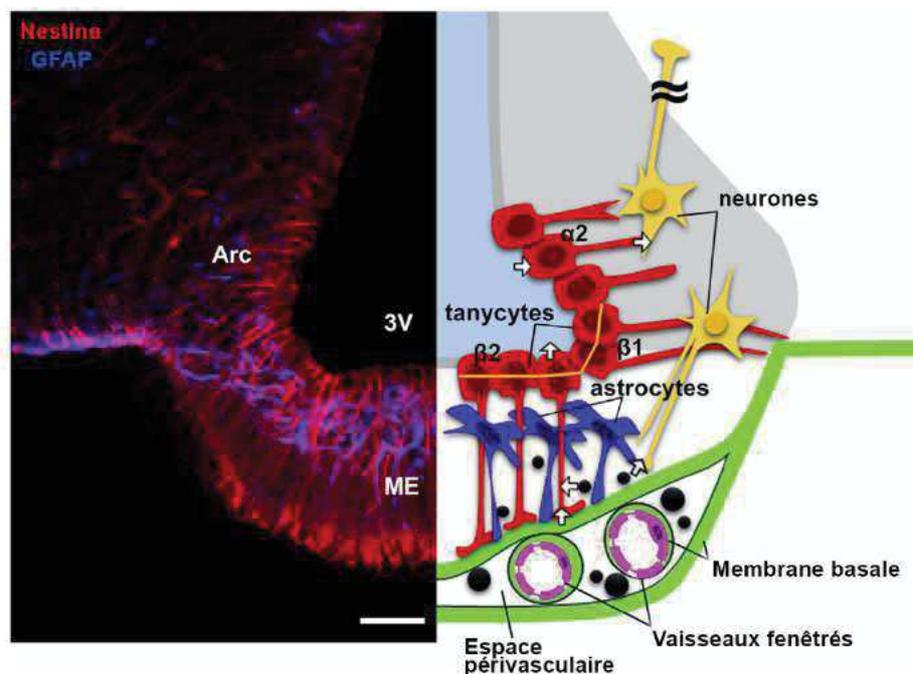


Figure 4 : Organisation de l'éminence médiane. Les corps cellulaires des tanocytes (Nestine, rouge) forment le plancher du 3^e ventricule et présentent des jonctions serrées (orange). Ils émettent des prolongements qui contactent l'espace périvasculaire des cellules endothéliales fenêtrées connectant ainsi le sang et le LCR. Zone de communication importante, on trouve également dans l'EM des astrocytes (GFAP) et les terminaisons des neurones du NA. *Adaptée de Morita-Takemura and Wanaka, 2019*

II. LES TANYCYTES HYPOTHALAMIQUES

L'hypothalamus médiobasal contient nombre de neurones qui sont contactés par les molécules présentes dans le LCR ou dans la circulation sanguine. L'organisation de cette région est donc très intéressante pour l'étude de la communication entre la périphérie et le SNC. Il est admis aujourd'hui que les tanycytes représentent un des acteurs principaux de cette zone d'échange et participent activement à sa régulation.

II.1. HISTORIQUE

Le nom tanycytes provient du grec *tanus* qui signifie "allongé". Ces cellules ont été décrites pour la première fois par Wingstrand KG. (1951) puis Horstmann E. (1954) qui les identifia dans le *recess infundibular* du 3^e ventricule⁵². Historiquement, c'est en 1909 que Santiago Ramon y Cajal fait la première observation de cellules allongées dont les corps cellulaires forment la paroi du 3^e ventricule et présentent un prolongement cellulaire unique s'étendant jusqu'à la surface piale du recess infundibular. Les tanycytes sont présents dans tout le règne animal. En effet, on les retrouve dans tout le SNC des vertébrés inférieurs (poissons, oiseaux, ...) mais chez les mammifères adultes, ils sont restreints dans des zones spécifiques du cerveau dont notamment les parois du 3^e ventricule^{53,54}, la base du 4^e ventricule⁵⁵ et les ventricules latéraux chez le rat adulte⁵⁶.

Les tanycytes sont des cellules épendymo-gliales bipolaires possédant un pôle proximal au niveau du ventricule et un pôle distal au contact de capillaires du système porte hypothalamo-hypophysaire. C'est grâce à cet emplacement privilégié que plus tard, Löfgren (1959)⁵⁷ émit l'hypothèse que les tanycytes seraient des transporteurs de molécules qui proviennent du sang, vers le LCR. A la suite de ces découvertes, des études ont soulevé des discordances sur la capacité des tanycytes à transporter les molécules circulantes dues notamment au manque d'outils. Aujourd'hui, il est nécessaire de continuer ses investigations pour mieux comprendre les mécanismes de régulation de ses échanges.

II. 2. CARACTERISTIQUES

II.1. A – Hétérogénéité des tanocytes

La population de tanocytes est hétérogène et historiquement 4 types de tanocytes différents ont été décrits^{58,59}. Le type de tanocyte se détermine sur la base notamment de leur localisation le long du 3^e ventricule, de leur morphologie ou de leur fonction cellulaire^{60,61}. Au cours des dernières années, des expériences ont tenté d'approfondir la compréhension du rôle de chacun des types tanocytaires possédant des phénotypes bien distincts^{62,63,64}. Les tanocytes sont divisés en deux groupes, α et β , chacun divisé en 2 sous-types donnant les tanocytes α -1 et α -2 et les tanocytes β -1 et β -2 (figure 5).

Tanocyte α -1

Les tanocytes α -1 possèdent un corps cellulaire de forme cylindrique et une zone sous nucléaire formant un cône et donnant lieu à un prolongement basal lisse. Situés dans la paroi latérale du recessus infundibulaire, ils contactent le VMN et une partie du DMN. Les pieds sont en contact avec les capillaires sanguins et un même prolongement peut parfois faire plusieurs contacts. Le pôle apical des tanocytes α -1 ne possède pas de microvillosités, mais la membrane lisse peut présenter 1 ou 2 cils⁶⁵. Ce sous type reste aujourd'hui peu caractérisé. Récemment, il a été rapporté que les tanocytes α -1 présentaient des protrusions le long des prolongements et contactent de cette façon les neurones du DMH⁶⁶.

Tanocyte α -2

Les tanocytes α -2 possèdent également un corps cellulaire cylindrique et présentent au niveau apical un ou deux cils. Les prolongements émis sont au contact de la zone dorsale du noyau arqué (NA) et suivent une trajectoire de projection latéroventrale. Ils présentent des épines tout au long de leur prolongement et les pieds tanocytaires sont au contact des capillaires sanguins de la BHE mais également des neurones NPY/AgRP présents dans cette zone^{49,67}.

Tanocyte β -1

Les tanocyte β -1 forment la paroi du 3^e ventricule au niveau ventral du NA. Ils étendent leurs prolongements dans la zone latérale de l'EM en suivant une trajectoire courbe. Ils sont en contact avec l'espace périvasculaire des capillaires fenêtrés du système porte hypothalamo-hypophysaire mais également avec les neurones à GnRH (gonadolibérine)⁶⁰.

Tanocyte β -2

Les tanocyte β -2 possèdent un corps cellulaire plat et des prolongements à surface lisse. Ils s'étendent dans l'EM avec une trajectoire rectiligne et possèdent des pieds avec plusieurs ramifications⁶⁸. Les prolongements tanocytaires sont en contact avec la zone péricapillaire et les axones terminaux

des neurones présents dans l'EM et le NA. Les corps cellulaires des tanycyte β -2 possèdent des jonctions serrées, composées des protéines zonula occludens-1, occludine et claudine-5, qui permettent d'isoler le LCR des molécules diffusant dans le parenchyme de l'éminence médiane^{49,69}.

II.1. B – La barrière tanycytaire de l'EM

Comme présenté précédemment, les vaisseaux caractéristiques de l'EM présentent des fenestrations permettant aux molécules de diffuser librement dans le parenchyme. Or, la présence de jonctions serrées sur les corps cellulaires des tanycytes β permet de restreindre l'accès des molécules au NA et définissent ce que l'on appelle la barrière tanycytaire. De plus, cette barrière est extrêmement plastique. La présence de jonctions serrées organisées en « nid d'abeille » est modulée selon le statut énergétique de l'organisme. Lors d'un jeun, les tanycytes sont capables de se réorganiser et d'induire la perméabilité des vaisseaux par sécrétion de VEGF-A⁷⁰ montrant l'adaptation rapide de cette barrière.

Les tanycytes sont des cellules bipolaires spécialisées qui réalisent un pont entre le LCR et le sang dans l'EM. A ce niveau, les tanycytes β sont au contact des vaisseaux fenêtrés et participent à la régulation des échanges avec la périphérie afin de contrôler la balance énergétique.

II.2. C – Fonctions des tanycytes

Contrôle des fonctions métabolique et de reproduction

La fonction de barrière tanycytaire et leur relation étroite avec les vaisseaux de l'EM et de la BHE, placent les tanycytes dans une position privilégiée pour l'intégration des facteurs périphériques⁷¹. De plus, la barrière restreint le passage vers le NA des molécules circulantes qui diffusent dans le parenchyme de l'EM^{49,70}.

Des études montrent que les tanycytes ont un rôle dans le transport des hormones métaboliques vers l'hypothalamus. En effet, la leptine et la ghréline circulantes sont captées par les tanycytes β puis sécrétées dans le LCR pour atteindre les neurones du NA^{72,73}. Les hormones métaboliques seraient donc transportées par transcytose à travers les tanycytes (figure 6).

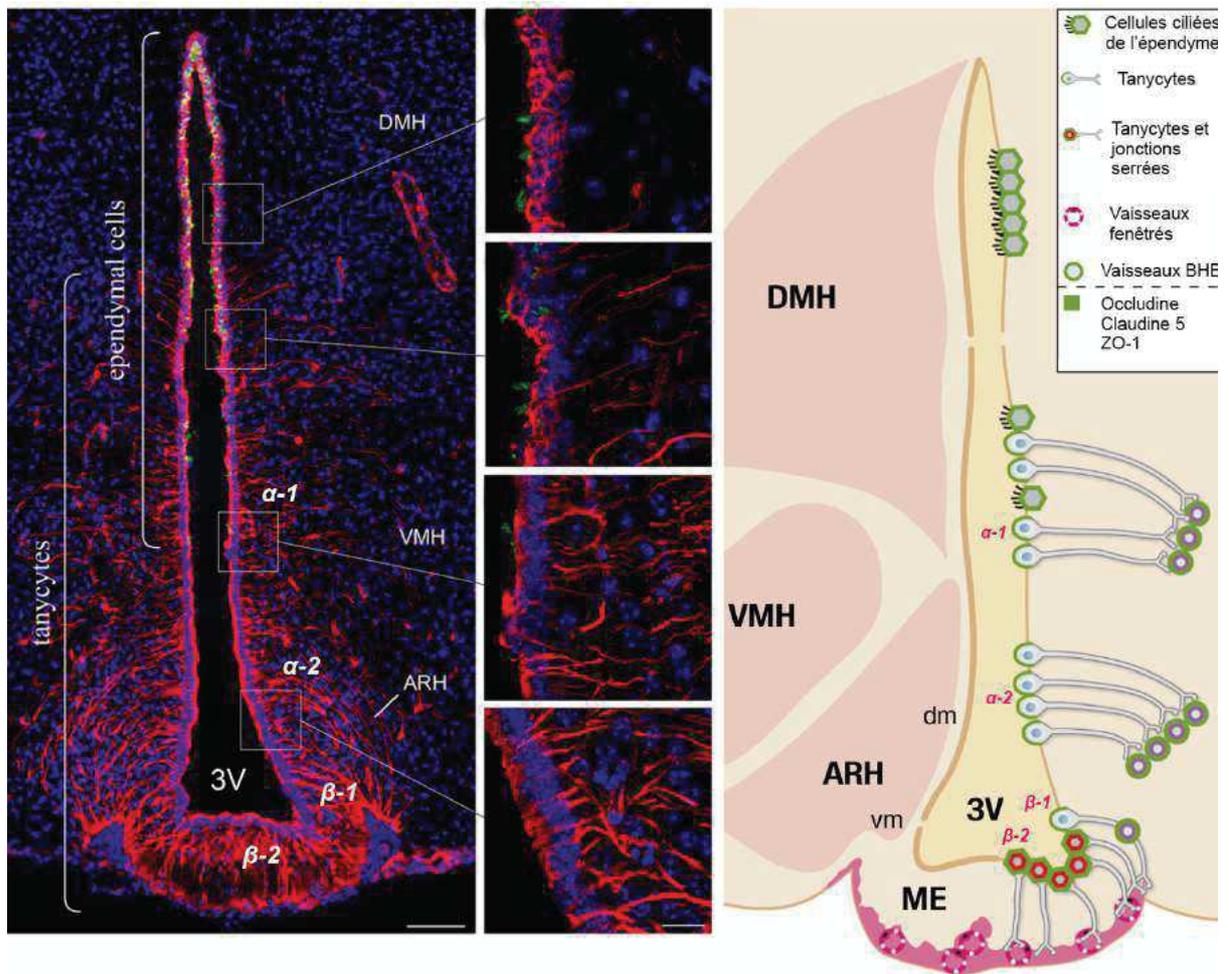


Figure 5 : Organisation des tanocytes et des cellules épendymaires hypothalamiques autour du 3^e ventricule. Les tanocytes (nestine rouge) s'organisent différemment le long du 3^e ventricule. En effet les tanocytes α -1 font face au noyau DMH et VMH, les tanocytes α -2 et β -1 font face au NA et les tanocytes β -2 sont localisés dans l'EM. Les prolongements des tanocytes β contactent les capillaires fenêtrés du système porte. Contrairement aux autres tanocytes, les corps cellulaires des tanocytes β -2 de l'EM présentent des jonctions serrées et des propriétés de barrière, empêchant la diffusion des molécules d'atteindre les noyaux hypothalamiques par le 3^e ventricule. *Figure adaptée de Prévot et al., 2018.*

Les tanycytes participent également à la régulation de l'axe de reproduction en répondant aux variations des hormones sexuelles. Ils sont sensibles aux œstrogènes et expriment notamment le récepteur α aux œstrogènes⁷⁴. Dans l'EM, les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH sont au contact de prolongements tanycyotaires qui modulent la sécrétion de l'hormone directement dans le système porte⁷⁵. En effet, selon le cycle ovarien, les tanycytes vont s'adapter et par une action de rétraction de leurs pieds, permettre la libération de la GnRH dans le sang⁷⁶.

Outre la capacité des tanycytes à transporter et réguler l'accès des hormones sexuelles et métaboliques, ils sont également sensibles aux différents nutriments présents dans le 3^e ventricule⁷⁷. Les tanycytes α et β -1 agissent comme des senseurs du glucose présent dans le LCR (figure 6)⁷⁸ et expriment notamment le transporteur de glucose GLUT1 et GLUT2⁷⁹. De plus, une étude récente a montré que les tanycytes expriment les récepteurs du goût (doux) Tas1r1 et Tas1r3 qui peuvent s'associer et contribuer à la sensibilité des tanycytes pour la détection des acides aminés présents dans le LCR⁸⁰. Ils répondent également à la présence des acides gras et sécrètent le facteur de croissance FGF21 afin de réguler l'homéostasie lipidique centrale⁸¹.

Neurogénèse

Au cours de la période post-natale, la présence de cellules en division a été décrite autour du 3^e ventricule. C'est plus particulièrement dans la région ventrale de l'hypothalamus qu'une niche de progéniteurs a été découverte. Les tanycytes expriment des marqueurs de cellules souches tels que le nestine et Sox 2 et le facteur de transcription des progéniteurs Rax⁸² et seraient à l'origine des nouveaux neurones générés dans cette zone qui s'intègrent et forment des synapses avec les neurones NPY, AgRP et POMC déjà existants^{83,84}. De plus, ils peuvent également produire de nouvelles cellules gliales après la naissance⁸⁵. Les tanycytes sont capables de neuro-gliogenèse, permettant le renouvellement des cellules gliales et neuronales impliquées notamment dans la régulation du métabolisme et du contrôle de la fonction de reproduction. Cependant, le type de tanycytes impliqué reste encore débattu^{86,87}.

Les tanycytes participent donc à la régulation de la fonction de reproduction et du métabolisme énergétique.

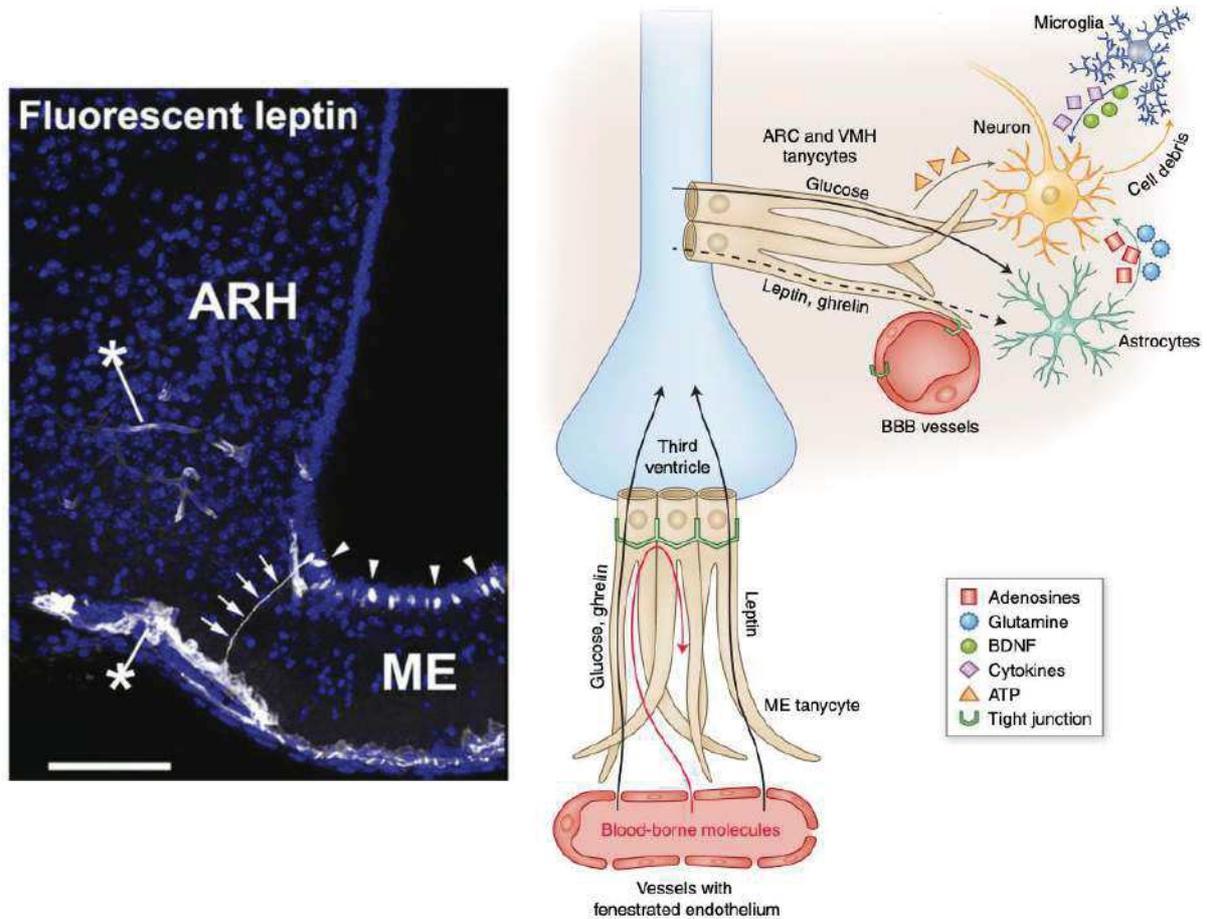


Figure 6 : Transport des facteurs métaboliques par les tanocytes. Les tanocytes organisés le long du 3^e ventricule sont capables de transporter des facteurs métaboliques. Les tanocytes β localisés dans l'EM présentent des jonctions serrées au niveau de leurs corps cellulaires et les prolongements sont au contact de vaisseaux fenêtrés. Les pieds tanycytaires captent la leptine (blanc) et la ghréline circulante et vont les transporter jusqu'au corps cellulaires pour les sécréter dans le LCR. Les hormones vont ensuite rejoindre leurs cibles neuronales présentes dans le NA. Les tanocytes répondent également aux variations des nutriments dont le glucose présent dans le sang et dans le LCR. Les tanocytes α peuvent à leur tour transporter les molécules du LCR vers le NA qui se compose également de vaisseaux de la BHE et d'astrocytes. *Issue de Balland et al., 2014 ; Garcia-Caceres et al., 2019.*

Les tanocytes hypothalamiques

Les tanocytes sont des cellules épendymogliales réparties le long du 3^e ventricule dans l'hypothalamus.

La population de tanocytes est hétérogène et est composée de 4 sous types de tanocytes α -1 et 2, β -1 et 2

Les tanocytes sont des cellules polarisées dont les corps cellulaires sont au contact du LCR et les prolongements s'étendent au contact de neurones des noyaux, ou des cellules endothéliales de la BHE ou de l'EM.

Dans l'EM, les corps cellulaires des tanocytes présentent des jonctions serrées et forment une barrière imperméable aux molécules circulantes.

Les tanocytes sont impliqués dans la régulation de la balance énergétique, de la fonction de reproduction et sont impliqués dans la neurogenèse hypothalamique

III. REGULATION DE LA BALANCE ENERGETIQUE

La balance énergétique est régulée de façon fine afin de maintenir constamment une homéostasie énergétique. Deux composantes la définissent, la prise alimentaire et la dépense énergétique comprenant le métabolisme basal, l'activité physique et la thermogénèse. Le maintien de l'équilibre de la balance énergétique est essentiel et son altération peut conduire à un déséquilibre et au développement de désordres métaboliques tels que l'obésité ou encore l'anorexie.

Deux types de régulation de la prise alimentaire sont à distinguer : la régulation à court terme liée à l'ingestion des aliments, et à la digestion qui fait intervenir le noyau du tractus solitaire (NTS), premier relais central de l'information nerveuse acheminée par le nerf vague ; et la régulation à long terme faisant intervenir la sécrétion de nombreuses d'hormones agissant sur le NA (figure 7). J'ai décidé de présenter succinctement les trois principales hormones et nutriments impliqués dans cette régulation.

III.1. LES HORMONES IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DE LA PRISE ALIMENTAIRE

Facteurs diminuant la prise alimentaire

La leptine est une hormone anorexigène de 146 acides aminés, produite principalement par le tissu adipeux. Elle est considérée comme l'une des hormones les plus importantes de la régulation de l'homéostasie énergétique. Un chapitre entier est consacré à sa description (voir Chapitre 2).

L'insuline est une hormone pancréatique de 51 acides aminés qui joue également un rôle central dans la régulation du métabolisme énergétique⁸⁸. De la même façon que la leptine, les taux d'insuline circulant sont proportionnels à la masse du tissu adipeux (figure 7). Cependant, la sécrétion d'insuline est régulée de manière très rapide en fonction des variations métaboliques et peut moduler la sécrétion de la leptine. Elle apparaît ainsi comme un signal reflétant l'interaction entre les processus métaboliques immédiats et le niveau d'adiposité. L'insuline est produite par les cellules β -pancréatiques et joue un rôle dans la régulation du glucose. Elle régule son stockage dans les muscles pour prévenir un excès de glucose dans le sang (hyperglycémie).

L'insuline est également impliquée dans la régulation de la prise alimentaire et une administration directement en ICV induit chez l'animal une diminution de la prise alimentaire et à une perte de poids^{88,89,90}. De façon opposée, la suppression des récepteurs à l'insuline dans l'hypothalamus entraîne une hyperphagie^{91,92}. L'insuline induit son action anorexigène par une activation des neurones

POMC⁹³ et par l'inhibition des neurones NPY/AgRP du NA^{94,95}. Elle agit *via* son récepteur, présent dans l'hypothalamus, pour induire son action⁹⁶ conduisant à l'activation de différentes voies de signalisation dont la voie dépendante de IRS1/PI3K dans le NA et le VMH^{97,96} et peut également moduler la voie ERK dans les neurones du NA.

Facteurs augmentant la prise alimentaire

La ghréline est un peptide orexigène de 28 acides aminés sécrété par l'estomac et le duodénum qui joue également un rôle dans la régulation de la balance énergétique⁹⁸. Cette hormone agit directement sur les neurones NPY/AgRP du NA⁹⁹ par association à son récepteur GHS-R (Growth-hormone-secretagogue receptor)¹⁰⁰ favorisant la prise alimentaire et le stockage des graisses. Sa concentration plasmatique est augmentée dans le cas d'un jeûne pour induire une réponse adaptée au statut énergétique de l'organisme. Chez la souris, une injection de ghréline en ICV entraîne une augmentation de la sensation de faim et conduit à la hausse de la prise alimentaire, de la masse grasse et à une augmentation du poids¹⁰¹.

Dans l'hypothalamus, la ghréline a une action antagoniste à celle de la leptine et de l'insuline. Elle active les neurones orexigènes NPY et AgRP, et inhibe les neurones anorexigènes POMC/CART, conduisant à une augmentation de la prise alimentaire et s'opposant ainsi aux effets de la leptine dans le NA^{39,102}.

La leptine, l'insuline et la ghréline sont les hormones de régulations principales de la balance énergétique. Elles agissent sur les mêmes cibles, les neurones orexigènes NPY/AgRP et anorexigènes POMC du NA, pour induire leurs effets.

III.2. LES NUTRIMENTS

Le glucose

Le glucose représente la source majeure d'énergie dans le SNC et l'initiation de la prise alimentaire dépend de sa concentration plasmatique. Les variations de glucose induisent des modifications de l'activité des neurones présents dans l'hypothalamus (VMH et ALH)¹⁰³. En effet, une hypoglycémie va entraîner une prise alimentaire alors qu'à l'inverse, une hyperglycémie va la réduire. Deux populations neuronales glucosensibles présentent dans l'hypothalamus semblent être impliquées dans cette régulation, les neurones excités ou sensibles (*glucose-responsive*) et ceux inhibés par une augmentation de glucose (*glucose-insensitive*)²⁶. On retrouve des neurones sensibles dans le NA dans

lequel, les neurones à POMC sont excités par le glucose alors que les neurones exprimant le NPY/AgRP sont à la fois activés et inhibés par une augmentation de glucose dans le sang¹⁰⁴. Dans l'hypothalamus, les neurones sensibles au glucose sont également retrouvés dans le VMH et le PVH¹⁰⁵.

Acides gras

Les acides gras circulants sont également informatifs du statut métabolique de l'organisme. Les noyaux hypothalamiques répondent aux acides gras libres qui vont moduler leur activité via leur récepteurs¹⁰⁶. Les neurones sensibles aux acides gras libres sont présents dans le NA, le VMH, le DMH et également le PVH. En effet, une injection d'acide oléique par ICV induit une réduction de l'expression des peptides NPY et AgRP dans le NA et inhibe la prise alimentaire et la production de glucose⁹². De plus, l'inhibition du transport des acides gras libres vers les mitochondries, induit leur accumulation dans le cytosol et à une réduction de la prise alimentaire. L'ensemble suggère que la concentration d'acides gras libres pourrait jouer un rôle de signal de satiété.

Les acides aminés

Contrairement au glucose et aux acides gras, la majorité des acides aminés ne sont pas synthétisés dans notre organisme mais proviennent directement de la nourriture ingérée et jouent un rôle essentiel dans la synthèse protéique.

Une injection par ICV de L-leucine, un acide aminé présentant une chaîne ramifiée, directement dans le 3^e ventricule, induit une suppression de la prise alimentaire par action sur la voie de signalisation de la rapamycine (mTOR)¹⁰⁷. Elle aurait un rôle de facteur satiétogène. En effet, un régime spécifique, sans acides aminés conduit à une prise de poids¹⁰⁸. De plus, il a été montré qu'une forte concentration de L-leucine dans le sang est associée à une obésité et à une résistance à l'insuline¹⁰⁹, faisant des acides aminés ramifiés, un marqueur de prédiction fort des risques associés à l'obésité, comme le diabète de type 2^{110,111}.

Un grand nombre d'acteurs sont impliqués dans la régulation de la balance et vont accéder à l'hypothalamus afin de l'informer du statut énergétique de l'organisme. C'est après intégration des différents signaux, que l'hypothalamus va induire sa réponse par la sécrétion de signaux hormonaux (complexe hypothalamo-hypophysaire) ou nerveux (système nerveux autonome) vers la périphérie.

La balance énergétique

La balance énergétique est définie par l'équilibre entre la prise alimentaire et les dépenses énergétiques (métabolisme basal et activité physique).

Sa régulation implique un grand nombre de facteurs, nerveux et hormonaux qui agissent respectivement à court terme et à long terme.

Les hormones métaboliques telles que la leptine et l'insuline ont un effet anorexigène alors que la ghréline à un effet orexigène.

Les nutriments participent également à la régulation de la prise alimentaire, et le principal acteur est le glucose. La glycémie régule l'activité neuronale du NA.

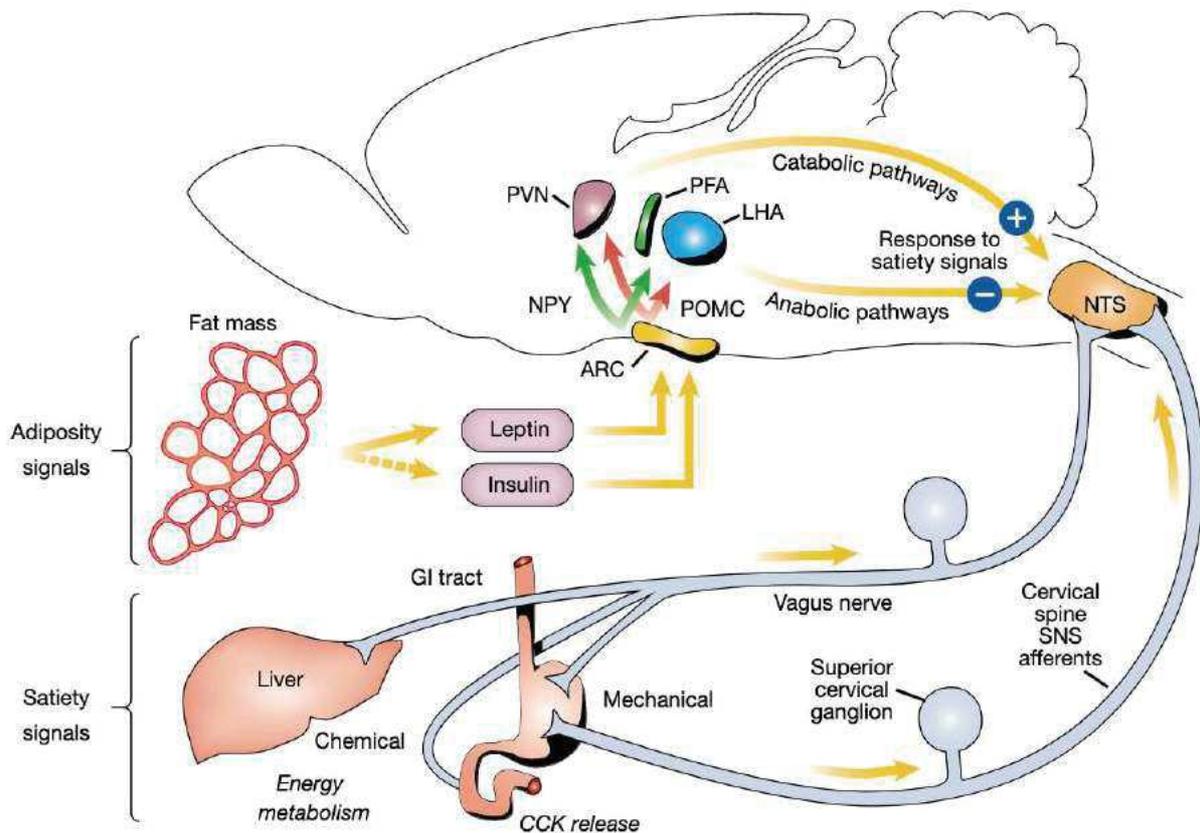


Figure 7 : Circuit de régulation de la balance énergétique. Schéma de représentation des principaux acteurs de la régulation de la balance énergétique. Les facteurs de régulations à court terme tels que la distension de l'estomac et l'activité du tractus intestinal sont acheminés par le nerf vague au NTS qui communique étroitement avec le NA. Les signaux d'adiposité périphériques telles que la leptine et l'insuline participent à la régulation à long terme de la prise alimentaire et vont agir directement au niveau du NA. NTS : noyau du tractus solitaire ; ARC : noyau arqué ; PVN : noyau paraventriculaire ; LHA : aire latérale hypothalamique.

CHAPITRE 2

LA LEPTINE, HORMONE DE LA SATIETE

I. HISTORIQUE

La leptine est une hormone peptidique sécrétée principalement par le tissu adipeux. Elle est connue sous le nom d'hormone de la satiété et agit sur ses cibles en activant son récepteur (Ob-R) afin de réguler l'appétit et le métabolisme énergétique. Elle circule de manière proportionnelle à la quantité de masse grasse corporelle, ce qui en fait un indicateur clé de l'état d'adiposité du corps.

Historiquement, c'est au début des années 1940 que les premières expériences ont permis de mettre en lumière le rôle de l'hypothalamus dans le contrôle de la prise alimentaire ²³. Ces travaux montrant qu'une lésion de l'hypothalamus chez le rat induit un déséquilibre de la balance énergétique constituent le point de départ de la recherche sur le système impliqué dans ce processus de régulation. C'est à la suite de ces expériences, qu'en 1953, Kennedy va émettre l'hypothèse de l'existence d'un facteur circulant capable de réguler la masse adipeuse et qui ferait le lien avec le contrôle central de la prise alimentaire. Il développe alors une théorie selon laquelle le poids de l'individu ne varie pas au cours de la vie, et que ceci est dû à une régulation de la masse adipeuse en lien avec la prise alimentaire ⁴. Un facteur circulant informerait l'hypothalamus de la quantité de masse adipeuse de l'organisme conduisant en retour à une réponse adéquate de régulation de la prise alimentaire et la dépense énergétique ¹¹².

C'est Hervey qui réalise en 1959 les fameuses expériences de parabiose pour l'étude de la prise alimentaire. Ce processus chirurgical consiste à mettre en contact deux rats vivants en suturant ensemble leur péritoine et leurs muscles. La circulation sanguine et les facteurs circulants associés passent alors d'un rat à l'autre. Lors de ces travaux, il réunit la circulation sanguine d'un rat rendu obèse par lésion de l'hypothalamus ventromédian et d'un rat contrôle ¹¹³. Dans ces conditions, le rat contrôle développe une anorexie et une perte de poids importante, alors que le comportement du rat obèse n'est pas modifié. Hervey suggère alors l'existence d'un facteur de satiété circulant chez le rat obèse généré par l'excès de masse grasse, et que l'absence d'effet observée chez le rat est due à la lésion hypothalamique qui rend l'animal insensible au signal. Cette simple expérience a permis de mettre en place les préceptes de la leptine, dont l'étude, quarante-cinq ans plus tard, est toujours d'actualité. Ces observations sont soutenues notamment par la découverte en parallèle de souris génétiquement obèses développées par Jackson Laboratory. La souris « *obese* » (*ob/ob*) et la souris « *diabetes* » (*db/db*) développent une obésité morbide, une hyperphagie, associée à une hyperglycémie et une insulino-résistance ¹¹⁴.

Plus tard, Coleman réalise de nouvelles expériences de parabiose en utilisant ces deux modèles de souris. La parabiose entre souris contrôle et *ob/ob* n'induit pas d'effet sur le comportement des souris contrôle, alors que la prise alimentaire et le poids des souris *ob/ob* sont réduits. La parabiose entre souris contrôle et *db/db* n'a pas d'effet sur la souris *db/db*, mais induit cependant un arrêt de la prise alimentaire chez la souris contrôle qui développe une hypophagie conduisant à sa mort. La parabiose entre les souris *ob/ob* et *db/db* n'induit aucun changement chez la souris *db/db* ; néanmoins la souris *ob/ob* devient hypophagique et meurt. Les résultats obtenus l'amènent alors à conclure que : les souris *db/db* produisent un facteur de satiété, mais sont insensibles à son action, alors que les souris *ob/ob* n'en produisent pas ¹¹⁵.

Il faudra attendre le début des années 1990 pour identifier ce facteur de satiété. C'est alors Friedman qui clone le gène *obèse* chez la souris et chez l'Homme, et qui un an plus tard purifie l'hormone, qu'il appellera leptine (Ob) ^{116,28,117,118}. Puis, c'est le gène *diabetes* qui sera isolé donnant lieu à la découverte du récepteur à la leptine (Ob-R) ¹¹⁹.

II. MODE D'ACTION DE LA LEPTINE

La leptine est une hormone circulante qui est majoritairement sécrétée par le tissu adipeux (blanc et brun). Cependant, même si les adipocytes représentent la principale source de leptine, elle peut également être exprimée par d'autres organes tels que les muscles, le foie et le cerveau. La leptine circule dans le sang de façon proportionnelle à la quantité de masse grasse faisant d'elle un facteur clé d'adiposité.

Au niveau central, la leptine a pour action d'inhiber la prise alimentaire et de favoriser la dépense énergétique par l'interaction avec son récepteur Ob-R présent dans les noyaux de l'hypothalamus. En effet, elle active les neurones anorexigènes (POMC/CART) et inhibe les neurones orexigènes (NPY/AGRP).

II.1. LE RECEPTEUR A LA LEPTINE OB-R

II.1. A – Les isoformes du récepteur Ob-R

Le récepteur à la leptine appartient à la famille des cytokines de classe I, qui comprend d'autres récepteurs tels que le récepteur à l'hormone de croissance GH ou à la prolactine PRL entre autres (Tartaglia et al., 1995). Le gène *diabète* qui code pour Ob-R possède dix-sept exons communs à toutes les isoformes et plusieurs exons alternatifs. Il donne par épissage alternatif, 6 isoformes du récepteur à la leptine allant de Ob-Ra à Ob-Rf. L'ensemble des isoformes partage un domaine de liaison extracellulaire commun mais possède une partie intracellulaire différente permettant de les classer en 3 groupes. Les isoformes courtes, Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Rf (possédant un domaine cytoplasmique court (entre 30 et 40 acides aminés) ; l'isoforme longue (302 Aa) Ob-Rb qui est la seule possédant un long domaine intracellulaire capable d'induire des voies de signalisation (115) et l'isoforme soluble Ob-Re qui ne possède ni le domaine transmembranaire, ni le domaine intracellulaire¹²⁰.

Le domaine extracellulaire de toutes les isoformes est identique et se compose de 6 domaines distincts (figure 8) : un domaine N-terminal (NTD), deux domaines aux cytokines CRH (CRH1 et CRH2), un domaine immunoglobulin-like domain (Ig) et deux domaines fibronectin III (FNIII) proches du domaine transmembranaire^{121 122}. Le domaine CRH2 est le site de liaison de la leptine et les domaines FNIII et Ig participent à l'activation du récepteur¹²³.

Concernant l'expression des isoformes, les formes courtes d'Ob-R (a, c, d, f) sont ubiquitaires. Il est notamment intéressant de noter que Ob-Ra est exprimé dans le plexus choroïde et jouerait un rôle dans le transport de la leptine à travers les barrières biologiques¹²⁴. La forme soluble Ob-Re est circulante et est impliquée dans le transport d'une partie de la leptine. Ob-Re permet notamment de réguler la proportion de leptine libre dans le sang et contrôlerait donc son action biologique¹²⁵. Ob-Rb est retrouvé principalement dans les noyaux de l'hypothalamus tel que le NA, le VMN, le DMN et le ALH responsables de la régulation de la balance énergétique³³¹²⁶. Cependant, il est également exprimé dans différents organes comme le poumon, le foie, le rein, et le muscle⁴⁰.

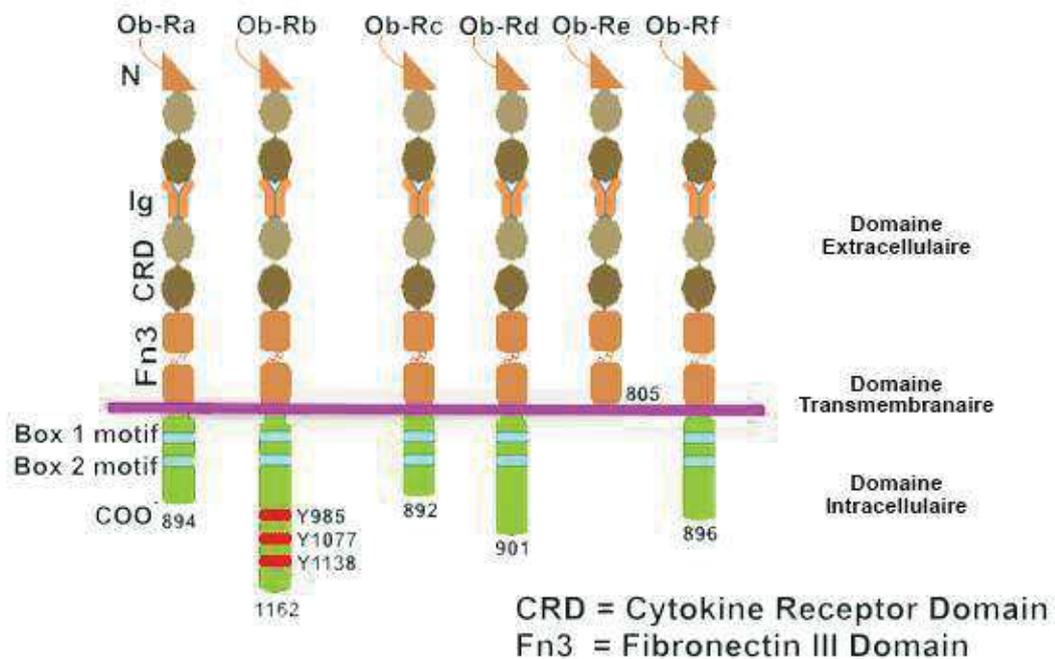


Figure 8 : Représentation des différents isoformes du récepteur à la leptine Ob-R. Toutes les isoformes présentent une partie extracellulaire identique, avec 1 domaine N-terminal, 2 domaines aux cytokines (CRH1 et CRH2), 1 site immunoglobuline (Ig), 2 domaines Fibronectine III (Fn3), et 1 domaine transmembranaire (sauf pour Ob-Re). On connaît 4 isoformes courtes (Ob-Ra, c, d), 1 isoforme soluble Ob-Re et 1 isoforme longue Ob-Rb. L'isoforme Ob-Rb possède une partie intracellulaire active, avec 3 tyrosines phosphorylables (Y985, Y1077, Y1138) pour le recrutement des protéines impliquées dans la transduction du signal de la leptine. *Adapté de Alti et al., 2018*

III.1. B - Expression du récepteur à la leptine

L'identification des souris obèses *ob/ob* et *db/db* dans les années 1950 constitue la première étape vers la découverte du système leptine/Ob-R.

L'expression des récepteurs à la leptine est variable en fonction des régions cérébrales et la fixation de la leptine à son récepteur contrôle divers processus physiologiques comme la prise alimentaire, les systèmes neuroendocrines, les fonctions autonomes, et la balance du glucose et de l'insuline^{122,127,128,6}. L'état énergétique de l'organisme peut être un facteur de régulation et faire varier l'expression du récepteur à la leptine. En effet, un jeûn ou une restriction alimentaire va entraîner une augmentation des niveaux d'ARNm d'Ob-R dans l'hypothalamus^{129,130}.

Le noyau arqué est une région clé pour l'action de la leptine et la régulation de l'homéostasie énergétique. Cette région est d'ailleurs riche en récepteurs à la leptine chez la souris et le rat ¹³¹ et une injection de leptine directement dans le 3^e ventricule suffit à induire une diminution de la prise alimentaire ¹³². Une restauration des récepteurs chez les souris db/db conduit à une réduction à long terme de la prise alimentaire et du poids corporel ¹³³ et pour les rats Koletsky fak/fak, déficients en récepteurs à la leptine une thérapie génique directement dans le noyau arqué, permet d'atténuer le phénotype obèse des animaux

II.2. LA SIGNALISATION OB-RB

La forme longue du récepteur à la leptine (Ob-Rb) est importante pour la signalisation de la leptine puisqu'elle contribue à l'activation des voies de transduction associées. Ob-Rb est très exprimé dans les neurones du NA qui expriment le NPY¹²⁹ et POMC. Dans un modèle de souris déficiente en récepteurs Ob-Rb, sa réexpression spécifiquement dans les neurones à POMC entraîne une baisse de poids et une restauration de la sensibilité à l'insuline. Ceci laisse à penser que la partie intracellulaire du récepteur Ob-Rb participe à l'action de la leptine notamment dans la régulation du métabolisme énergétique.

Comme d'autres récepteurs aux cytokines, Ob-R ne possède pas d'activité enzymatique (kinase) intrinsèque et induit son action par l'intermédiaire de protéines à activité tyrosine kinase, les Janus kinase 2 (JAK2) (Figure 9).

La première étape dans l'activation du récepteur est la fixation de la leptine sur la partie extracellulaire CRH2 d'Ob-Rb qui entraîne un changement de conformation et une oligomérisation, tous les deux nécessaires à son activation et à la transduction du signal.

II.2. A – La voie JAK/STAT

L'oligomérisation du récepteur Ob-R entraîne, par changement de conformation, l'activation de la protéine JAK2. Elle fait partie de la famille des Janus kinases qui comprend 4 membres (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) et qui sont associés aux récepteurs de cytokines. Après activation, JAK2 phosphoryle trois résidus Tyrosine, Y⁹⁸⁵, Y¹⁰⁷⁷ et Y¹¹³⁸ du domaine intracellulaire induisant le recrutement de protéines spécifiques possédant le domaine SH2, pour *Src Homology 2*. Le facteur de transcription STAT3, qui est recruté au motif Y¹¹³⁸, fait partie de la famille des protéines STAT qui comptent 7 membres et qui sont

activés par les cytokines¹³⁴. Une fois activé par phosphorylation, STAT3 sous forme de dimère est transloqué jusqu'au noyau afin d'initier la transcription et de moduler l'expression des gènes cibles comme SOCS3 (Suppressor of cytokine signaling 3) qui agit comme régulateur négatif de la voie JAK/STAT en formant une boucle de rétrocontrôle négatif¹³⁵. Un autre facteur de la même famille STAT5 est recruté au motif Y¹⁰⁷⁷ et activé par JAK2.

La voie STAT3 permet de réguler les gènes impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et d'induire l'effet anorexigène de la leptine. En effet, STAT3 va inhiber l'expression de NPY/AgRP et va assurer par l'activation de POMC/CART l'augmentation de la dépense énergétique. Par l'utilisation d'un modèle de souris n'exprimant plus STAT3 spécifiquement dans les neurones, des études ont montré, la mise en place d'une obésité suggérant ainsi son implication dans l'inhibition de la prise alimentaire induite par l'action de la leptine^{136,137}.

II.2. B – La voie MAPK

La voie MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) joue un rôle dans l'homéostasie énergétique. La famille des protéines MAPK se compose de 12 kinases, formant une importante cascade de signalisation. Comme présenté précédemment, le récepteur Ob-Rb possède 3 motifs tyrosine, et c'est au niveau du dernier motif Y⁹⁸⁵ que la protéine SHP2 ou PTPN (*protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11*) est recrutée puis phosphorylée par JAK2¹³⁸. L'activation de SHP2 est essentielle puisqu'elle va, à son tour recruter Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*)¹³⁹, qui va activer les MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) dont MEK1/2 qui va activer ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*)^{135,140} (figure 9) et induire sa translocation dans le noyau pour réguler l'expression des gènes tels que *c-fos* et *rgr-1* impliqués dans la prolifération cellulaire.

La suppression de SHP2 dans les neurones ou encore l'inhibition dans l'hypothalamus de ERK1/2 empêche l'action de la leptine^{140,141}. Ces études ont permis de mettre en évidence l'implication de la voie MAPK dans le contrôle de l'homéostasie énergétique.

II.2. C – La voie PI3K-Akt

La voie PI3K (*phosphatidylinositol 3-OH kinase*) n'est pas activée directement par l'activation du récepteur Ob-Rb. En effet, son activation résulte de son association avec d'autres récepteurs,

notamment le récepteur à l'insuline (IR). La voie PI3K est impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire¹⁴².

Les premières étapes d'activation de la voie PI3K font intervenir les protéines substrats IRS (*insulin receptor substrate*). Elles peuvent être recrutées par la protéine adaptatrice SH2B1, qui régule l'activité de JAK2. Une fois actives, les protéines IRS1/2 vont interagir avec la sous-unité régulatrice p85 de la PI3K,¹⁴³ provoquant l'augmentation de l'activité de la sous-unité catalytique p110 de la PI3K. La PI3K activée phosphoryle les *inositol phosphates* localisés à la membrane plasmique pour produire le PIP3 (Phosphoinositol(3,4,5)Phosphate 3) qui s'accumule (figure 9). Le PIP3 sert de substrat à la PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase 1) qui séquentiellement active les PKC (*Protein kinase C*) et Akt (*Protein Kinase B*), et conduit à une inhibition du facteur de transcription Foxo1. La voie PI3K participe à la transduction du signal de la leptine et induit son effet anorexigène¹⁴⁴. Cependant, quand Foxo1 est activé, il devient antagoniste de STAT3, stimule l'expression de AgRP et NPY et supprime la transcription de POMC dans les différents neurones¹⁴⁵. De plus, sa suppression spécifiquement dans les neurones AgRP de souris conduit à une diminution de la prise alimentaire et à une meilleure sensibilité à la leptine¹⁴⁶ montrant son effet orexigène.

L'ensemble des voies de signalisation induites par la leptine et dépendante de l'activité du récepteur Ob-Rb sont cruciales dans la régulation de la balance énergétique. Les acteurs de la signalisation sont nombreux et une altération de leur fonction dans la voie de transduction peut induire des dérèglements dans le contrôle du métabolisme énergétique pouvant conduire à l'obésité.

Récepteur Ob-R et signalisation

La leptine induit son action grâce à son récepteur Ob-R. On connaît 6 isoformes du récepteurs, dont 4 formes courtes (Ob-R a,c,d,f), 1 forme longue Ob-Rb et une forme soluble Ob-Re.

Les deux formes Ob-Ra et Ob-Rb sont exprimées dans l'hypothalamus.

La leptine via l'activation de son récepteur Ob-Rb active les voies de signalisation Jak-STAT ; Pi3K-Akt ; la voie des MAPK (ERK) participant à la régulation du métabolisme.

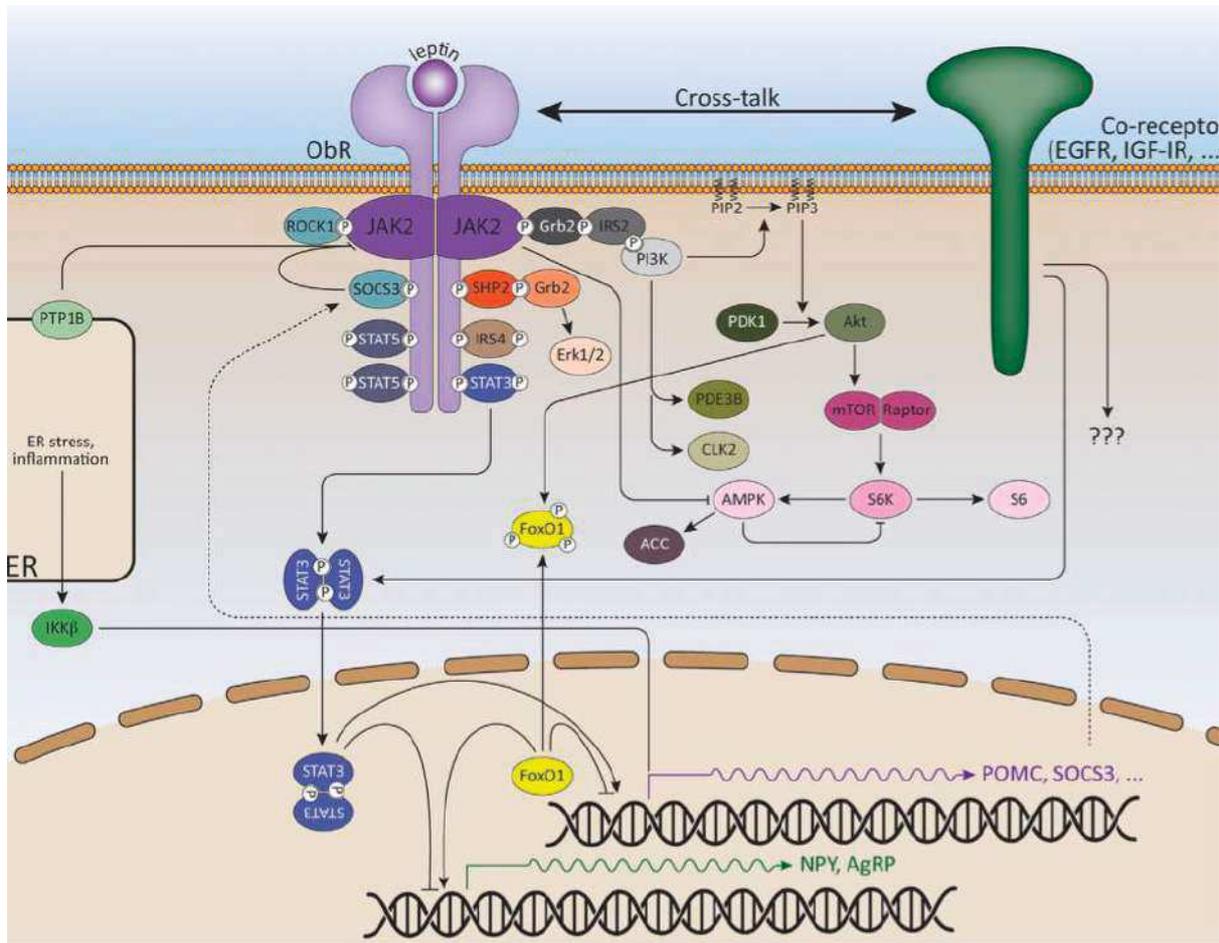


Figure 9 : Voies de signalisation activées par le récepteur Ob-Rb. Après fixation de la leptine sur le récepteur Ob-Rb et oligomérisation, la protéine Jak2 est recrutée et activée. Par phosphorylation des 3 résidus Tyrosine, Y⁹⁸⁵, Y¹⁰⁷⁷ et Y¹¹³⁸ situés sur la queue cytoplasmique du récepteur, Jak2 va conduire au recrutement et l'activation d'une succession de molécules de signalisation impliquées dans différentes voies. STAT3 est recruté au niveau de la tyrosine Y¹¹³⁸ et activé par phosphorylation, il va ensuite se dimériser et être transloqué dans le noyau pour inhiber l'expression du NPY et favoriser l'expression de POMC. La voie MAPK est activée par recrutement de la protéine SHP2 sur la tyrosine Y⁹⁸⁵ qui va recruter à son tour Grb2 et induire la cascade des MAPK jusqu'à activation de ERK1/2. Jak2 va également activer la voie Pi3K-Akt par recrutement de Grb2, et IRS2 et interaction avec les inositols phosphates localisés à la membrane plasmatique. Issu de *Wauman et al., 2017*

III. LEPTINE ET OBESITE

III.1. L'OBESITE

L'obésité est une pathologie chronique devenue un fléau mondial qui touche 13% des adultes dans le monde en 2019. Les origines de cette maladie sont multiples et impliquent un grand nombre de facteurs pas tous identifiés. Le développement de l'obésité dans notre société moderne est incontestablement influencé par notre comportement alimentaire et bien souvent causé par une alimentation trop riche associée à un manque d'activité physique, ce qui conduit à la dérégulation de la balance énergétique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'obésité se définit par un excès de masse grasse et un indice de masse corporelle (IMC) supérieur ou égal à 30 kg/m². Elle est souvent associée à d'autres pathologies métaboliques, tels que le diabète de type 2 ou des maladies cardiovasculaires¹⁴⁷.

Une des caractéristique principale observée chez des patients obèses est le taux élevé de leptine plasmatique en corrélation avec la quantité de masse adipeuse. Néanmoins, la leptine n'induit plus son effet anorexigène au niveau central définissant un état de résistance à la leptine. Il existe beaucoup d'acteurs et de processus impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique et aujourd'hui la mise en place d'une telle résistance soulève encore de nombreuses questions.

IV.2. MISE EN PLACE DE LA RESISTANCE A LA LEPTINE

Plusieurs mécanismes ont été identifiés comme possibles acteurs de la mise en place de la résistance centrale à la leptine. Parmi ces acteurs, le récepteur à la leptine Ob-Rb et sa signalisation intracellulaire ainsi que le transport de la leptine à travers la BHE et la barrière hémato-encéphalique de l'EM¹⁴⁸.

III.2. A – Le défaut de signalisation Ob-Rb

L'observation d'une altération des voies de signalisation associées au récepteur Ob-Rb dans les différentes populations neuronales de l'hypothalamus a soulevé l'hypothèse de l'implication de l'activité d'Ob-R dans la mise en place de la résistance centrale à la leptine. En effet, son activité module l'expression de régulateurs négatifs ou positifs de la signalisation Ob-R.

Les membres de la famille SOCS, sont des régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT et sont stimulés par l'action de la leptine sur son récepteur. Une fois activé, SOCS3 (suppressor of cytokine signaling-3) va induire un rétrocontrôle négatif sur la signalisation induite par Ob-Rb pour empêcher une sur-activation de la voie. SOCS3 interagit avec JAK2 pour inhiber son activité ¹⁴⁹. Il a été rapporté que chez les souris résistantes à la leptine, SOCS3 est significativement augmenté en comparaison aux souris contrôles suggérant que son expression contribue à la mise en place de la résistance à la leptine ¹⁵⁰ (Münzberg et al., 2004). Or, chez la souris obèse, une délétion spécifique de SOCS3 dans les neurones améliore la sensibilité à la leptine et conduit à une perte de poids ¹⁵¹ confirmant son rôle dans ce processus.

Le second régulateur négatif de la voie induite par Ob-R est la protéine PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B) qui est notamment exprimée dans le NA, le VMH ou le DMH. Elle interagit avec JAK2 non phosphorylé et contribue à inhiber la signalisation de la leptine. PTP1B est également surexprimée chez les souris obèses ¹⁵² et sa suppression dans les neurones améliore la réponse à la leptine et est associée à une diminution de stockage de la masse grasse. Ces études suggèrent l'implication de ces deux régulateurs négatifs dans la résistance à la leptine.

Récemment, des études ont montré l'implication des métalloprotéases matricielles (MMPs), une famille d'enzymes qui joue un rôle dans la migration et l'adhésion cellulaire, le remodelage vasculaire mais également dans l'obésité. En effet, l'obésité induit à une augmentation de la sécrétion de la matrix metalloproteinases-2 (Mmp2) dans l'hypothalamus, responsable du clivage de la partie extracellulaire d'Ob-R. Ainsi, ces mécanismes conduisent à une inhibition de la signalisation de la leptine ¹⁵³ contribuant à la mise en place de la résistance à la leptine chez les souris.

III.2. C – Le défaut de transport de la leptine de la périphérie vers le cerveau

L'acheminement de la leptine jusqu'au cerveau se fait par la circulation sanguine. En effet, la leptine est transportée dans le sang sous deux formes, la forme libre dite « active », et la forme associée en complexe avec son récepteur soluble Ob-Re.

Or, dans le cas de l'obésité, le taux de leptine libre circulante est plus important que la « normale » et ce de manière chronique ¹⁵⁴. Cependant, il est important de noter que, même si la quantité de leptine dans le LCR est élevé chez les obèses, le ratio de leptine LCR/plasma, indique que la leptine circulante n'est pas correctement acheminée dans le LCR en comparaison à un sujet sain ¹⁵⁵. Cette observation a soulevé l'hypothèse d'un défaut de transport de la leptine entre le sang et le

cerveau. De plus, chez la souris rendue obèse par un régime gras ou DIO (*diet-induced obesity*) une injection de leptine par intraveineuse n'entraîne pas d'augmentation de quantité de leptine dans le LCR et aucune action centrale^{156, 51}. Le transport de la leptine semble donc jouer un rôle central dans la mise en place de la résistance à la leptine.

Transport à travers la BHE

Au sein de la BHE, la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales conduit à un transport des molécules par transporteurs. Ce transport sélectif constitue un système saturable et un taux élevé de leptine pourrait affecter leur activité et leur régulation, altérant ainsi le métabolisme dans son ensemble. Plusieurs études ont montré que le transport de la leptine à travers la BHE est altéré dans le cas de l'obésité. Ceci peut s'expliquer notamment par une modification de l'intégrité de la barrière, pouvant être associée à une réduction du nombre de transporteurs de la leptine au niveau de la BHE¹⁵⁷. Cependant, de récents travaux remettent en question l'implication de l'altération du transport par la BHE dans la mise en place de la résistance à la leptine, et indiquent notamment que la cinétique de transport de la leptine à travers la BHE n'est pas modifiée chez les DIO¹⁵⁸. De plus, une étude réalisée en 2019 montre par reconstruction de cerveau de souris DIO (microscopie à feuilles de lumière), que la BHE est intègre et que l'accumulation de leptine dans les différentes zones du cerveau est la même qu'avec les souris contrôle¹⁵⁹.

Au regard de ces données, les mécanismes par lesquels la résistance à la leptine se mettent en place restent questionnés et pas encore bien compris. L'implication de différentes étapes dans le développement de la résistance à la leptine ainsi que les nombreux acteurs associés pourrait expliquer les divergences de ces études.

Transport à travers les tanocytes de l'EM

La leptine circulante peut atteindre l'hypothalamus par un transport à travers la BHE mais elle peut également entrer dans cerveau au niveau de l'éminence médiane constituée de vaisseaux fenêtrés^{49,51}. A ce niveau, les cellules endothéliales ne présentent pas de jonctions serrées, et sont donc hautement perméables aux molécules¹⁶⁰. La barrière étanche protectrice est formée par les tanocytes présents dans l'EM qui régule le transport sélectif d'hormone telle que la leptine ou la ghréline vers le LCR^{73, 72}. En effet, les tanocytes vont capter la leptine au niveau de leur prolongement et l'acheminer par transcytose jusqu'au corps cellulaire ou elle est ensuite libérée pour atteindre le NA. Or, chez la souris DIO, ce transport est perturbé^{72, 62}. Le transport de la leptine par les tanocytes est dépendant de

la voie de signalisation ERK, et un traitement des souris avec un facteur de croissance, l'EGF (*Epidermal growth factor*) a permis de restaurer ce transport et d'induire chez les souris une perte de poids. Ces résultats suggèrent un rôle du transport de la leptine par les tanocytes dans le contrôle du métabolisme énergétique⁷² bien qu'il soit discuté actuellement. En effet, une étude récente a montré que l'action de la leptine sur le NA ne serait pas régulée par son transport dans les tanocytes de l'EM¹⁶¹. Ces travaux seront discutés plus tard dans ce manuscrit.

L'altération du transport de la leptine au travers des tanocytes pourrait constituer un des mécanismes sous-jacents au développement de la résistance à la leptine^{137,62}. Mieux le comprendre et en découvrir les acteurs semble donc essentiel pour ouvrir la recherche éventuelle de nouvelles cibles thérapeutiques.

Obésité et résistance à la leptine

L'obésité est une maladie chronique, elle se définit par une accumulation en excès de masse grasse et conduit au développement d'autres maladies métaboliques dont le diabète de type 2.

L'état de résistance à la leptine se traduit par un excès de leptine circulante, qui n'induit plus ses effets physiologiques.

Plusieurs hypothèses ont été émises pour l'expliquer :

Un défaut de signalisation du récepteur Ob-Rb pourrait être impliqué dans le développement de l'obésité.

Un défaut de transport de la leptine à travers la BHE et/ou les tanocytes de l'EM pourrait être à la base de la mise en place de la résistance à la leptine.

CHAPITRE 3

LE TRANSPORT INTRACELLULAIRE DU RECEPTEUR A LA LEPTINE

I. VOIE D'ENDOCYTOSE DEPENDANTE DE LA CLATHRINE

L'endocytose est un processus par lequel les cellules vont internaliser des molécules et les transporter vers différentes destinations intracellulaires qui vont permettre le renouvellement des composants de la membrane plasmique ou leur dégradation. Ces mécanismes d'endocytose ont été classés en différentes voies selon les acteurs impliqués : la voie dépendante de la clathrine, la voie indépendante de la clathrine mais dépendante des cavéoles, et des voies indépendantes des deux premières ^{162, 163, 164}.

Historiquement, la voie d'endocytose dépendante de la clathrine a été une des premières voies identifiée et caractérisée ¹⁶⁵. Dans cette voie, les molécules de clathrine s'agencent en complexe multimoléculaire pour former des puits recouverts de clathrine. La formation de ces vésicules requiert l'action concertée de nombreuses protéines dont les principales sont l'adaptateur AP-2, les triskèles de clathrine, la dynamine et de nombreuses protéines dites accessoires ayant des fonctions diverses. Des années d'étude sur ce mécanisme ont permis de dresser un schéma spatial et temporel précis des acteurs qui interviennent notamment dans l'endocytose de récepteurs transmembranaires ¹⁶³.

I.1. COMPOSITION DES VESICULES A CLATHRINE

I.1. A - La clathrine

La clathrine représente le composant majeur de structure des vésicules. Découverte à la fin des années 1970, c'est Pearse qui la caractérise et lui donne le nom de clathrine ¹⁶⁶. La clathrine se compose de 3 chaînes lourdes (~190 kDa) chacune associée à une chaîne légère (~25 kDa), formant un « triskèle » (figure 10, A) ¹⁶⁷. C'est grâce à cette organisation et leur capacité à s'auto-assembler par polymérisation que les triskèles vont former des cages autour des vésicules (figure 10 A et B), autrement appelés manteau de clathrine. Comme la clathrine n'a pas la capacité de se lier directement à la membrane plasmique, ce processus se fait par recrutement d'autres protéines partenaires.

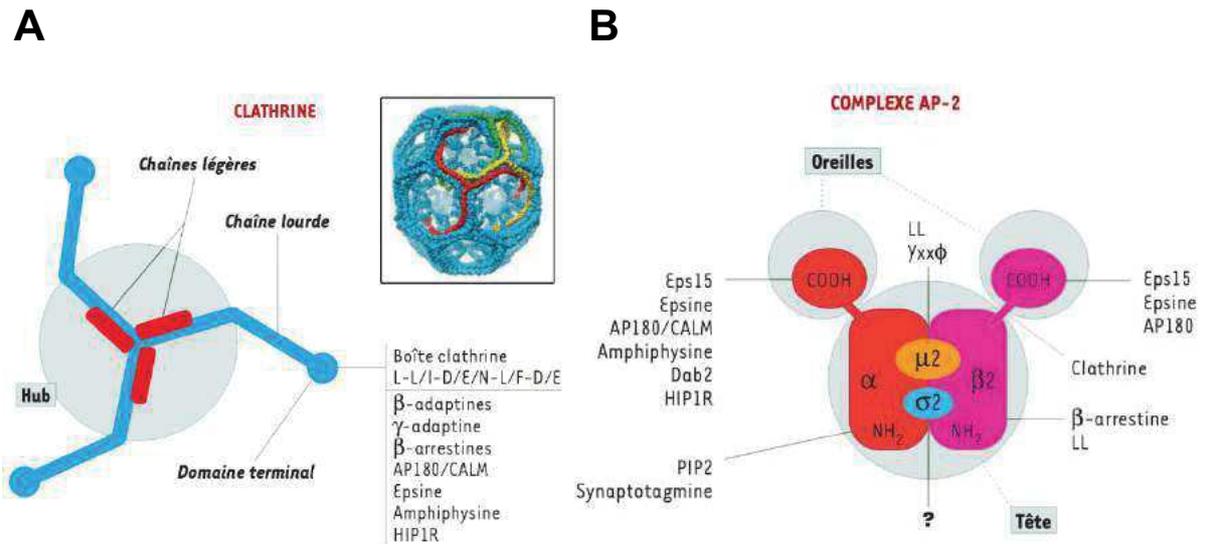


Figure 10 : Structure de la clathrine et du complexe AP-2. A) Représentation schématique des 3 chaînes lourdes de clathrine associées aux 3 chaînes légères formant un « triskèle ». Le domaine N-terminal de la chaîne lourde peut s'associer avec de nombreuses protéines telles que les β-adaptine, l'epsine, ou β-arrestines et le *Hub*, représente le second domaine fonctionnel jouant un rôle dans la polymérisation du triskèle qui forme les « cages » de clathrine. B) Schéma structural du complexe AP-2, possédant 2 oreilles et une tête de « Mickey ». Il se compose de 4 sous-unités (α et β-adaptines, μ2 et σ2) capables d'interagir avec diverses protéines (epsine-15, clathrine, ou β-arrestine). *Adaptée de Benmerah and Lamaze, 2002 ; Fotin et al. 2004*

I.1. B - Les adaptateurs (AP)

Les complexes AP, pour *assembly proteins*, sont caractérisés comme des facteurs essentiels permettant de former les « triskèles » de clathrine. La famille regroupe 4 protéines, allant de AP-1 à AP-4, distribuées différemment dans la cellule et présentant des sous-unités variables. En effet, la sous-unité β est associée à une sous-unité γ pour AP-1 - α pour AP-2 - δ pour AP-3 et ε pour AP-4 ; on trouve également une sous-unité intermédiaire μ et une petite sous-unité ζ. Cependant, une structure ressemblant à une « tête de Mickey », avec deux oreilles et une large tête reste commune à toutes ces protéines ^{168,169}.

L'adaptateur AP-2 se lie à la membrane plasmique en reconnaissant un phospholipide, le phosphoinositol-4,5 bisphosphate (PI(4,5)P₂ ou PIP₂), et également à certains récepteurs transmembranaires, entraînant leur recrutement dans la voie d'endocytose par clathrine. Structurellement, les complexes AP-2 sont donc constitués de 4 chaînes dont deux lourdes, α et β 2-adaptines (100 kDa), et deux plus petites chaînes, μ 2 (50 kDa) et σ 2 (17 kDa). Chacune des chaînes peut avoir des interactions avec d'autres protéines de la voie d'endocytose tels que la clathrine, l'epsine 15 et/ou des lipides membranaires.

I.1. C – L'Epsine

L'epsine est une famille de protéine adaptatrice, elles sont impliquées dans l'endocytose dépendante de la clathrine et interagissent avec AP-2 et le « *hub* » de la clathrine. Elle va notamment avoir un rôle de régulateur de l'association de ces protéines entre elles et va donc moduler la formation des vésicules de clathrine. L'epsine interagit avec trois acteurs principaux, que sont le PIP₂, AP-2 et la clathrine. En effet, AP-2 est constitutivement associée à l'epsine 15 et l'intersectine (domaine NPF)¹⁷⁰ et l'utilisation d'un mutant dominant négatif de l'epsine 15, empêche le recrutement de la protéine AP-2 et donc de la clathrine qui n'est pas recrutée autour de la vésicule. Par conséquent la formation du manteau de clathrine est abrogée^{171,172}.

I.1. D - La dynamine

En 1989, la dynamine, une protéine à activité GTPase a été découverte¹⁷³. Dans la famille, on dénombre trois dynamines, allant de 1 à 3 et exprimées différemment dans l'organisme. La dynamine-1 est retrouvée majoritairement dans les neurones¹⁷⁴, la dynamine 2 est ubiquitaire¹⁷⁵ et la dynamine 3 est exprimée dans les testicules¹⁷⁶. La dynamine intervient dans plusieurs voies d'endocytose dont la voie dépendante de la clathrine et est impliquée dans les phénomènes de fission membranaire¹⁷⁷. C'est notamment par la capacité de cette protéine à s'assembler en polymère contractile hélicoïdal autour du « cou » de la vésicule, qu'elle est capable d'induire la scission de la vésicule conduisant à son détachement de la membrane plasmique.

1.2. FORMATION DES VÉSICULES A CLATHRINE

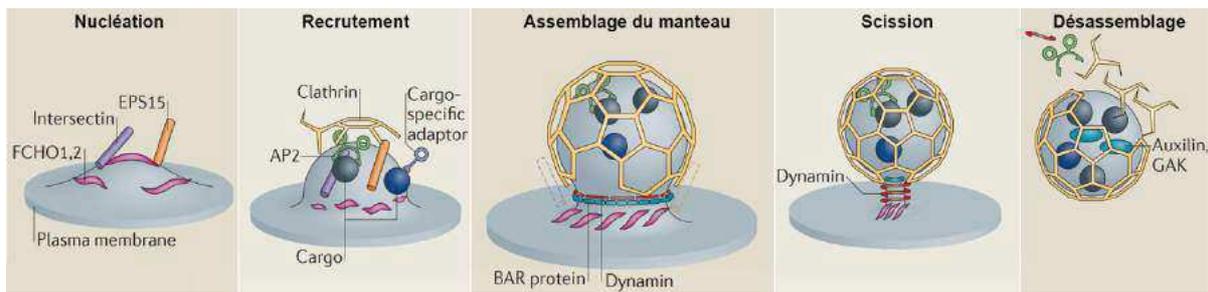
Lors de la formation des vésicules de clathrine, différentes étapes sont observées faisant intervenir pléthore de protéines dont notamment celles citées ci-dessus. On peut notamment les diviser en 5 grandes étapes, soit l'initiation, le recrutement, l'assemblage et le bourgeonnement, la scission et enfin le détachement de la membrane plasmique (figure 11, A) ¹⁶².

Lors de la première étape de la formation des puits de clathrine, la protéine AP-2 est recrutée au niveau de la membrane plasmique. Cela implique la présence de protéines FCHO (*FCH domain only*) qui se lient sur les zones de la membrane plasmique riches en lipides Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI(4,5)P₂) ¹⁷⁸, et recrute l'epsine 15 (*EGFR pathway substrate 15*) et les intersectines ¹⁷⁹ qui vont initier ce processus. Une fois recrutée, AP-2 va interagir avec différentes protéines, tels que les récepteurs transmembranaires pour lesquels elle reconnaît des motifs endocytiques, les sous-unités μ et σ . Cette étape permet ensuite le recrutement à la membrane des molécules de clathrine associées à AP-2, et la polymérisation des triskèles de clathrine qui conduit à la déformation de la membrane plasmique et permet son invagination. Le bourgeonnement du puit de clathrine nouvellement formé et recouvert d'un manteau, appelé CPP (*clathrin coat pit*), est reconnaissable en microscopie électronique car il est dense en électrons et mesure 100 à 150 nm ¹⁶³ (figure 11, B).

Lorsque le CPP est formé, l'endophiline va faciliter le recrutement de la mécano-enzyme dynamine qui va se fixer à la base du CCP, précisément au niveau du « cou », et par hydrolyse de GTP, elle va se polymériser, changer de conformation et se transformer en twister. Cette étape importante va induire scission de la vésicule et donner naissance à une nouvelle vésicule à clathrine ¹⁶⁸. Après son détachement de la membrane plasmique la vésicule va rapidement perdre son manteau de clathrine. Ce processus de désassemblage fait intervenir la protéine auxiline, qui recrute la protéine chaperonne Hsc70 ¹⁸⁰ par une réaction ATPase dépendante conduisant à la dépolymérisation du manteau de clathrine (figure 11, A) ¹⁸¹. La vésicule « nue » continue alors son chemin vers les endosomes précoces, et les composants de la machinerie de la clathrine sont libérés pour un nouveau cycle.

Il existe également d'autres voies d'endocytose indépendantes des vésicules de clathrine. On peut notamment citer la voie dépendante des vésicules de cavéolines, formées à partir de microdomaines, appelés « radeaux lipidiques », ou s'invagine la membrane. La voie d'endocytose par cavéoles est également impliquée dans l'internalisation de complexe hormone/récepteur au cours du processus de transcytose dans les vaisseaux sanguins ¹⁸². En effet, elle régule l'endocytose, la transcytose et la signalisation dans les microdomaines lipidiques de la BHE ¹⁸³.

A



B

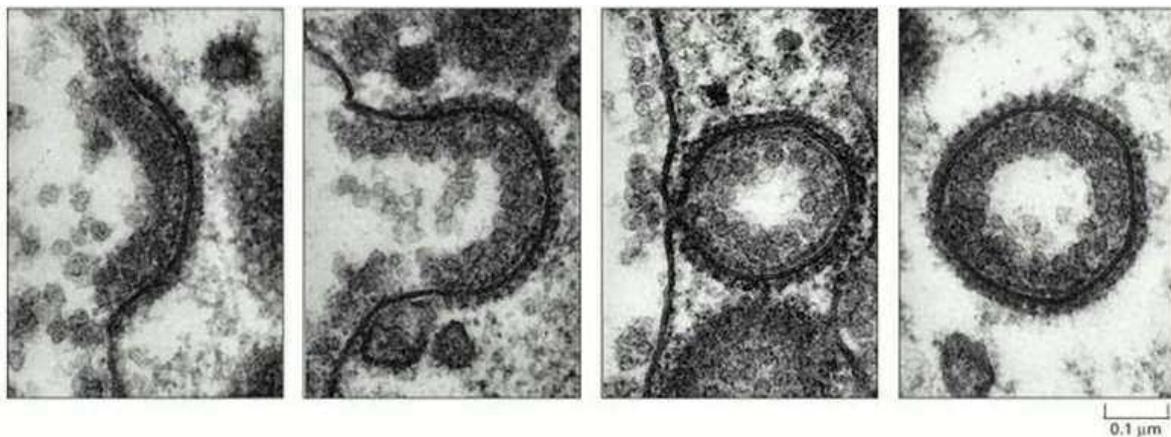


Figure 11 : Processus de formation d'une vésicule à clathrine. **A)** Schéma des différentes étapes de formation de la vésicule de clathrine. Lors de la nucléation, les protéines FCHO se lient sur les zones de la membrane plasmique riches en lipides Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ($PI(4,5)P_2$), recrutent l'epsine 15 et les intersectines. L'adaptateur AP-2 est recruté et se lie à la membrane plasmique en reconnaissant le lipide $PI(4,5)P_2$ et certains récepteurs transmembranaires. Les triskèles de clathrine (jaune) ne peuvent pas lier directement la membrane plasmique et sont donc recrutés par l'intermédiaire d'AP2 ou d'autres adaptateurs. La polymérisation du manteau de clathrine après assemblage induit la déformation de la membrane plasmique et la formation d'un puits recouvert de clathrine. C'est lors de l'étape de scission que la dynamine se polymérise au cou de la vésicule naissante et, par hydrolyse de GTP, induit le détachement de la vésicule de la membrane plasmique. Après libération de la vésicule, le manteau de clathrine est dépolymérisé, par l'action des protéines auxillines ou GAK (*Cyclin G-associated kinase*). La vésicule continue alors son chemin en route vers les endosomes précoces, et les composants de la machinerie de la clathrine sont libérés pour un nouveau cycle. **B)** Formation des vésicules à clathrine en microscopie électronique. *Adapté de MacMahon and Boucrot, 2011 ; Perry and Gilbert, 1979.*

Formation des vésicules et voie de la clathrine

Les vésicules de clathrine sont principalement composées de clathrine organisée en triskèles permettant la déformation de la membrane plasmique.

La formation des CCP nécessite le recrutement des protéines adaptatrices AP-2, elles-mêmes recrutées par l'epsine 15 et les intersectines.

La dynamine, permet la scission membranaire et le détachement de la vésicule de la membrane plasmique.

D'autres voies d'endocytose indépendante de la clathrine existent et les cavéoles peuvent être impliquées dans l'endocytose de récepteurs/ligand.

I.2. B – Les compartiments intracellulaires

Une fois endocytées, les vésicules nouvellement formées vont entrer dans la voie de trafic endosomal. Cette étape va déterminer le sort des cargos, qui seront dirigés soit vers la voie de dégradation, soit vers la voie de recyclage. De nombreux compartiments ont été décrits, et je vais résumer les principales voies en me limitant à l'essentiel.

Les endosomes précoces

Les endosomes précoces sont les points de distribution communs après le processus d'endocytose¹³⁷. En effet, les vésicules issues de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et de la voie d'endocytose dépendante des cavéoles convergent vers l'endosomes précoces pour délivrer leur contenu¹⁸⁴. Les endosomes précoces sont très hétérogènes en termes de morphologie et possèdent une forte capacité de fusion, qui conduit à l'augmentation de leur taille. Décrit pour la première fois en 1980, les endosomes précoces présentent une forme tubulaire, tubulo-vésiculaire ou encore en citerne¹⁸⁵.

Les endosomes précoces, constituent le compartiment dans lequel s'effectuera un tri des protéines vers la voie de la dégradation ou celle du recyclage (figure 12). Les protéines et ligands destinés à être recyclés, dont l'exemple principal est la transferrine, se concentrent dans la partie tubulaire de l'endosome précoce qui se détache pour donner les endosomes de recyclage^{186,187}. En revanche, les protéines qui portent un signal positif de dégradation, tel que le récepteur à l'EGF (EGFR), vont au contraire s'accumuler dans la partie de l'endosome précoce qui, après maturation donne un endosome tardif^{188,189}. Cet endosome à son tour va devenir mature, et former le lysosome ou fusionner avec un lysosome préexistant pour réaliser la dégradation du cargo.

Les principaux acteurs de cette maturation sont les protéines Rab, des protéines de la famille des GTPase Ras-like qui s'insèrent dans les membranes des endosomes et qui participent au processus de transport entre les organites¹⁹⁰. Au niveau des endosomes précoces, la protéine Rab5 régule la fusion des vésicules d'endocytose avec la membrane endosomale, la motilité de l'endosome et l'activation de voie de signalisation^{191,192}. Rab5 recrute différents effecteurs de la voie et interagit notamment avec un phosphoinositide (PtdIns-3-P) qui va agir comme signal pour le recrutement d'autres protéines telle que *l'early endosome antigen-1* (EEA1), essentielle pour la fusion des endosomes précoces et qui constitue avec Rab5, les principaux marqueurs de l'endosome précoce¹⁹³.

La présence des différentes protéines Rab sur les endosomes permet de les identifier. En effet, la protéine Rab5 va disparaître des endosomes précoces au cours de leur maturation pour former des endosomes tardifs et laisser place à la protéine Rab7^{194, 195}. Au cours de la maturation des endosomes, les vésicules s'acidifient et ce changement de pH permet au complexe ligand/récepteur de se dissocier.

Les endosomes de recyclage

A partir des endosomes précoces, le sort des récepteurs peut dépendre de deux voies : un recyclage rapide vers la membrane plasmique qui se fait directement des endosomes précoces et qui concerne par exemple 65% des récepteurs à la Transferrine (TfnR) recyclés ; et la voie qui emprunte les endosomes de recyclage, qui concerne 35% des récepteurs TfnR recyclés^{196,197}. Peu de marqueurs ont été identifiés dans les endosomes de recyclage, cependant, on peut citer la protéine Rab11¹⁹⁸ (figure 12).

Endosomes multivésiculaires et endosomes tardifs

Entre le compartiment des endosomes précoces et les compartiments plus tardifs tels que les lysosomes, il existe des intermédiaires multivésiculaires (MVB)¹⁹⁹. Ces compartiments de transport vont fusionner avec les compartiments tardifs de manière dépendante des microtubules. La formation des

MVB (*multivesicular bodies*) se passe dans des zones de bourgeonnement des vésicules qui se détachent dans le lumen de l'endosome. Cette étape donne naissance aux MVB, compartiments intermédiaires de transport entre les endosomes de tri (précoce) et les compartiments de dégradation.

La voie des lysosomes

En absence de recyclage, les récepteurs sont dirigés vers les endosomes tardifs avant de rejoindre la voie lysosomale. Principalement connus comme les représentants de la voie de dégradation des molécules, les lysosomes très acides (pH 4,5 ou 5), se composent de nombreuses hydrolases et sont donc considérés comme le principal centre catabolique de la cellule²⁰⁰. Les molécules peuvent être dégradées par les lysosomes, cependant, une partie peut également être sécrétée et échapper à la dégradation²⁰¹. C'est notamment grâce à la présence de pompes à protons V-ATPases que les endosomes vont maintenir ce pH acide indispensable à l'activation des enzymes lysosomales de dégradation et les étapes de fusions autophagosomes-lysosomes. Il a été montré qu'un blocage de l'acidification des lysosomes par inhibition de l'activité de ces pompes par la Bafilomycine-A1 bloque le transport intracellulaire. Les protéines LAMP1 et LAMP2 (*lysosomal associated membrane protein 1 et 2*) s'associe aux lysosomes et constituent des marqueurs pour les identifier.

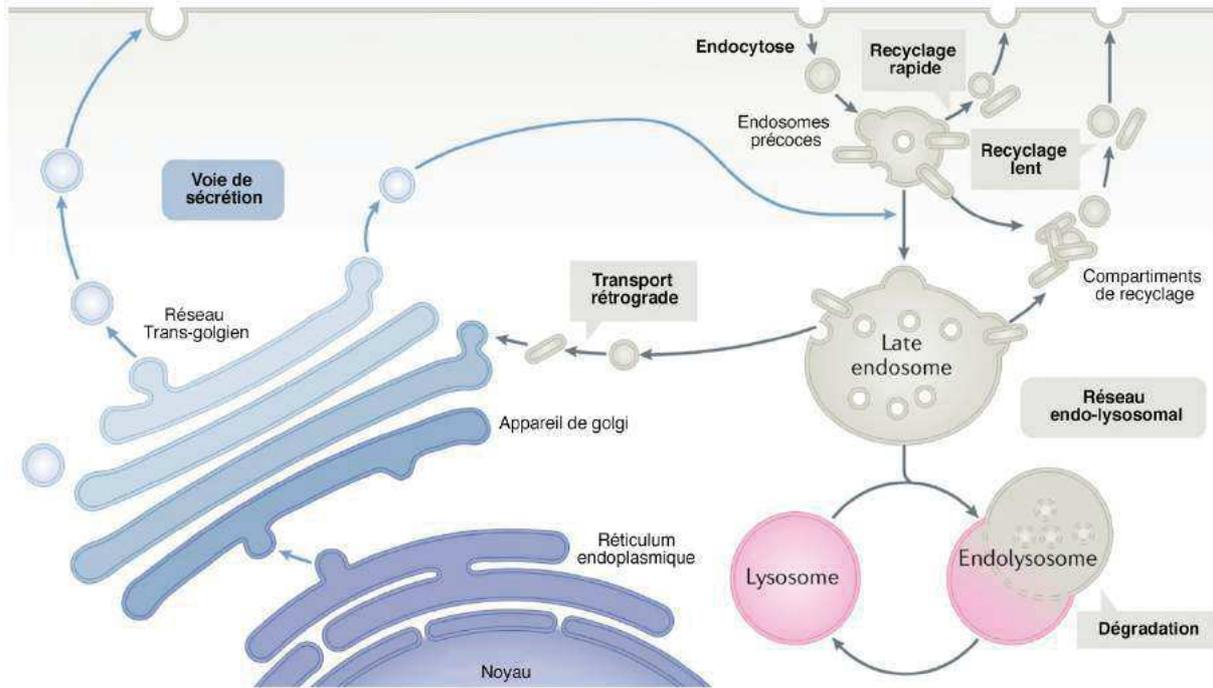


Figure 12 : Les différents compartiments intracellulaires. La vésicule de clathrine nouvellement formée va fusionner avec l'endosomes précoce, premier endosomes rejoint et marqué par les protéines EEA1, et Rab5-GTP. Le recyclage du cargo peut se faire directement à la membrane plasmique par EEA1, correspondant à la voie de recyclage rapide, ou *via* l'endosome de recyclage, constituant la voie de recyclage lent. Les endosomes précoces peuvent également interagir avec le réseau Trans-golgien et vont après plusieurs fusions devenir matures. Le marqueur Rab5 sera perdu des membranes et les endosomes tardifs vont présenter le marqueurs Rab7. Enfin, les endosomes tardifs vont fusionner avec les lysosomes, marqués par LAMP1/2 constituant principaux de la voie de dégradation. *Adapté de Cullen and Steinberg 2018.*

II. ENDOCYTOSE ET TRAFIC INTRACELLULAIRE DU RECEPTEUR A LA LEPTINE OB-R

Le récepteur Ob-R fait partie d'une vaste famille, les récepteurs aux cytokines de type I, impliqués dans diverses fonctions telles que la réponse immunitaire, la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Outre le récepteur à la leptine, ce groupe contient des récepteurs aux interleukines IL, à l'hormone de croissance GH, et à la prolactine PRL qui empruntent des voies d'endocytose bien différentes. A titre d'exemples, le récepteur à GH est internalisé par la voie dépendante de la clathrine²⁰², alors que le récepteur aux cytokines γc emprunte une voie indépendante de la clathrine²⁰³.

De façon surprenante, bien que le défaut de transport de la leptine jusqu'au cerveau soit identifié comme une des causes pouvant induire la résistance à la leptine et conduire à l'obésité, la voie d'endocytose empruntée par la leptine et son récepteur est peu documentée. De plus, un modèle d'étude hétérologue est bien souvent utilisé et laisse donc ouverte la question du transport endogène du récepteur Ob-R.

II.1. LOCALISATION ET MECANISME D'ENDOCYTOSE DU RECEPTEUR OB-R

Les récepteurs à la leptine sont exprimés de façons différentes au sein de l'organisme. Dans l'hypothalamus, ce sont les isoformes Ob-Ra et Ob-Rb qui ont principalement été détectés par hybridation *in situ*^{131, 33, 118}.

Avant de rejoindre la membrane plasmique, le récepteur Ob-R est présent au niveau intracellulaire. En effet, dans différents modèles cellulaires *in vitro*, les deux isoformes Ob-Ra et Ob-Rb sont principalement retenus dans l'appareil de Golgi et le réseau trans-golgien (TGN)^{204,205} et il est important de noter que seulement 5 à 20% de ces récepteurs Ob-R néosynthétisés sont adressés à la membrane plasmique²⁰⁵. Or, sa présence à la membrane plasmique en quantité suffisante est cruciale pour déclencher la réponse de la leptine.

Une fois exprimés à la membrane plasmique, les récepteurs Ob-R vont être internalisés par les cellules. C'est en 2004, qu'il est montré pour la première fois, dans un modèle de cellules HeLa transfectées, que l'internalisation d'Ob-Ra et Ob-Rb est constitutive. En effet, ces deux isoformes peuvent être internalisées indépendamment de leur ligand et la vitesse d'internalisation ne varie pas

en absence ou en présence de leptine ²⁰⁵, contribuant à l'élimination permanente des récepteurs à la surface cellulaire. Plus tard, Belouzard et collaborateurs montrent que l'internalisation d'Ob-R implique des signaux localisés dans sa queue cytoplasmique, en particulier deux résidus lysine, qui vont subir une ubiquitination. Ce mécanisme serait nécessaire pour l'endocytose dépendante des vésicules de clathrine de l'isoforme courte Ob-Ra mais pas de la forme longue Ob-Rb ²⁰⁶. L'existence de signaux d'internalisation dans la partie cytoplasmique du récepteur Ob-Rb reste une question posée, et l'ubiquitination d'Ob-Ra pourrait être considérée comme un motif d'internalisation à part entière ²⁰⁷.

Dans un autre modèle cellulaire (HEK293), il a été montré que l'internalisation d'Ob-Ra est dépendante de la clathrine mais pas de la voie des cavéoles. De plus, l'utilisation du dynasore, un inhibiteur de la dynamine, conduit à une inhibition de l'internalisation de la leptine et à une accumulation membranaire du récepteur, montrant que l'endocytose serait également dépendante de la dynamine ²⁰⁸.

La forme longue Ob-Rb est également internalisée par la voie clathrine dépendante dans les cellules polarisées de la barrière intestinale, Caco-2/15, et est nécessaire pour la transcytose de la leptine ²⁰⁹. De la même façon, on peut noter que cette voie d'endocytose dépendante de la clathrine a été décrite au niveau de la BHE comme étant impliquée dans le processus de transcytose dépendant des récepteurs ²¹⁰.

II.2. RECYCLAGE ET DEGRADATION DU RECEPTEUR OB-R

Des études sur des systèmes hétérologues ont montré que les récepteurs Ob-Ra et Ob-Rb suivent la même route intracellulaire après l'endocytose *via* les vésicules de clathrine. Après internalisation, le récepteur Ob-R transite par différents compartiments intracellulaires ; les endosomes précoces positifs pour les marqueurs EEA1 (early endosome antigen 1) et Rab5 puis rejoignent les lysosomes suggérant qu'il emprunte la voie de dégradation ^{205,211}. Ces données suggèrent des pistes d'investigation pour l'étude du transport du récepteur Ob-R endogène, et éclairent les compartiments qui pourraient être rejoints lors de sa transcytose dans les tancytes, dont rien n'est connu.

Les interactions de Ob-R avec les protéines de trafic intracellulaires vont réguler son devenir dans la cellule. En effet, une étude a montré que l'ubiquitine ligase RNF41 en interagissant avec Ob-R et une dé-ubiquitinase USP8, contrôle le trafic de récepteurs aux cytokines dont le récepteur à la leptine. Ce régulateur positif favorise le recyclage de Ob-R à la membrane plasmique et limite sa dégradation par la voie des lysosomes ²¹². Inversement, dans les neurones *in vitro*, la clusterine, et LRP2

favorisent l'endocytose d'Ob-R et de la leptine, et participent à l'activation de la voie de signalisation STAT3 qui est impliquée dans l'effet anorexigène de la leptine ²¹³.

S'il existe des régulateurs positifs de l'expression de Ob-R à la surface cellulaire, l'endospanine 1, une protéine codée par le même gène que le récepteur Ob-R (*diabetes*) par épissage alternatif a été identifié comme étant un régulateur négatif. L'endospanine 1 va séquestrer une quantité d'Ob-R dans les compartiments intracellulaires et favoriser sa dégradation par les lysosomes ²¹⁴. De plus, il a été montré que son inhibition double l'expression d'Ob-R à la surface et conduit à l'activation de la voie STAT3 à la fois *in vitro* et *in vivo*, dans le NA, permettant de contrer le développement de l'obésité chez la souris DIO ^{214, 215}. Il est également rapporté de manière surprenante que, contrairement à la voie STAT3, la voie de signalisation PI3K/Akt est fortement diminuée suggérant qu'en plus d'être une protéine de trafic, l'endospanine 1 participe directement à la régulation de la signalisation d'Ob-R et active la voie PI3K par interaction avec sa sous-unité régulatrice (p85). Présente principalement dans les endosomes, l'endospanine 1 représenterait un exemple du lien qui existe entre signalisation des récepteurs et compartiments intracellulaires.

L'isoforme Ob-Rb peut interagir avec une famille de protéines de tri, les nexines dont notamment la nexine 1, la nexine 4 et la nexine 6 ^{216,217}, impliquées dans le trafic intracellulaire de récepteurs cytoplasmiques. Cependant, l'importance de cette interaction n'a pas encore été démontrée.

L'ensemble des protéines impliquées permettent de moduler l'expression d'Ob-R à la membrane et modulent la sensibilité des neurones à la leptine. Elles jouent également un rôle important dans le trafic intracellulaire et le devenir du récepteur et de son ligand la leptine dans la cellule.

Internalisation et transport du récepteur Ob-R

Le récepteur Ob-R est internalisé de façon constitutive et l'endocytose est dépendante des vésicules de clathrine.

Ob-R est synthétisé dans le golgi/TGN puis une faible proportion est acheminée à la membrane plasmique (5 à 20%).

Le récepteur Ob-Ra est ubiquitiné sur sa queue cytoplasmique et ce processus est nécessaire pour son endocytose.

Dans les systèmes hétérologues, le récepteur Ob-R rejoint les endosomes précoces et les lysosomes pour y être dégradés après son internalisation.

Des protéines de trafic intracellulaire telle que l'endospanine ou les ubiquitines régulent la présence d'Ob-R à la surface cellulaire.

III. LA TRANSCYTOSE : VOIE DE TRANSPORT DANS LES CELLULES POLARISEES

Les tancytes sont des cellules polarisées dont les corps cellulaires contactent le LCR et les prolongements se projettent dans la zone péricapillaire des vaisseaux fenêtrés de l'EM formant la barrière tancytaire. De ce fait, *in vivo*, le transport des molécules circulantes telle que la leptine⁷² ou la ghréline⁷³ jusqu'au LCR se fait par les tancytes, qui doivent internaliser les molécules au niveau des prolongements ou pieds tancytaires (pôle basal), les transporter jusqu'aux corps cellulaires pour ensuite les sécréter dans le 3^e ventricule.

La transcytose est un processus de transport vésiculaire de molécules qui suppose un transport polarisé. Il permet notamment de transporter des macromolécules, tels que des peptides et des protéines, d'un pôle à un autre de la cellule pour les sécréter. Pour cela, 3 étapes importantes peuvent être distinguées : l'endocytose, le trafic intracellulaire et enfin l'exocytose.

Il n'existe que très peu de données sur le transport polarisé de la leptine, et rien n'est connu sur sa transcytose dans les tancytes. J'ai donc décider d'exposer quelques études utilisant un modèle de cellules polarisées de la périphérie (intestin, rein) et les cellules du cerveau (BHE).

Dans le cerveau, le modèle le mieux caractérisé pour l'étude de ce transport est celui de la BHE. En effet, une grande majorité des molécules circulantes ne peuvent pas franchir la BHE et nécessitent un transport spécifique pour atteindre leurs cibles neuronales. La transcytose peut être de deux types, par absorption ou dépendante du récepteur. La seconde, implique que la macromolécule telle que l'insuline ou la transferrine par exemple, se lie spécifiquement à son récepteur au niveau de la membrane plasmique pour déclencher la première étape de la transcytose, la formation des vésicules d'endocytose par invagination de la membrane plasmique. Or, deux types de vésicules ont été identifiées et peuvent participer à cette étape de la transcytose, les vésicules de clathrine, et les vésicules de cavéoline.

Dans la BHE, ainsi que dans le modèle de cellules Caco-2/15, il a été montré que la leptine est internalisée par la voie dépendante de la clathrine^{139,209}. Cependant, pour la transcytose, l'isoforme courte du récepteur Ob-Ra permet le transport de la leptine à travers des cellules, du pôle apical vers le pôle basal dans les cellules polarisées MDCK *in vitro*¹²⁴, alors que dans les cellules intestinales humaines Caco-2/15, la transcytose de la leptine dépend de la forme longue du récepteur Ob-Rb²⁰⁹.

Après internalisation, les vésicules vont traverser le cytoplasme endothélial par de multiples fusions endosomales puis une fois le compartiment intracellulaire « final » atteint, la membrane vésiculaire va fusionner avec la membrane plasmique cellulaire opposée pour entraîner la libération du ligand dans le milieu extracellulaire. Il est important de noter que dans une cellule polarisée, il existe une différence dans l'adressage des molécules aux endosomes de recyclage. En effet, contrairement à une cellule non polarisée, les membranes du pôle apical ou du pôle basal ne vont pas exprimer les mêmes domaines d'adressage. Prenons l'exemple du récepteur de la transferrine (TfnR), qui dans les neurones, est localisé sur la membrane somatodendritique et dans les cellules épithéliales sur la membrane basolatérale, pour être dirigé spécifiquement dans les endosomes de recyclage. Au niveau de ces domaines membranaires, la reconnaissance de séquences spécifiques présentes sur le domaine intracellulaire du récepteur TfnR est essentiel pour maintenir une localisation du récepteur polarisé au domaine membranaire approprié ¹⁹⁷.

Pour que la transcytose soit effective, il est nécessaire que la protéine ou le peptide internalisé, soit libéré et fonctionnel après son transport dans la cellule. La vésicule doit contourner la voie lysosomale pour empêcher la dégradation de son contenu et ce mécanisme pourrait constituer une caractéristique de la BHE ⁴⁷.

Au cours du transport, le pH intra-vésiculaire s'acidifie, et facilite la dissociation du ligand et de son récepteur au cours de la transcytose. La dissociation va entraîner la présence du récepteur dans des extensions tubulaires alors que le ligand va rester dans des structures vésiculaires sphériques, entraînant un recyclage du récepteur et un transport vers la dégradation ou la transcytose.

III.1. ROLE DES JONCTIONS SERRÉES

La polarité cellulaire se définit par la distinction entre deux pôles, basolatéral et apical, dans lesquels est exprimée de manière différentielle les molécules à la membrane plasmique et dans les compartiments intracellulaires organisé de manière asymétrique. La polarité cellulaire fait intervenir différents acteurs ²¹⁸.

III.1.A – Fonction des jonction serrées

La polarité cellulaire peut être définie par la présence de protéines importantes telles que les protéines des jonctions serrées (JS). En effet, elles ont un rôle central dans le maintien de l'homéostasie

et permettent la formation d'une barrière étanche, empêchant la diffusion des macromolécules dans le compartiment cellulaire voisin. Les modèles de barrière les plus étudiés sont les barrières endothéliales telle que la BHE et les barrières épithéliales constituant des zones d'échange importantes.

Différentes protéines transmembranaires peuvent former les complexes de jonctions serrées et interagissent entre elles pour former un réseau protéique complexe. En effet, comme retrouvées dans la barrière tanyctaire, les protéines occludines, claudines et zonula occludens composent les jonctions serrées des cellules épithéliales^{49, 219}. La présence de ces jonctions serrées est essentielle à la formation d'une barrière, et participe à la modulation de l'expression de facteurs impliqués dans le transport à travers la cellule. Elles régulent les échanges entre deux compartiments et favorisent une voie de transport paracellulaire des molécules^{220,221}. De plus, l'organisation des jonctions serrées empêche la prolifération cellulaire en agissant sur les voies de signalisation ou l'expression de certains facteurs de transcription²²².

III.1.B – Les protéines impliquées dans la polarité cellulaire

Hormis les protéines formant les jonctions serrées, d'autres protéines associées à la mise en place d'une polarité cellulaire peuvent intervenir et réguler des processus, tels que le trafic intracellulaire, ou encore la migration²²³.

Dans les cellules endothéliales, 3 complexes protéiques sont rapportés comme guides dans le processus de polarisation : Crumbs, Par et Scribble qui vont interagir entre eux^{224,144}. Ces protéines vont avoir une localisation qui leur est propre, en effet, Crumbs et Par collaborent pour marquer le domaine apical, alors de Scribble est un marqueur de la membrane basolatérale²²⁵.

Cdc42, une petite protéine GTPase contrôle une partie des transports intracellulaires essentiels à la polarisation des cellules épithéliales et à l'orientation de la migration cellulaire. Cdc42 contrôle aussi la polarité des astrocytes lors de l'induction de leur migration *in vitro*²²³. Cdc42 peut agir *via* un de ses effecteurs, Par6, associé à une protéine kinase C atypique (aPKC), ou PKC ζ ²²⁶. Le complexe protéique formé de Cdc42, Par3, Par6 et aPKC se trouve dans les jonctions cellulaires et participe à leur formation, et joue un rôle crucial dans la mise en place de la polarité apico-basale.

III.2. L'EXOCYTOSE

Une fois transportées à l'intérieur de la cellule, les molécules sont sécrétées dans le milieu extracellulaire. L'exocytose constitue le processus final du transport et va faire intervenir la fusion vésiculaire avec la membrane plasmique afin de libérer le contenu vésiculaire à l'extérieur de la cellule.

Le processus d'exocytose fait intervenir une famille de protéines, les *solubles N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor* (SNAREs)²²⁷. Ce sont des protéines spécifiquement impliquées dans la fusion des vésicules avec des membranes cibles^{228, 229, 230}. On distingue deux types de protéines SNAREs, déterminés selon leur localisation. En effet, ces protéines présentes sur des vésicules sont appelées v-SNARE et celles sur la membrane cible, les t-SNARE²²⁷. L'interaction de la protéine v-SNARE avec la t-SNARE va permettre la formation d'un complexe qui va conduire à la fusion des vésicules avec la membrane cible^{231, 232}. L'efficacité de fusion est toutefois modeste et le complexe SNAREs nécessite l'intervention de plusieurs partenaires et régulateurs pour que la fusion soit efficace^{233,234}. Un grand nombre de protéines SNAREs peuvent changer de partenaire en fonction du type de transport observé et du modèle cellulaire étudié. La localisation des principales SNAREs intracellulaires dans les compartiments spécifiques de la voie endo-lysosomale représente la première étape de régulation de la formation de ces complexes et donne des pistes sur les acteurs éventuels de la voie de transcytose du complexe leptine/Ob-R.

Dans l'étape de recyclage des récepteurs par exemple, la membrane de l'endosome précoce va fusionner avec la membrane plasmique et va permettre la réexpression des protéines du contenu vésiculaire à la surface membranaire de la cellule. Il a été montré que cette étape fait intervenir une protéine v-SNARE, la cellubrevine (ou VAMP3) exprimée dans les endosomes précoces. VAMP3 est impliquée dans le recyclage du récepteur à la transferrine (TfnR) à la membrane plasmique, et son inhibition par expression de la chaîne légère de la neurotoxine tétanique (TeNT) qui la clive, entraîne un blocage du recyclage de TfnR dans les fibroblastes en culture²³⁵. L'inhibition incomplète, laisse penser à l'implication d'une autre protéine SNAREs insensible à la TeNT.

La protéine VAMP3 peut interagir à ce niveau avec la syntaxine 13 (t-SNARE), qui est également exprimée dans les endosomes de recyclage. L'utilisation d'anticorps dirigés contre la syntaxine 13 inhibe son action et entraîne une réduction du recyclage du TfnR à la membrane plasmique²³⁶. Le contrôle des protéines SNAREs peut se faire par interaction avec les protéines Rabs présentes dans les endosomes et dans l'endosome de recyclage, elle pourrait se faire par la protéine Rab11 qui intervient dans la régulation du recyclage d'autres récepteurs. La présence du complexe VAMP3/syntaxine 13 est

également décrite dans les endosomes précoces²³⁷ et aurait un rôle dans la fusion membranaire dans ces endosomes²³⁶.

La protéine *tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein* Ti-VAMP ou VAMP7 (v-SNARE) est enrichie dans les endosomes tardifs et les lysosomes^{238, 239} et serait impliquée dans leur processus de fusion. Cette SNARE est particulière puisqu'elle est insensible au clivage des neurotoxines. Au niveau des endosomes tardifs, la protéine Syntaxine 8 serait présente, et participerait avec VAMP7 à la fusion avec le lysosome. Une étude montre que son inhibition par l'utilisation d'anticorps spécifiques inhibe la dégradation lysosomale de l'EGF après son endocytose²³⁶.

La protéine Ti-VAMP, en s'associant avec d'autres partenaires, est présente dans les lysosomes faisant de la sécrétion lysosomale et va donc participer à la régulation de la fusion des membranes lors de l'exocytose. Dans les astrocytes, par exemple, Ti-VAMP conduit la fusion du lysosome sécrétoire avec la membrane plasmique²⁴⁰. De nombreux composants de la machinerie de l'exocytose ont été identifiés participant au transport des protéines apicales et basolatérales⁶¹. Dans les cellules polarisées MDCK (*Madin-Darby canine kidney*), l'exocytose apicale dépend de la Ti-VAMP qui va s'associer avec la t-SNARE syntaxin-3 et SNAP23²²⁸. Cet assemblage en complexe est notamment régulé par la protéine Munc18-2²⁴¹.

En revanche, différentes SNAREs vont être utilisées à la membrane basolatérale. Les vésicules sortantes du golgi vont s'ancrer à la membrane plasmique association de la tetanus sensitive v-SNARE (ts-VAMP) avec la syntaxin-4 (v-SNARE) et SNAP23²²⁹. Contrairement au pôle apical, la régulation de l'assemblage du complexe SNARE basolatéral se fait par Munc18c.

L'exocytose peut être de deux types, régulée par le calcium ou constitutive. En effet, lors de l'exocytose régulée, la dernière étape de fusion des deux membranes va se faire suite à une entrée de calcium dans les neurones. Les protéines synaptotagmines sont des protéines membranaires situées sur les lysosomes, la membrane plasmique et les granules de sécrétion. La synaptotagmine présente un rôle de senseur de calcium grâce notamment à la présence de deux domaines C2 (C2A et C2B) pouvant notamment lier le calcium. Une fois fixé à la synaptotagmine, le calcium, va inverser l'action d'une protéine, la complexine, et déclencher la fusion des vésicules²⁴².

Le complexe SM, composés de Sec1/Munc18-like interagit avec les protéines SNAREs et intervient également dans la régulation du calcium^{243,244}. *In vitro*, l'utilisation du BAPTA-AM, conduit à l'inhibition des processus de fusion dépendants de calcium²⁴⁴.

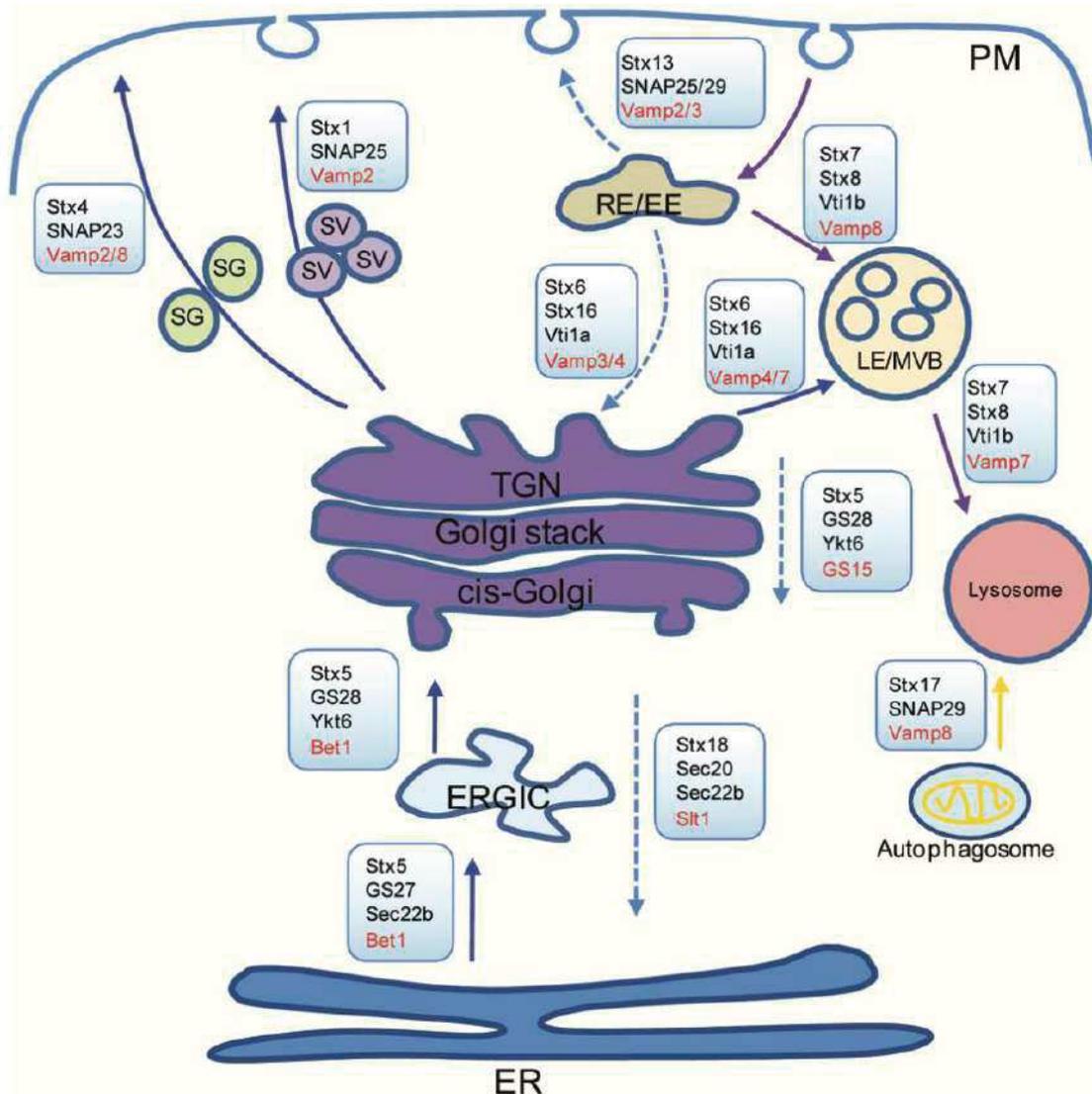


Figure 13 : Distribution des protéines SNAREs sur les différents compartiments intracellulaires. Les protéines SNAREs sont impliquées dans le processus de fusion des membranes. Dans les endosomes précoces, on retrouve exprimée, la protéines SNARE VAMP2/3 pouvant s'associer à la syntaxine 13 et à SNAP25. La fusion des endosomes tardifs fait intervenir VAMP7 (la SNARE insensible aux toxines) et VAMP8 et d'autres syntaxines comme la Stx 7 et 8. Les protéines SNAREs peuvent former de nombreuses associations, sur les vésicules de sécrétion on trouve VAMP2, SNAP25 et la syntaxine 1 (Wang *et al.*, 2017).

Transport du récepteur et transcytose

La formation de jonctions serrées induit une polarisation de la cellule.

Dans une cellule polarisée, il existe des protéines de polarité telles que Crumbs, Par et Scribble.

Les protéines Rab GTPases sont des marqueurs des compartiments intracellulaires.

Les protéines SNAREs participent à la fusion des membranes endosomales et plasmiques appelé exocytose et le calcium module leur activité.

RESULTATS

PARTIE 1

MÉCANISMES DU TRANSPORT DE LA LEPTINE DANS LES TANYCYTES HYPOTHALAMIQUES

Lors d'un déséquilibre énergétique comme l'obésité, la leptine n'est plus capable d'agir sur les neurones des noyaux hypothalamiques et donc de réguler la prise alimentaire. Bien qu'elle circule en quantité proportionnelle à la masse grasse corporelle, soit dans ce cas pathologique, en grande quantité dans le sang, une diminution de son activité centrale est observée, traduisant un état de résistance à la leptine.

Une des hypothèse mise en avant pour expliquer ce dérèglement est un transport défectueux de la leptine de la périphérie vers l'hypothalamus. Il a été montré au niveau de l'éminence médiane que les tanocytes qui sont en contact avec les vaisseaux fenêtrés agissent comme porte d'entrée et régulent l'accès des signaux périphériques jusqu'aux neurones⁷². En effet, ces cellules sont capables de capter la leptine grâce à leurs prolongements et de la transporter jusqu'à leur pôle apical. Cependant, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent l'internalisation et la transcytose de la leptine restent inconnus. Or, la découverte de ces mécanismes moléculaires et cellulaires est cruciale car elle permettrait d'une part une meilleure compréhension de la communication entre la périphérie et le cerveau et d'autre part d'ouvrir de nouveaux axes de recherches visant à prévenir la mise en place de la résistance à la leptine.

Le but de mes travaux de thèse a été de déterminer les mécanismes à la base du transport de la leptine par les tanocytes. Pour cela, j'ai utilisé un modèle expérimental *in vitro*, la culture primaire de tanocytes prélevés à partir de l'éminence médiane de rats.

Lors de cette étude, je me suis fixé trois objectifs principaux : i) caractériser le mode d'internalisation de la leptine, ii) étudier son transit dans les différents compartiments intracellulaires, et iii) déterminer les acteurs qui contrôlent ensuite son relargage. Les différentes expériences menées durant ma thèse éclairant le mode de transport de la leptine dans les tanocytes sont détaillées dans ce chapitre.

I. INTERNALISATION DE LA LEPTINE PAR LES TANYCYTES *IN VITRO*

I.1. CARACTERISATION ET VALIDATION DES CULTURES PRIMAIRES DE TANYCYTES COMME MODELE D'ETUDE

Lors de cette étude, nous avons utilisé la culture primaire de tanyocytes de rats comme modèle expérimental. J'ai mis en place lors de mon arrivée au sein de l'équipe ce nouveau modèle d'étude *in vitro* en suivant les étapes détaillées dans Prévot et al., 2003⁷⁶. Pour ce faire, 24 ratons âgés de 10 jours sont utilisés afin d'en extraire les éminences médianes. Après dissociation, les cellules sont cultivées dans deux boîtes de pétri pendant 8 jours avant d'être cultivées sur lames de verre pour les expériences de suivi de la leptine.

Dans un premier temps, je me suis attachée à caractériser cette culture de tanyocytes. Les tanyocytes en culture présentent une forme allongée ainsi que des prolongements cellulaires (figure 14, A). J'ai vérifié par immunomarquage l'expression de deux marqueurs de tanyocytes, DARPP-32 (dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein 32) et la vimentine (filaments intermédiaires du tissu mésenchymal), et d'un marqueur de cellules gliales, la GFAP (Glial fibrillary acidic protein, filament intermédiaire). Dans la culture primaire, environ 95% des cellules sont à la fois positives au marquage de la vimentine et de DARPP-32 (figure 14, C) tandis qu'environ 5% des cellules expriment à la fois la vimentine et la GFAP (figure 14, B), indiquant un fort enrichissement de la culture cellulaire en tanyocytes hypothalamiques. Un marquage neuronal (MAP2) a également été testé (résultat non montré) ne donnant aucune cellule positive, démontrant l'absence de survie neuronale.

Afin de valider fonctionnellement le modèle cellulaire des tanyocytes, j'ai ensuite effectué les premiers tests d'internalisation avec une leptine fluorescente biologiquement active, et couplée au fluorophore D2 qui émet dans le rouge lointain (Cisbio Bioassays). Cet outil me permet en suivant sa fluorescence de repérer l'entrée de la leptine dans la cellule et d'observer son transport intracellulaire. Pour effectuer la cinétique d'endocytose de la leptine, les cellules sont incubées avec la leptine fluorescente (2 µg/ml) pendant différents temps (2-5-10-15-30 min) à 37°C. Les cellules sont ensuite observées par microscopie confocale.

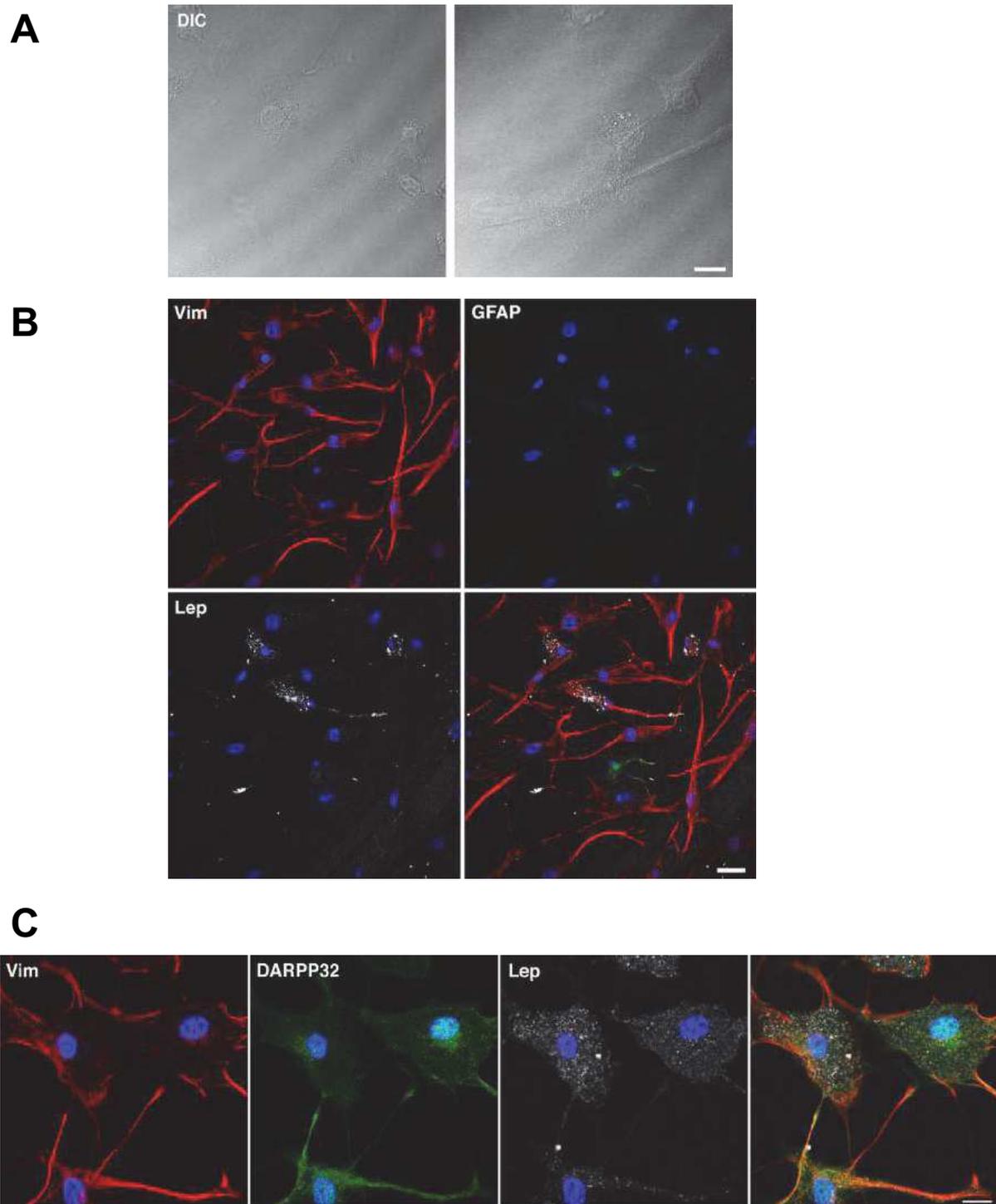


Figure 14 : Caractérisation de la culture primaire de tanocytes de rat. **A)** Images de tanocytes après 72h de culture sur lame de verre. Les images sont prises en contraste interférentiel différentiel (DIC) avec un microscope confocal. Échelle 10 μm . **B-C)** Images de microscopie confocale de tanocytes maintenus dans du milieu de restriction pendant 48 heures puis incubés avec la leptine fluorescente (Lep, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, blanc) pendant 15 min à 37°C. Après 10 min de fixation au PFA 4% et 5 min de perméabilisation au triton 0,1%, les cellules sont marquées avec un anticorps primaire dirigé contre (A) la Vimentine (Vim, rouge), la GFAP (vert) et (B) DARPP-32 (vert). Les cellules sont ensuite révélées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 555 et 488 et les noyaux marqués au Hoechst (bleu). Échelle A, 20 μm ; B, 10 μm .

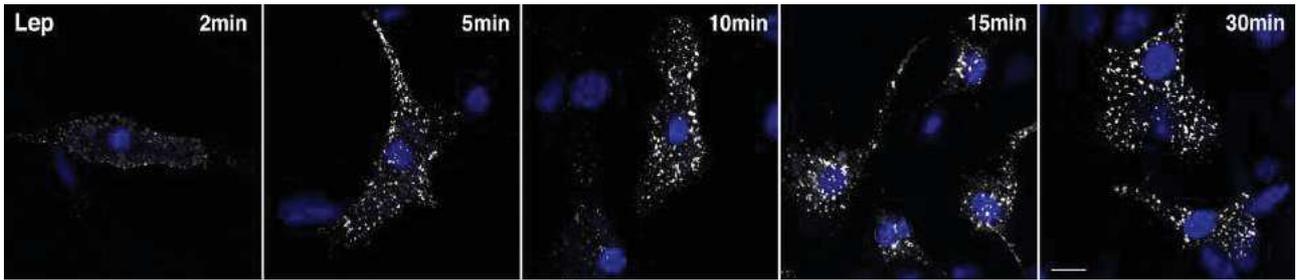
Notons tout d'abord que la leptine est présente exclusivement dans les cellules doublement marquées pour DARPP32 et la vimentine, démontrant une internalisation de la leptine spécifiquement par les tanocytes (figure 14, A). Néanmoins, j'ai pu observer que seulement 20% des tanocytes de la culture cellulaire internalisent la leptine fluorescente. De plus, l'analyse de la fluorescence par cellule indique qu'après 2 minutes, la leptine est détectée dans les tanocytes et qu'elle s'y accumule pour atteindre un pic de fluorescence après 15 minutes d'internalisation (figure 15, B).

L'utilisation dans un second temps de la technique de microscopie confocale à disque rotatif m'a permis d'observer sur cellules vivantes l'internalisation de la leptine fluorescente par les tanocytes. Les cellules sont cultivées sur des lames de verre dans des chambres (ibidis) en milieu de restriction pendant 48h avant d'effectuer l'expérience. Une fois placées à 37°C dans la chambre thermique du microscope, la leptine est ajoutée au milieu et l'enregistrement est lancé pendant 3 minutes. En effet, quelques secondes après le lancement de l'enregistrement, je peux observer un signal faible de la leptine autour des cellules puis une internalisation de la leptine qui progressivement s'accumule vers le centre de la cellule (figure 15, C).

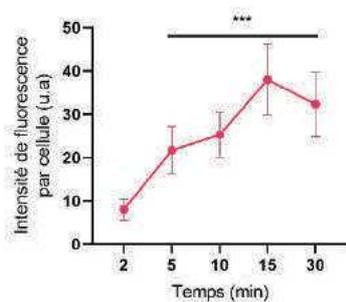
Au sein de l'éminence médiane, la leptine est transportée par les tanocytes puis relarguée au pôle opposé. C'est pourquoi je me suis intéressée à la sécrétion de leptine par les tanocytes dans ce modèle *in vitro*. Pour cela, j'ai mis au point une expérience de « chasse » permettant de suivre une quantité fixe de leptine et également de quantifier sa sécrétion par les tanocytes. Les tanocytes sont incubés pendant 15 minutes avec la leptine fluorescente (2 µg/ml), puis après un lavage rapide, incubés dans un milieu de culture frais sans leptine (temps 0) afin de quantifier l'évolution de la fluorescence de la leptine jusqu'à 60 minutes (5, 15, 30, 60 min). La leptine accumulée dans les tanocytes pendant les 15 minutes d'incubation (point 0 min, 100%), baisse progressivement atteignant 40% après 60 minutes (figure 15, D). Cette baisse de fluorescence coïncide avec une augmentation de la quantité de leptine dosée par ELISA dans le milieu extracellulaire, confirmant bien la sécrétion de la leptine internalisée (figure 15, B).

L'ensemble de ces observations m'a permis de valider la culture primaire des tanocytes de rats comme modèle expérimental d'étude des mécanismes moléculaires d'endocytose et de transport de la leptine.

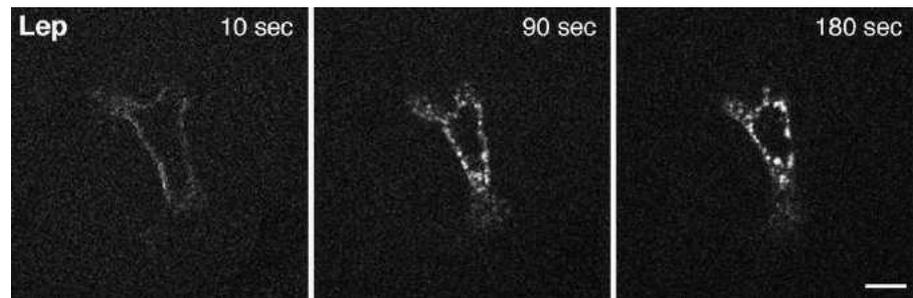
A



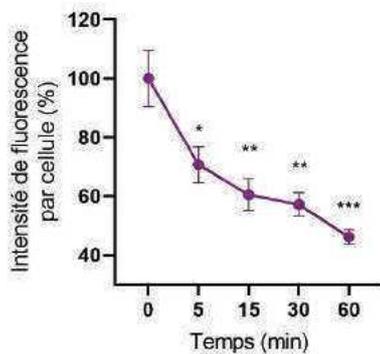
B



C



D



E

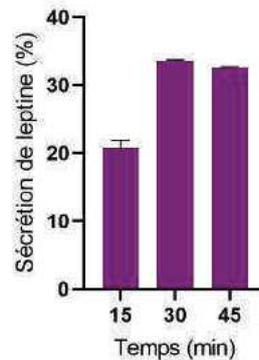


Figure 15 : Internalisation et accumulation de la leptine dans les tanycytes *in vitro*.

A) Images de microscopie confocale de tanycytes maintenus dans du milieu de restriction pendant 48h et incubés avec la leptine fluorescente (Lep, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, blanc) en continu pendant 2, 5, 10, 15 et 30 min à 37°C. Après une fixation au PFA 4% pendant 10 min, les noyaux des tanycytes sont marqués au Hoechst (bleu). Barre d'échelle 10 μm . **B)** Cinétique d'endocytose de la leptine fluorescente par les tanycytes au cours du temps. Le graphique représente l'intensité moyenne de fluorescence de la leptine par cellule (%) \pm SEM. **C)** Images de tanycytes extraites d'un enregistrement vidéo réalisé au microscope confocal à disques rotatifs. Les cellules vivantes sont incubées en présence de leptine fluorescente (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, blanc) et enregistrées pendant 180 secondes. Les flèches représentent le sens de transit de la leptine vers le centre de la cellule. Barre d'échelle 10 μm . **D)** Cinétique de relargage de la leptine fluorescente par les tanycytes au cours du temps. Le graphique représente l'intensité moyenne de fluorescence de la leptine par cellule (%) \pm SEM. Les cellules sont incubées avec la leptine (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) pendant 15 min (point 0 min) à 37°C, lavés puis incubés avec du milieu frais pendant différents temps (15, 30 et 45 min). **E)** Graphique représentant le pourcentage de leptine sécrétée dans le milieu de culture par les tanycytes après un dosage Elisa. Test de Mann-Whitney * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

1.2. LA LEPTINE EST-ELLE INTERNALISEE PAR SON RECEPTEUR OB-R ?

Afin de propager son action, une hormone passe généralement par l'interaction avec son récepteur. Dans plusieurs types cellulaires, la leptine interagit et active son récepteur Ob-R conduisant ainsi au déclenchement de multiples voies de signalisation comme la voie Jak2/STAT3, MAPK, ou encore PI3K. En revanche, « l'endocytose de leptine dans les tanocytes dépend-t-elle de son récepteur ? » reste une question à résoudre. En effet, l'expression des récepteurs à la leptine dans les tanocytes hypothalamiques n'a jamais été formellement démontrée. L'une des raisons principales est certainement l'absence d'anticorps fiables. Cependant, grâce à notre collaboration avec Julie Dam (Institut Cochin, Paris), j'ai pu tester un outil intéressant, l'anticorps agoniste XPA 80.037 développé par XOMA²⁴⁵. XPA se fixe sur la partie CRH1 (Cter) du récepteur et active les voies de signalisation mais n'empêche pas la fixation de la leptine sur la partie CRH2 (figure 16, A) ce qui permet de suivre l'internalisation à la fois de la leptine et de son récepteur. Il cible les deux isoformes du récepteur Ob-Ra et Ob-Rb, tous les deux exprimés dans l'hypothalamus.

Dans un premier temps, j'ai utilisé le XPA afin de vérifier par western blot la présence du récepteur à la leptine dans les cultures de tanocytes. J'ai ainsi pu montrer l'expression de Ob-R dans un lysat de tanocytes en culture, traités ou non à la leptine (figure 16, B). Dans un second temps, j'ai réalisé une cinétique d'internalisation de la leptine en présence de XPA. Si l'internalisation de leptine nécessite son récepteur, nous devrions observer une co-internalisation de la leptine et du XPA. Pour cela, les cellules sont incubées en présence de XPA (5 µg/ml) et de leptine fluorescente (2 µg/ml) pendant différents temps (2-5-10-15 min) à 37°C. Le XPA est ensuite révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (figure 16, D). A l'instar de la leptine, j'observe que seulement environ 25% des tanocytes sont marqués au XPA, marquage qui apparaît punctiforme et en majorité périnucléaire. Ces données montrent que le récepteur à la leptine est exprimé à la surface des tanocytes et que le pourcentage de cellules présentant le récepteur Ob-R pourrait correspondre aux tanocytes qui captent également la leptine. Effet, il est important de noter que 100% des tanocytes qui internalisent la leptine fluorescente ont également internalisé le XPA. De plus, j'ai calculé qu'après 5 min d'incubation, environ 60% de la leptine fluorescente colocalise avec le XPA (figure 16, C).

L'ensemble de ces données indique que l'internalisation de la leptine par les tanocytes *in vitro* dépend bien de son récepteur.

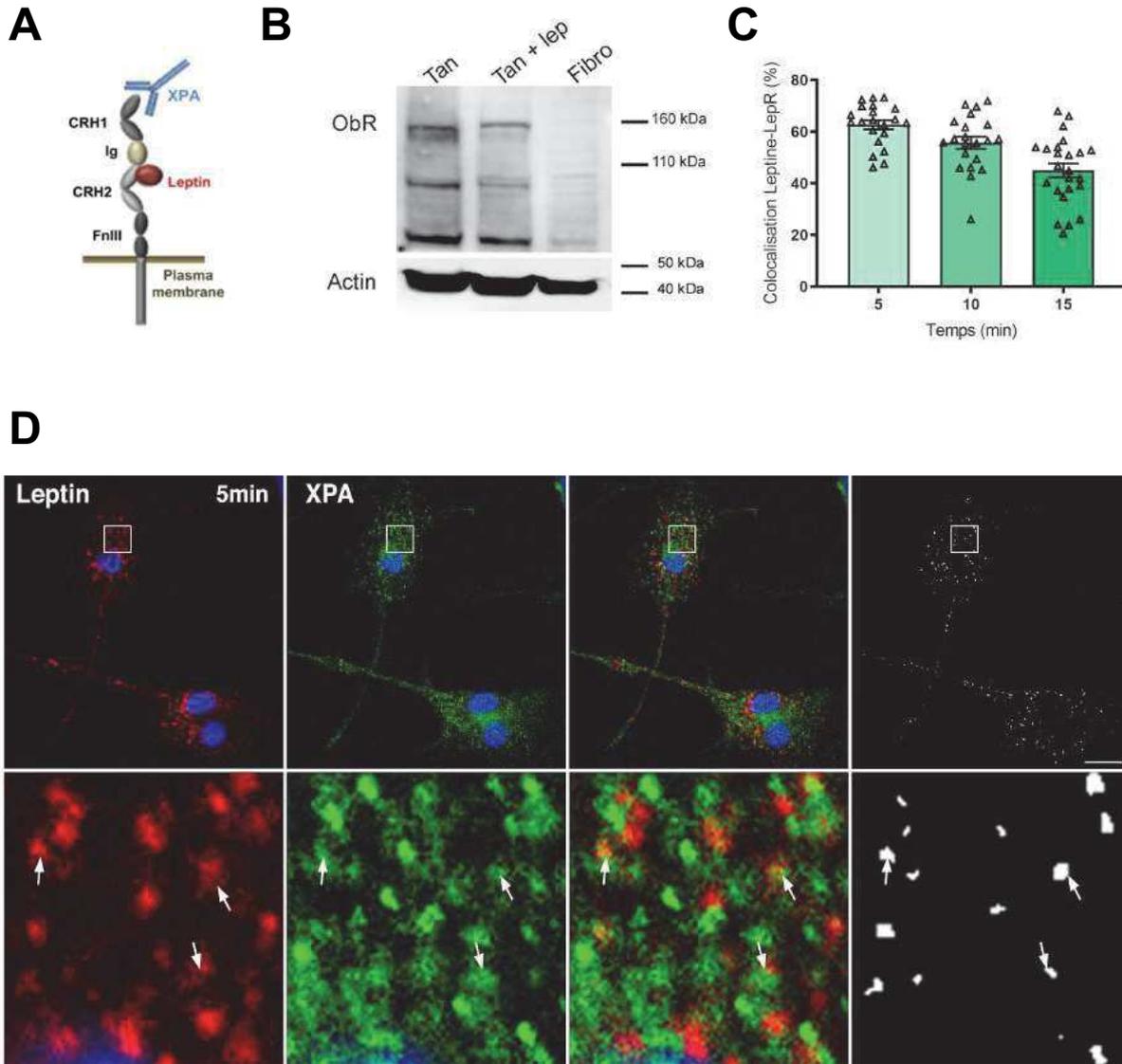


Figure 16 : Présence du récepteur à la leptine Ob-R dans les tanycytes et internalisation avec la leptine fluorescente. **A)** Schéma représentant la partie extracellulaire du récepteur à la leptine et les domaines de fixation CRH1 et CRH2 du XPA et de la leptine fluorescente respectivement. **B)** Détection du récepteur Ob-R par western blot dans les tanycytes (Tan), les tanycytes incubés avec la leptine pendant 15 min (Tan + lep) ou dans les fibroblastes de souris (contrôle négatif). L'actine est utilisée comme contrôle du total de protéines. **C)** Graphique représentant le pourcentage moyen de colocalisation de la leptine avec son récepteur ObR au cours du temps \pm SEM. **D)** Image de microscopie confocale de tanycytes maintenus dans du milieu de restriction et incubés avec le XPA (5 μ g/ml) et la leptine fluorescente (2 μ g/ml) pendant 5 min à 37°C. Après fixation, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire dirigé contre le XPA couplé à l'Alexa-488 (vert) et les noyaux marqués au Hoechst (bleu) pendant 30 min. Le panel de droite (blanc) représente le masque de colocalisation obtenu avec le logiciel ICY en sélectionnant les pixels doublement marqués pour la leptine et XPA. Les carrés blancs représentent les zooms et les flèches blanches indiquent des pixels doublement marqués. Barre d'échelle 20 μ m. La planche D est référencée dans la figure 1, F de l'article *Nat.metabolism*.

1.3. L'ENDOCYTOSE DE LA LEPTINE EST-ELLE DÉPENDANTE DE LA CLATHRINE ?

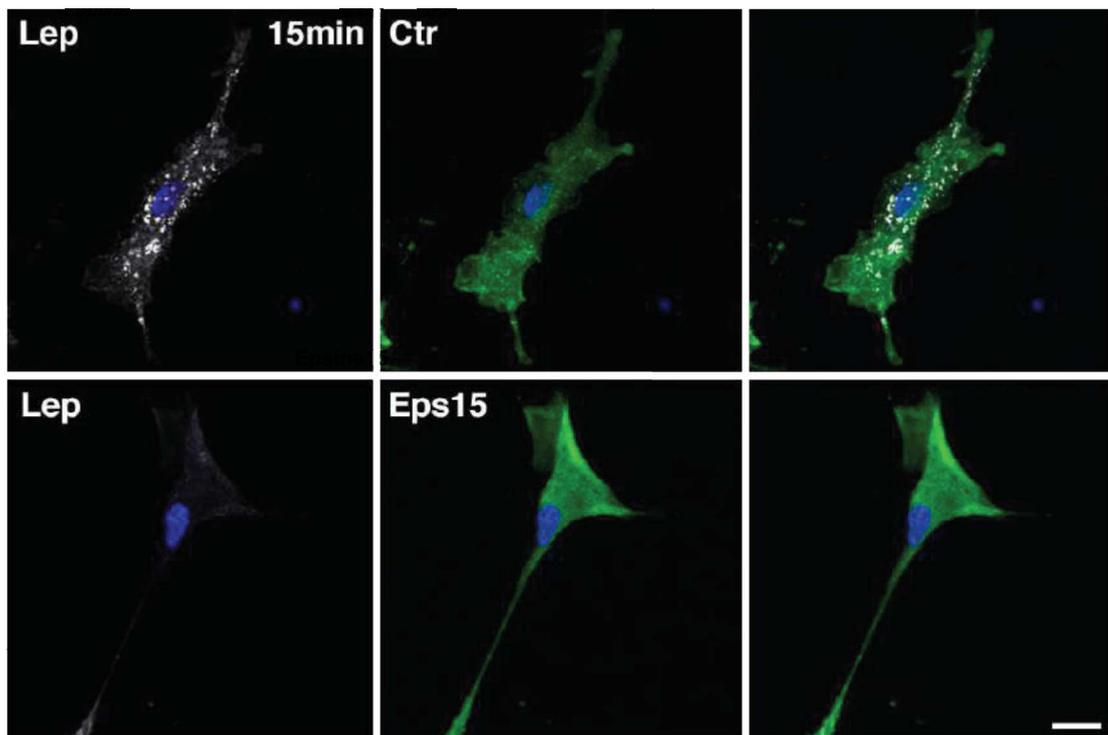
Dans des systèmes hétérologues, les récepteurs à la leptine Ob-Ra et Ob-Rb surexprimés sont endocytés par la voie dépendante de la clathrine²⁰⁶. Qu'en est-il de l'endocytose du récepteur endogène et de la leptine dans les tanocytes ? Bien que l'équipe de Vincent Prévot suggère que l'internalisation de leptine par les tanocytes soit dépendante des vésicules de clathrine⁷², cette voie n'a jamais été montrée fonctionnellement comme étant la voie principale d'entrée de la leptine dans les tanocytes *in vitro*. En conséquence, je me suis intéressée à la voie de la clathrine et aux protéines responsables de cette endocytose.

1.3. A - L'Epsine 15 est-elle impliquée dans l'endocytose de la leptine par les tanocytes ?

Pour montrer fonctionnellement que la voie dépendante de la clathrine est requise pour l'endocytose de la leptine dans les tanocytes, j'ai tenté d'inhiber la formation du manteau de clathrine en ciblant l'Epsine-15, une protéine clé impliquée dans la formation d'un puit de clathrine qui recrute d'autres protéines telles que la protéine AP-2 (*assembly protein - 2*) et la clathrine elle-même. Dans un premier temps, j'ai utilisé un mutant dominant négatif de l'Epsine-15 (Eps15 DIII) dont l'expression inhibe la formation des puits de clathrine²⁴⁶. Après transfection des tanocytes par la technique d'électroporation avec le mutant rapporté par la GFP ou un contrôle, les cellules sont incubées avec la leptine fluorescente pendant différents temps (5-10-15-30 min) afin de déterminer l'impact de ce mutant sur la cinétique d'endocytose de la leptine.

La figure (17, A) indique que dans les cellules exprimant le mutant négatif Eps15, l'endocytose de la leptine est perturbée en comparaison aux cellules contrôles. En effet, la leptine est faiblement détectée dans les cellules mutantes. De la même manière, l'analyse de la fluorescence montre que l'internalisation de la leptine est fortement ralentie dans les cellules mutantes avec une intensité de 24% contre 42% pour les contrôles après 30 min d'endocytose (figure 17, B). Ces résultats démontrent que l'internalisation de la leptine par les tanocytes est dépendante de l'action de l'Epsine-15.

A



B

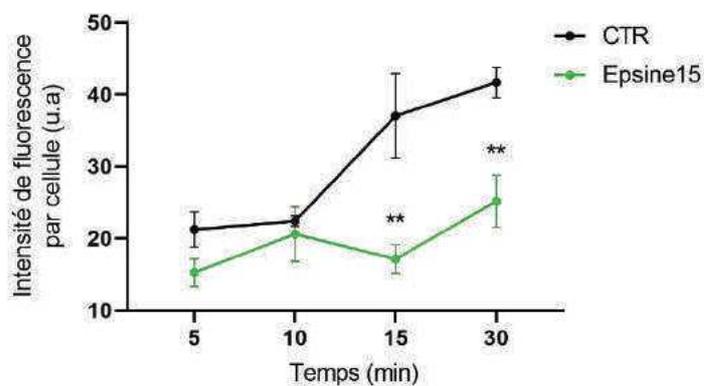


Figure 17 : L'inhibition de l'Epsine 15 bloque l'internalisation de la leptine par les tanycytes *in vitro*. **A)** Image de microscopie confocale représentant des tanycytes transfectés par un mutant dominant négatif de l'Epsine15 (Eps15 DIII) ou un contrôle-GFP (CTR) après 15 minutes d'internalisation avec la leptine fluorescente. 24h après la transfection par technique d'électroporation avec le mutant dominant négatif de l'epsine15 rapporté avec la GFP ou le contrôle GFP, une cinétique d'internalisation de la leptine (2 µg/ml) pendant 5, 10,15 et 30 min est réalisée à 37°C. Après fixation, les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu) pendant 30 min. Barre d'échelle 10 µm. **B)** Graphique représentant l'intensité moyenne de fluorescence de la leptine par cellule au cours du temps dans la condition contrôle ou transfectée par le mutant de l'Eps15. Les données utilisées sont les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence ± SEM. Test de Mann-Whitney ; ** p<0,01.

I.3. B – La clathrine est-elle recrutée au niveau de la leptine et de son récepteur ?

L'implication de l'Epsine 15 dans l'endocytose de clathrine suggère fortement un rôle fonctionnel des vésicules à manteau de clathrine. J'ai tout d'abord étudié la localisation de la clathrine dans les tanocytes par rapport à la leptine et à son récepteur. Pour cela, j'ai réalisé un immunomarquage de la chaîne lourde de la clathrine sur des tanocytes incubés en continu avec la leptine fluorescente (2 µg/ml) et XPA (5 µg/ml) pendant 5, 10 et 15 minutes. L'imagerie confocale révèle une distribution punctiforme de la clathrine (figure 18, A). Les images indiquent également que XPA et la leptine colocalisent avec les structures marquées par la clathrine (figure 18, A, B et C). L'analyse des images m'a permis de calculer une colocalisation de la leptine avec la clathrine d'environ 30% (figure 18, B) et avec le récepteur à la leptine Ob-R d'environ 24% après 5 min d'internalisation (figure 18, C).

Ces données suggèrent l'implication de la clathrine dans le processus d'endocytose de la leptine par les tanocytes. Il est intéressant de noter qu'ont été observées d'autres invaginations de la membrane plasmique, plus fines et allongées, pouvant s'apparenter à des vésicules de cavéoles. La voie dépendante de la clathrine est-elle le seul point d'entrée de la leptine ? Cette question est traitée dans le chapitre discussion générale.

I.3. C – L'inhibition de la clathrine empêche-t-elle l'internalisation de la leptine par les tanocytes ?

Pour aller plus loin dans la démarche de valider définitivement l'importance de la clathrine comme voie d'endocytose de la leptine par les tanocytes, j'ai opté pour une approche perte de fonction de type ARN interférent. J'ai donc infecté les cellules avec des lentivirus exprimant 2 shRNA différents (G10 et H01) ciblant directement la chaîne lourde de la clathrine ou un shRNA contrôle.

Le plasmide shRNA codant également pour la RFP, j'ai pu estimer que le taux d'infection des tanocytes par les lentivirus est d'environ 60%. L'analyse par Western blot d'un extrait protéique de tanocytes infectés (shRNA G10) montrent une réduction de l'expression de la chaîne lourde de clathrine d'environ 50% (figure 19, A). Néanmoins, la diminution presque globale de la clathrine en western-blot n'est pas retrouvée en immunofluorescence pour laquelle, on retrouve des structures marquées en périphérie et au niveau du golgi (figure 19, C). Le shRNA G10 ayant une efficacité plus importante, il a été choisi pour la suite des expériences.

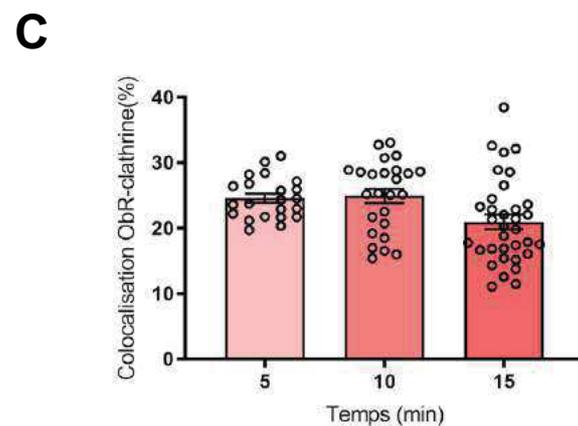
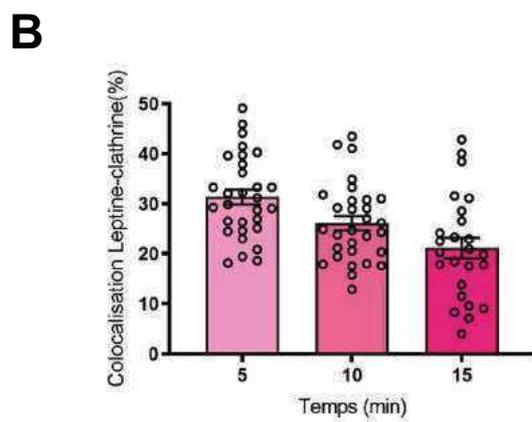
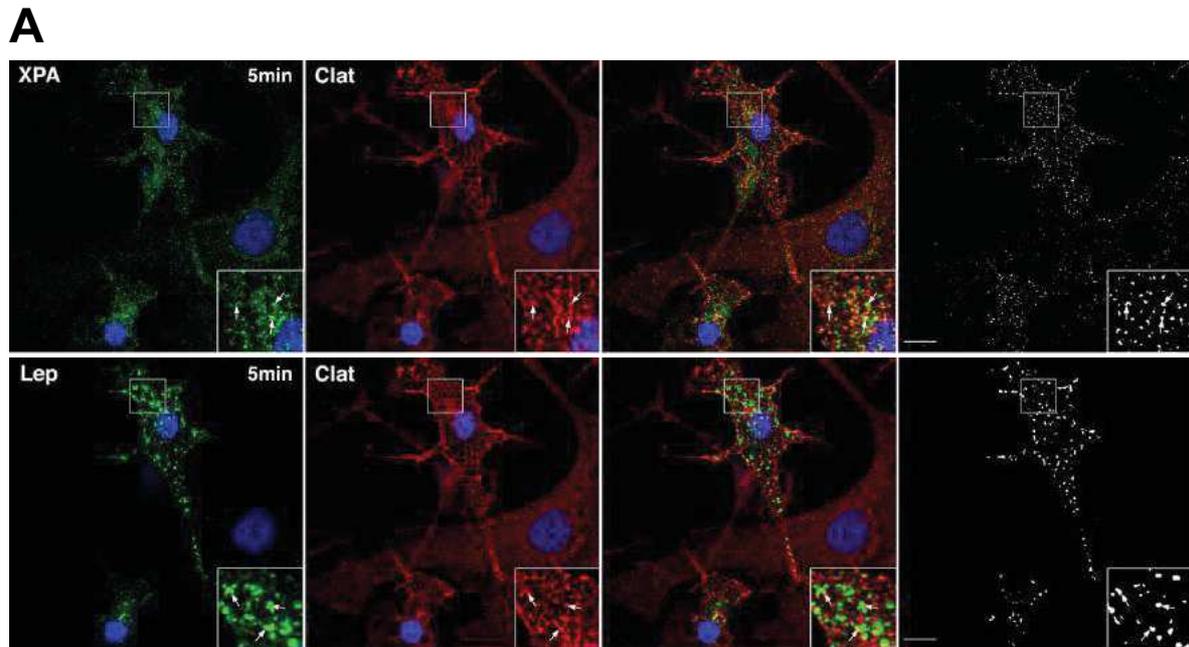


Figure 18 : Colocalisation de la leptine et du Ob-R avec la clathrine. A-B) Images de microscopie confocale de tanycytes maintenus dans du milieu de restriction pendant 48h puis incubés avec la leptine fluorescente (Lep ; 2 µg/ml) et l'anticorps XPA (5 µg/ml) pendant 5 min. Après fixation et perméabilisation, les cellules sont incubées avec un anticorps dirigé contre la chaîne lourde de la clathrine (Clat, rouge), révélées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-555 (Clat) et l'Alexa 488 (XPA, vert) et les noyaux marqués au Hoechst (bleu) pendant 30 min. En blanc, on observe le masque de colocalisation obtenu avec le logiciel ICY en sélectionnant les pixels doublement marqués. Les carrés blancs représentent les zooms et les flèches blanches indiquent des pixels doublement marqués. Barre d'échelle 10 µm. **C)** Graphique représentant le pourcentage de colocalisation de la leptine avec la clathrine au cours du temps. Les valeurs représentent les moyennes de colocalisation ± SEM.

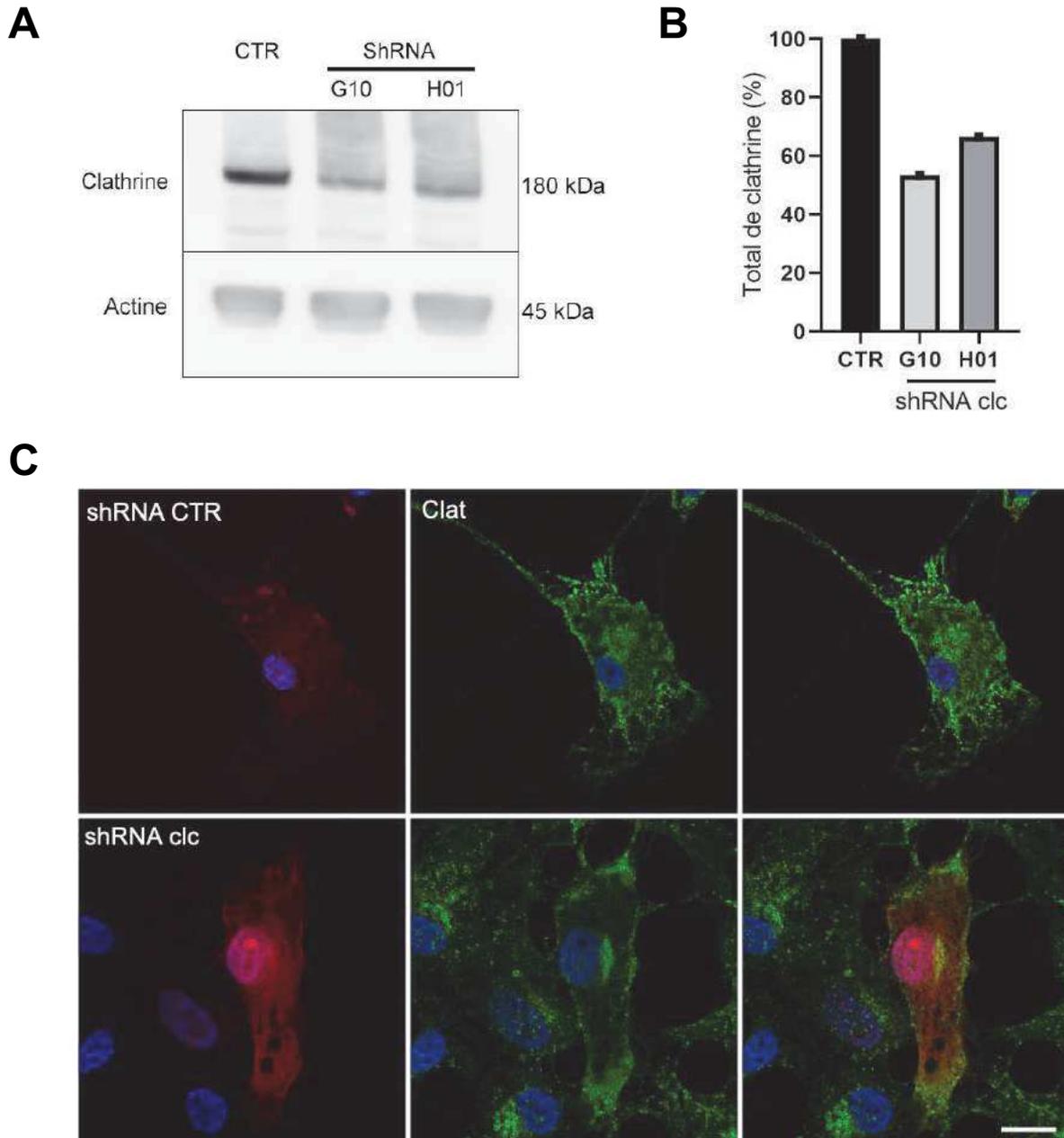


Figure 19 : Inhibition de la clathrine par utilisation de lentivirus shRNA. A) Les lysats cellulaires des cellules infectées avec le lentivirus shRNA contrôle (CTR) ou dirigé contre la clathrine (H01 et G10) sont analysés par Western blot. Les anticorps utilisés sont dirigés contre la chaîne lourde de la clathrine et de l'actine pour le contrôle. **B)** Histogramme représentant le total de clathrine en pourcentage dans les échantillons CTR, ou infectés (G10, H01) après normalisation avec le contrôle d'actine. **C)** Images de microscopie confocale représentant les tanyocytes infectés par lentivirus shRNA-clath (G10) ou shRNA-ctrl pendant 6h. Après 48h, les cellules sont marquées avec un anticorps primaire dirigé contre la chaîne lourde de la clathrine et révélées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu) pendant 30 min. Barre d'échelle 10 μ m.

J'ai ensuite testé l'impact de l'inhibition de clathrine sur la cinétique d'internalisation de la leptine fluorescente dans les tanocytes *in vitro*. J'ai cependant dû faire face à une limitation technique. En effet, au vu du nombre limité de cellules qui internalisent la leptine fluorescente (20 %) et le pourcentage de cellules infectées (60%), il est difficile d'observer individuellement un nombre suffisant de cellules doublement positives (GFP pour l'infection, leptine pour l'internalisation) pour effectuer des analyses. J'ai donc opté pour une analyse quantitative globale sur des champs larges visualisés au Nanozoomer dans lesquels j'ai quantifié le nombre de cellules infectées positives pour la leptine pour chaque condition (figure 20, A). 73 % des cellules exprimant le shRNA contrôle sont positives pour la leptine. Cette proportion est fortement réduite lorsque l'expression de clathrine est diminuée puisque seulement 17% des cellules exprimant le shRNA dirigé contre la clathrine internalise la leptine (figure 20, B).

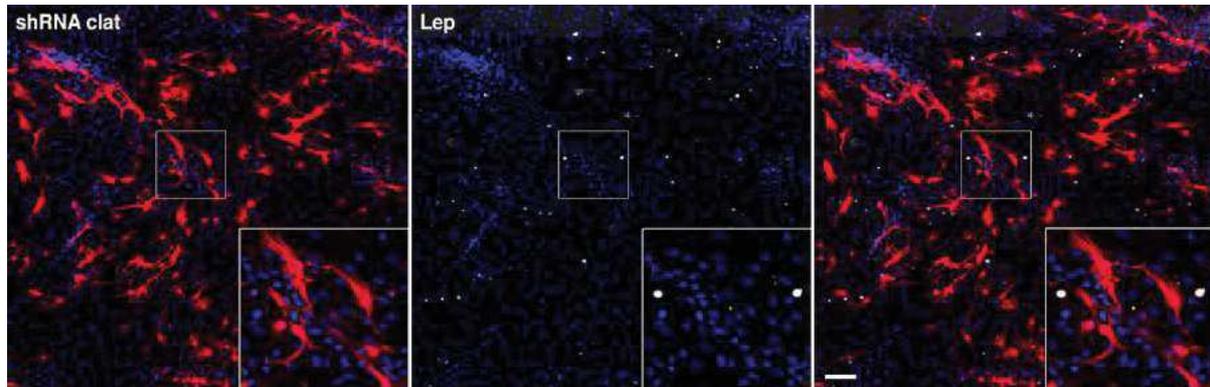
Combinés, les résultats obtenus par l'utilisation du dominant négatif de l'Epsine 15 et du lentivirus shRNA clathrine permettent d'affirmer que l'endocytose de la leptine dans les tanocytes est dépendante de la formation des puits de clathrine.

I.3. D – La dynamine est-elle impliquée dans l'endocytose de la leptine ?

Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires du processus d'endocytose de la leptine, je me suis intéressée à la dynamine, une protéine recrutée dans la voie clathrine et impliquée dans le mécanisme de fission des vésicules permettant leur détachement de la membrane plasmique²⁴⁷. Pour cela, j'ai testé le dynasore, un inhibiteur chimique de l'activité GTPase des dynamines. La cinétique d'endocytose de la leptine fluorescente indique qu'un traitement au dynasore induit une inhibition significative de l'internalisation de leptine. En effet, dès 5 minutes, l'intensité de leptine fluorescente par cellule est fortement réduite dans les cellules traitées avec le dynasore comparé aux cellules contrôles (figure 21, A et B). La quantification des images confirme ces observations, l'intensité de fluorescence dans les cellules traitées avec le dynasore est de 22% contre 40 % dans les cellules contrôles après 15 min d'incubation avec la leptine fluorescente.

Ces résultats suggèrent l'implication d'une dynamine dans le processus d'endocytose de la leptine par les tanocytes *in vitro*.

A



B

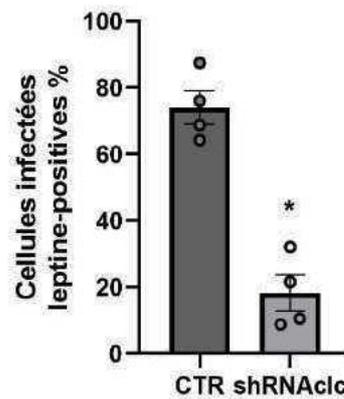


Figure 20 : L'endocytose de la leptine est dépendante de la clathrine. A) Images acquises avec le Nanozoomer, illustrant des tanycytes après infection avec le shRNA clat (rouge) pendant 5 heures. Après 24h d'expression, les cellules sont incubées avec la leptine fluorescente (Lep, 2 µg/ml, blanc) et fixées au PFA 4%. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Les carrés blancs correspondent aux zooms. Barre d'échelle 100 µm. **C)** Histogramme représentant le pourcentage moyen de cellules infectées par lentivirus shRNA-clat ou shRNA-ctrl et positives pour la leptine fluorescente. Test de Mann-Whitney ; * : $p < 0,05$.

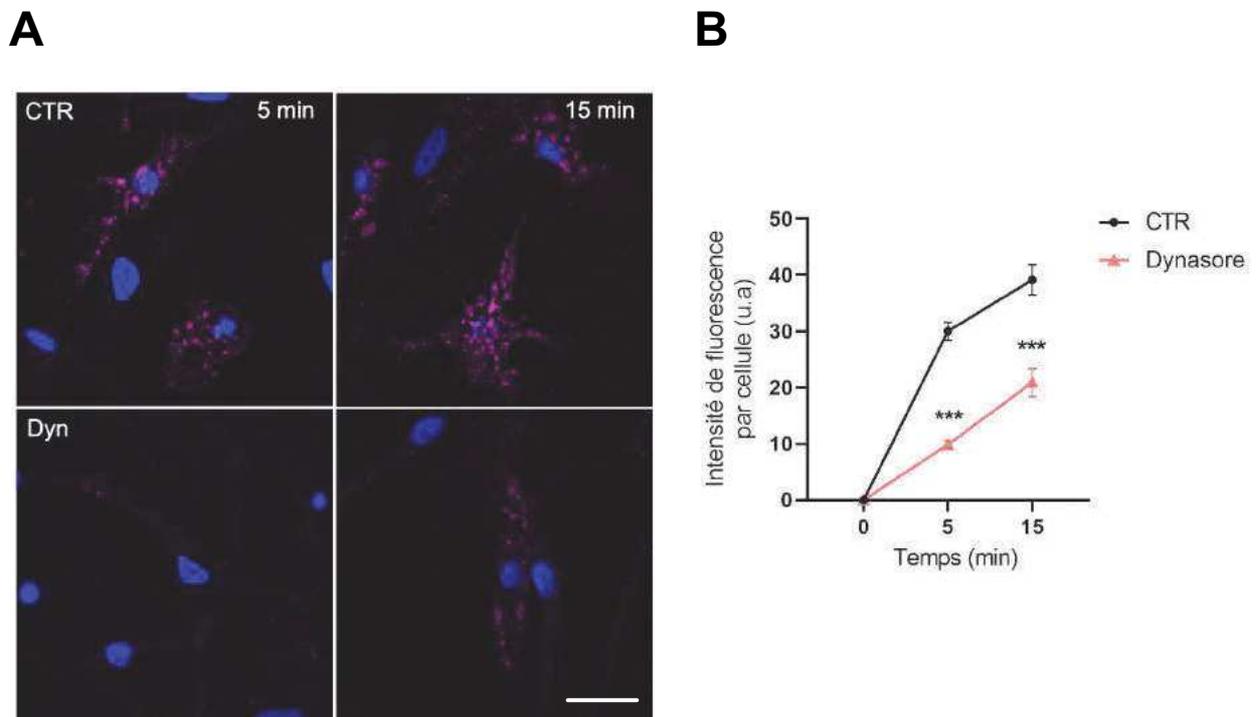


Figure 21 : Le dynasore inhibe l'internalisation de la leptine fluorescente par les tanocytes *in vitro*. **A)** Images acquises au microscope confocal montrant des tanocytes pré-traités (Dyn) ou non (CTR, DMSO) avec le dynasore (50 μ M) pendant 30 min à 37°C et incubés avec la leptine fluorescente (2 μ g/ml, violet) pendant 5 min et 15 min à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées au PFA 4% puis les noyaux marqués au Hoechst (bleu) pendant 30 min. Barre d'échelle 20 μ m. **B)** Graphique représentant l'intensité moyenne de fluorescence de la leptine (u.a) par cellule en condition CTR ou traitée avec le dynasore. u.a : unité arbitraire. Test de Mann-Whitney ; *** : $p < 0,001$.

II. TRANSPORT INTRACELLULAIRE DE LA LEPTINE DANS LES TANYCYTES HYPOTHALAMIQUES

D'un point de vue physiologique, la leptine doit être acheminée du sang vers le liquide céphalo-rachidien afin d'entrer dans l'hypothalamus. Ainsi, une fois captée par son récepteur au niveau des pieds tanyctaires en contact avec les vaisseaux fenêtrés et internalisée, la leptine doit être transportée au travers des tanyctes avant d'être sécrétée au niveau des corps cellulaires bordant le troisième ventricule. La voie de transport intracellulaire empruntée par la leptine n'a jamais été décrite dans les tanyctes. Dans ce paragraphe, je décris les expériences qui m'ont permis de découvrir une partie de cette voie de transport.

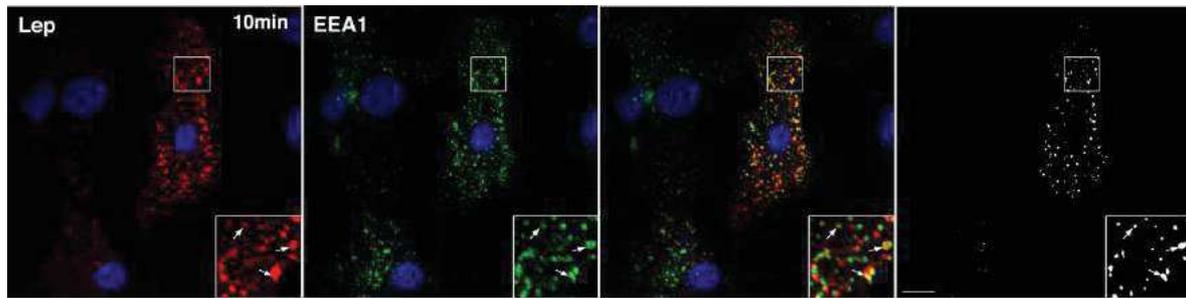
II.1. LA LEPTINE TRANSITE-T-ELLE PAR LA VOIE DES ENDOSOMES PRECOCES ?

Selon les différentes voies connues de l'endocytose, un ligand et son récepteur peuvent atteindre différents compartiments intracellulaires après internalisation. Un des premiers compartiments pouvant être rejoint est l'endosome précoce. Afin d'étudier le transit potentiel de la leptine par les endosomes précoces, j'ai observé, à différents temps d'internalisation, la distribution intracellulaire de la leptine fluorescente par rapport aux endosomes précoces en réalisant un marquage de la protéine EEA1 (*early endosome antigen-1*), un marqueur spécifique de la membrane des endosomes précoces.

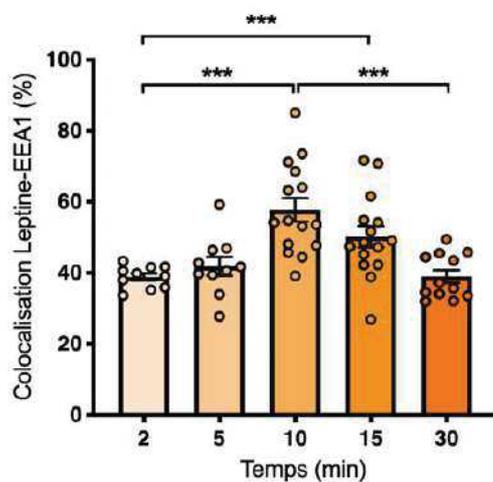
Les images de microscopie confocale indiquent la présence d'endosomes précoces dans l'ensemble de la cellule (figure 22, A). De façon intéressante, j'ai pu observer une forte colocalisation entre la leptine fluorescente et EEA1 avec un pic d'environ 58% après 10 min d'internalisation (figure 22, A et B). De manière similaire, si on analyse l'intensité moyenne de fluorescence de la leptine dans les structures positives pour EEA1, un pic maximal de fluorescence (15%) apparaît à 10 minutes pour ensuite décroître progressivement au cours du temps (figure 22, C).

Ces données indiquent que la leptine s'accumule dans ce compartiment au cours des 10 premières minutes puis en sort progressivement démontrant ainsi, qu'après son internalisation, la leptine transite par les endosomes précoces.

A



B



C

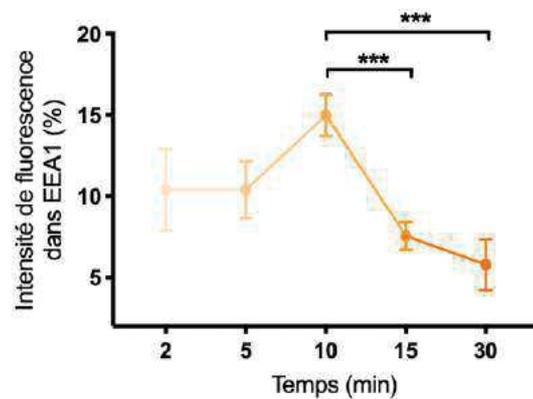


Figure 22 : La leptine transite dans les endosomes précoces. A) Images de microscopie confocale de tanyocytes incubés avec la leptine fluorescente (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, rouge) pendant 10 min à 37°C. Les cellules sont fixées au PFA 4%, perméabilisées pendant 5 min au triton 0,1% puis incubées avec un anticorps primaire anti-EEA1 (vert). La révélation se fait avec un anticorps secondaire couplé à l’Alexa-488 et les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu) pendant 30 min. Représentés en jaune, les deux marquages superposés et en blanc le masque de colocalisation obtenu avec le logiciel ICY montrant les pixels colocalisés et dont l’espace de séparation est inférieur à 3px. Les cadres blancs représentent les zooms et les flèches blanches pointent des exemples de pixels colocalisés. Barre d’échelle 10 μm . **B)** Graphique représentant le pourcentage de leptine colocalisée avec EEA1 au cours du temps. Les valeurs représentent les moyennes de colocalisation \pm SEM. **C)** Graphique représentant le pourcentage moyen de fluorescence de la leptine dans les compartiments positifs pour EEA1 \pm SEM. Test de Mann-Whitney *** $p < 0,001$. *Planche et graphique retrouvés en figure 2 (A, B C et D de l’article Nat. metabolism.*

II.2. QUELLE DESTINATION APRES LES ENDOSOMES PRECOCES ?

A la sortie des endosomes précoces, différentes voies peuvent être empruntées. Les récepteurs par exemple peuvent suivre la voie de recyclage rapide à la membrane plasmique par la voie des endosomes de recyclage mais également suivre la voie lysosomale, qui pourrait constituer la voie de sécrétion de la leptine. Je me suis d'abord demandé si la leptine transite par les endosomes de recyclage ? Pour répondre à cette question, j'ai réalisé des immunomarquages de Rab11, une petite protéine G de la famille des Rab, composant des endosomes de recyclage. Dans les tanocytes, le marquage Rab11 apparaît punctiforme et réparti de façon homogène dans toute la cellule (figure 23, A). En marquant Rab 11 sur des tanocytes ayant internalisé la leptine, j'observe une colocalisation croissante entre la leptine et Rab 11 au cours du temps avec un pic d'environ 40% après 30 min d'internalisation (figure 23, B). De plus, l'intensité de fluorescence de la leptine dans les endosomes de recyclage est également croissante au cours du temps d'internalisation atteignant un maximum à 30 minutes (figure 23, C). Ces résultats indiquent qu'après son passage dans les endosomes précoces, au moins une proportion de la leptine internalisée rejoint les endosomes de recyclage.

Je me suis ensuite demandé si la leptine pouvait également rejoindre la voie lysosomale. Pour cela, j'ai utilisé le « LysoTracker Red », une molécule fluorescente rouge qui s'accumule dans les organites acides (dont les lysosomes) des cellules vivantes. L'intensité de fluorescence étant dépendant de l'acidité des vésicules, les points les plus intenses peuvent s'apparenter aux lysosomes. Pour chaque temps d'internalisation, je détecte un taux de colocalisation entre la leptine et le LysoTracker assez similaire, autour de 20% (figure 24, A). En revanche, si on analyse l'intensité de fluorescence de la leptine dans les compartiments positifs pour le LysoTracker, nous observons une augmentation progressive pendant l'internalisation avec un maximum atteint à 30 min (figure 24, C). Ces résultats indiquent qu'après son passage dans les différents endosomes, une partie de la leptine rejoint les lysosomes.

Une partie au moins de la leptine transitant par les lysosomes, je me suis intéressée au rôle de l'acidification des vésicules dans le transport de la leptine. L'acidification vésiculaire est un phénomène impliqué dans les processus de fusion des endosomes, dans la dégradation ou encore la sécrétion lysosomale ²⁴⁸. Pour ce faire, j'ai utilisé la bafilomycine A1, un antibiotique sélectif qui empêche l'acidification des vésicules en bloquant l'activité des pompes V-ATPases. Ceci conduit à un changement de pH dans les vésicules empêchant la fusion des endosomes et lysosomes. Afin de contrôler l'efficacité de la bafilomycine sur l'acidification des vésicules, j'ai d'abord réalisé un test contrôle avec le LysoTracker qui marque les compartiments acides des cellules.

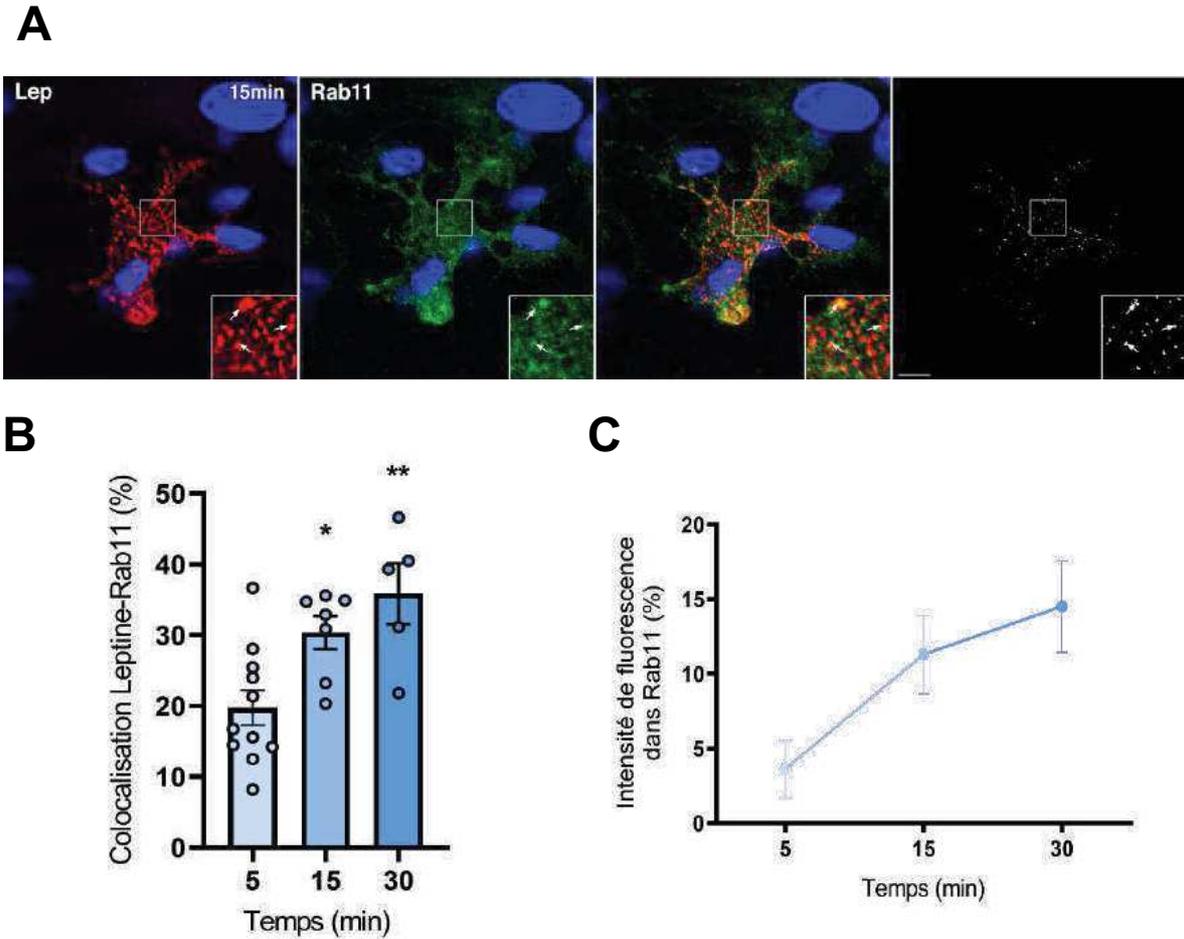
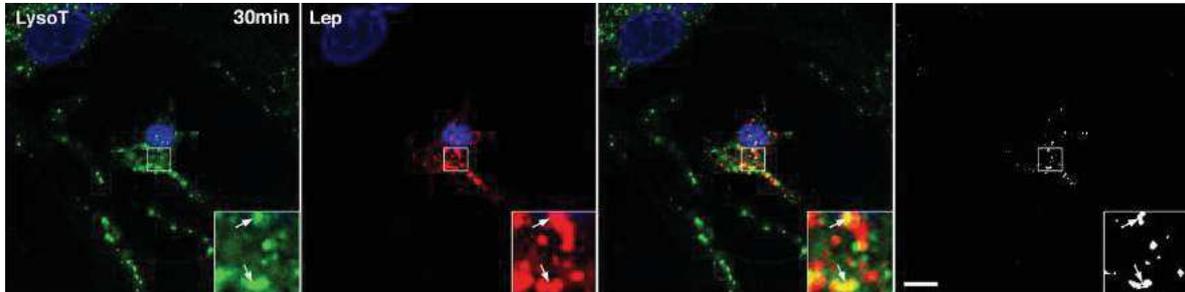
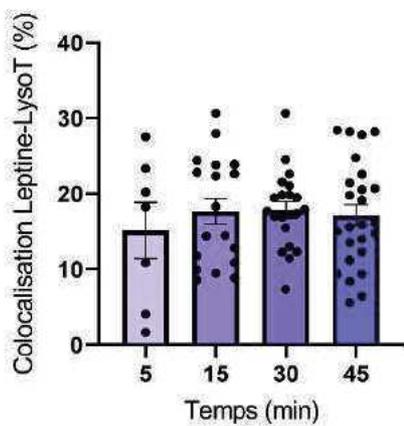


Figure 23 : La leptine transite par les endosomes de recyclage. A) Images de microscopie confocale montrant les tanycytes traités pendant 15 min avec la leptine fluorescente (2 µg/ml, rouge), fixés au PFA 4% pendant 10 min et perméabilisés au triton 0,1% pendant 5 min. Les endosomes de recyclage sont marqués avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine Rab11 (vert) puis révélés avec l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488. Les noyaux en bleu sont marqués au Hoechst pendant 30 min. Représentés en jaune, les deux marquages superposés et en blanc le masque de colocalisation obtenu avec le logiciel ICY, montrant les pixels colocalisés et dont l'espace de séparation est inférieur à 3px. Les cadres blancs représentent les zooms et les flèches blanches pointent des exemples de pixels colocalisés. Barre d'échelle 20 µm. **B)** Graphique représentant le pourcentage de leptine colocalisée avec Rab11 au cours du temps. Les valeurs représentent les moyennes de colocalisation ± SEM. **C)** Graphique représentant le pourcentage moyenne de fluorescence de la leptine dans les compartiments positifs pour Rab11 ± SEM. Test de Mann-Whitney * p<0,05 ; ** p<0,01.

A



B



C

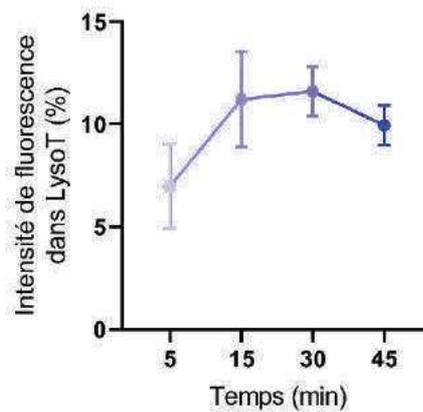


Figure 24 : La leptine transite dans les endosomes tardifs et les lysosomes. A)

Images de microscopie confocale montrant les tanycytes pré-traités pendant 15 min avec le LysoTracker (10 μ M, vert) puis incubés avec la leptine fluorescente (2 μ g/ml, rouge). En blanc le masque de colocalisation obtenu avec le logiciel ICY, montrant les objets colocalisés dont l'espace de séparation est inférieur à 3px. Les carrés représentent les zooms et les flèches blanches représentent des exemples de pixels colocalisés. Barre d'échelle 10 μ m. **B)** Graphique représentant le pourcentage de leptine colocalisée avec le LysoTracker au cours du temps. Les valeurs représentent les moyennes de colocalisation \pm SEM. **C)** Graphique représentant le pourcentage moyenne de fluorescence de la leptine dans les compartiments positifs pour le LysoTracker \pm SEM.

Une diminution de l'intensité de fluorescence du LysoTracker dans les tanocytes traités avec la bafilomycine est observée. De plus, la perte du marquage vésiculaire du LysoTracker dans les cellules traitées avec la bafilomycine en comparaison aux cellules contrôles indique son efficacité sur le blocage de l'acidification des vésicules dans les tanocytes (figure 25, A). J'ai ensuite effectué une cinétique de relargage de la leptine fluorescente. Les cellules sont pré-traitées avec de la bafilomycine (1 μ M), incubées avec de la leptine fluorescente (2 μ g/ml) pendant 15 min, lavées puis incubées dans du milieu frais pour observer son relargage au cours du temps. L'analyse de la fluorescence de leptine par cellule indique un ralentissement de la sortie de leptine dans les cellules traitées avec la bafilomycine qui reste environ à 90% contre 65% pour les cellules contrôles après 30 min de relargage (figure 25, B) suggérant un blocage du transport de la leptine et potentiellement de la sécrétion de la leptine par les tanocytes.

Ces données montrent que la leptine transite par la voie lysosomale, qui pourrait constituer le compartiment de sécrétion final de la leptine.

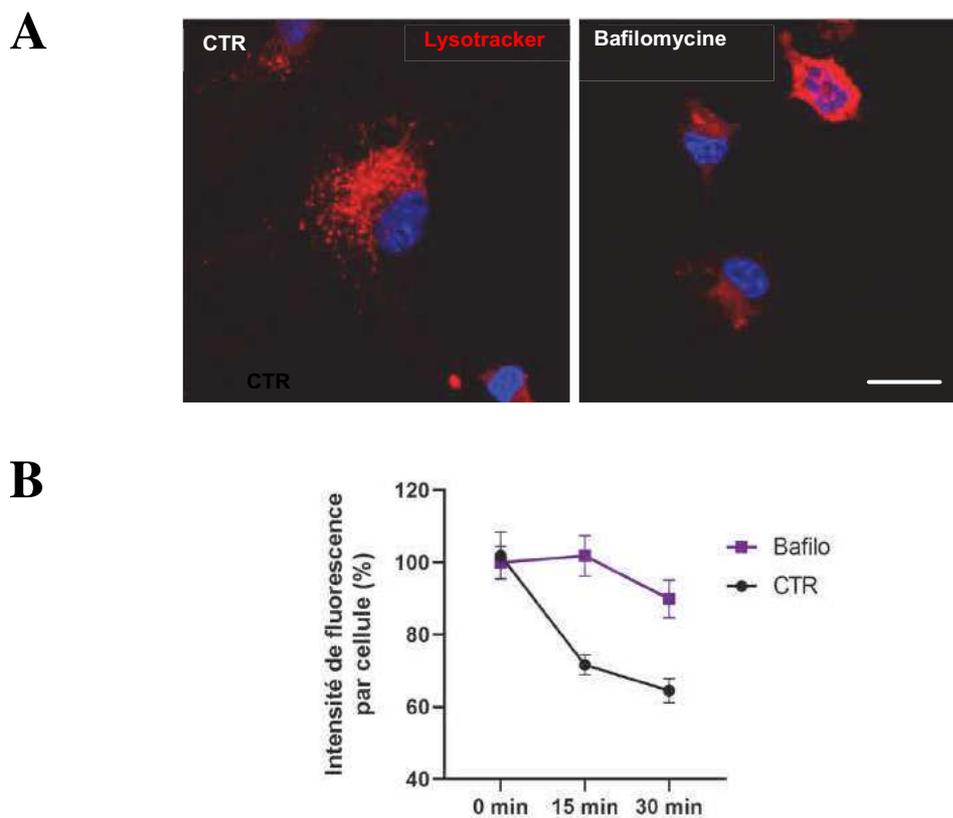


Figure 25 : La bafilomycine inhibe le transport de la leptine dans les tanocytes. A)

Images de microscope confocal montrant des cellules contrôles ou pré-traitées avec la bafilomycine (1 μ M) pendant 15 min à 37°C, puis incubées en présence du lysotracker red (100nM, rouge). Les noyaux sont marqués au Hoeschst (bleu). Barre d'échelle 20 μ m. **B)** Graphique représentant le pourcentage moyen de fluorescence de la leptine dans les cellules contrôles (noir) ou traitées avec la bafilomycine (violet) au cours du temps après la chasse (changement de milieu). Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM.

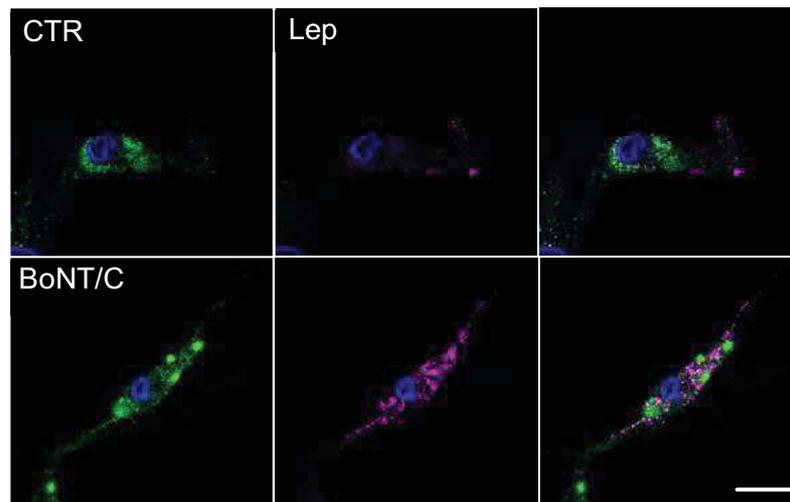
II.4. LES PROTEINES SNAREs SONT-ELLES IMPLIQUEES DANS LA SECRETION DE LA LEPTINE PAR LES TANYCYTES ?

Le compartiment intracellulaire impliqué dans la sécrétion de la leptine par les tanycytes n'est pas connu à ce jour. Les protéines SNAREs qui forment des complexes contrôlant les processus de fusion membranaire pourraient être une piste intéressante à suivre dans l'identification de ce compartiment. J'ai simplement opté pour une approche générale ici en transfectant la culture de tanycytes avec un plasmide codant pour la neurotoxine Botulique C qui clive spécifiquement les syntaxines (1A – 2 et 3) ainsi que SNAP-25 chez le rat ²⁴⁹. De plus, les données sur la souris obtenues dans le laboratoire de Vincent Prévot suggèrent que les protéines SNAREs sont impliquées dans la régulation de la prise alimentaire et la mise en place d'une intolérance au glucose (datas non publiées). Afin d'identifier l'implication de ces protéines dans la sécrétion de leptine par les tanycytes, une approche d'inhibition par l'utilisation d'un plasmide codant pour la neurotoxine Botulique C a été privilégiée. Lorsque ces protéines sont clivées, les complexes SNAREs ne sont plus formés, inhibant ainsi la fusion membranaire entre les compartiments concernés. J'ai ainsi analysé l'impact du clivage de ces protéines SNAREs sur la cinétique de sécrétion de la leptine par les tanycytes.

De façon intéressante, l'analyse des images obtenues au microscope confocal indique que la leptine est toujours détectable après 45 minutes de chasse et présente une importante intensité de fluorescence dans cellules exprimant la toxine en comparaison aux cellules contrôles (figure 26, A). En effet, l'intensité de fluorescence de la leptine décroît graduellement dans les cellules contrôles traduisant une sécrétion progressive. En revanche, dans les cellules exprimant la toxine, l'intensité de fluorescence de leptine reste constante (figure 26, B). L'ensemble de ces résultats suggère qu'une ou plusieurs protéines SNAREs cibles de la toxine botulique C (Syntaxines et/ou SNAP 25), pourraient être impliquées dans la sécrétion de la leptine par les tanycytes *in vitro*.

En parallèle, nos collaborateurs Lillois ont montré qu'un modèle de souris transgénique exprimant la neurotoxine botulique B (souris *iBot*,²⁵⁰) qui clive les protéines SNAREs synaptobrevine 1, 2 et 3 (VAMP 1, 2 et 3), développe une intolérance au glucose associée à une prise alimentaire perturbée (M. Duquenne et V. Prévot, données non publiées). Il sera donc important de tester le rôle potentiel de ces protéines VAMPs dans la sécrétion de leptine par les tanycytes. Ce point est abordé dans la discussion.

A



B

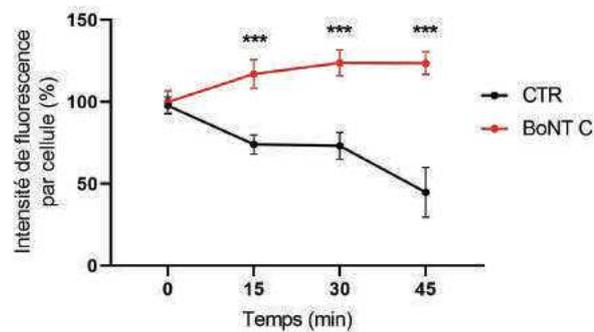


Figure 26 : La toxine botulique C bloque la sécrétion de la leptine par les tanycytes *in vitro*. **A)** Images de microscopie confocale montrant des cellules transfectées par utilisation de la lipofectamine 3000 avec un plasmide contenant la toxine botulique C pendant 5h dans l'optimem et le milieu de culture dépourvu de pénicilline et streptomycine. Après 24h, les cellules sont incubées avec la leptine fluorescente (2 µg/ml, violet) pendant 15 min à 37°C, lavées puis le milieu est changé pour observer sa sécrétion au cours du temps (15-30-45 min). Les images correspondent à une fixation des cellules après 45 min de relargage de leptine. Échelle 20 µm. **B)** Graphiques représentant l'intensité de fluorescence de la leptine par cellules au cours du temps en condition contrôle ou transfectées avec la BoNT/C. Le point 0 correspond à l'incubation avec la leptine pendant 15 min. Les valeurs représentent les moyennes de fluorescence ± SEM. Test de Mann-Whitney ; ***: $p < 0.001$.

III. IMPLICATION DES VOIES DE SIGNALISATION DANS LE TRAFIC INTRACELLULAIRE DE LA LEPTINE

III.1. L'INTERNALISATION DE LA LEPTINE EST-ELLE DEPENDANTE DE LA SIGNALISATION DU RECEPTEUR OB-R ?

Dans le chapitre précédent, j'ai montré que la leptine se fixe sur son récepteur Ob-R et que ce complexe est ensuite internalisé par la voie dépendante de la clathrine dans les tanocytes *in vitro*. Lors de la fixation de la leptine sur le récepteur Ob-R, la protéine kinase JAK (Janus Tyrosine Kinase) par sa trans-phosphorylation va initier l'activation de cascades de phosphorylations dont les voies MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) et STAT (*Signal Transducer and activator of transcription*) nécessaires pour réguler la prise alimentaire et l'homéostasie énergétique.

Afin d'étudier l'implication potentielle de ces voies de signalisation dans la transcytose de la leptine, j'ai utilisé le mutant LAN de la leptine²⁵¹. Cet outil, fourni par notre collaboratrice Julie Dam (Institut Cochin, Paris), couplé au fluorophore D2 est très intéressant, car cette leptine mutée est un antagoniste qui se fixe sur le même site CRH2 du récepteur que la leptine bioactive. Les mutations de LAN (L39A D40A F41A) ne sont pas sur le site orthostérique lui permettant de se lier à Ob-R avec la même affinité que la leptine bioactive mais n'active pas les voies de signalisation JAK-STAT associées au récepteur Ob-R.

Dans un premier temps, j'ai simplement effectué une cinétique d'internalisation de LAN dans les tanocytes en culture. A l'instar de la leptine bioactive non mutée, j'ai pu observer que le LAN fluorescent est internalisé et s'accumule dans les tanocytes en culture (figure 27, A), montrant ainsi que l'internalisation de la leptine est indépendante de la signalisation de son récepteur.

III.2. LA SIGNALISATION DU RECEPTEUR OB-R REGULE-T-ELLE LE TRANSPORT DE LEPTINE ?

J'ai montré que l'internalisation de leptine par les tanocytes est indépendante des voies de signalisation déclenchées par l'activation de son récepteur. On peut également se demander si ces voies de signalisation ne seraient pas impliquées dans la régulation du transport de leptine au sein de la cellule et in fine de son relargage ?

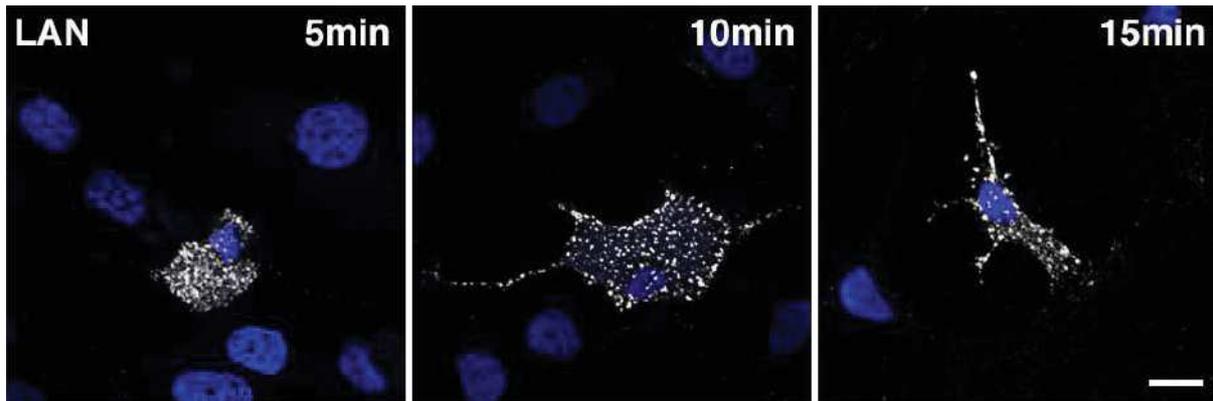


Figure 27 : Internalisation de la leptine mutée LAN par les tanocytes *in vitro*. Image de microscopie confocale de tanocytes maintenus dans du milieu de restriction pendant 48h puis incubés avec la leptine fluorescente mutée LAN (2 µg/ml) pendant 5, 10 et 15 min à 37°C. Les cellules sont fixées au PFA 4% pendant 10 min, lavées 3 fois au PBS 1X, et les noyaux (bleu) sont marqués au Hoechst pendant 30 min. Barre d'échelle 10 µm.

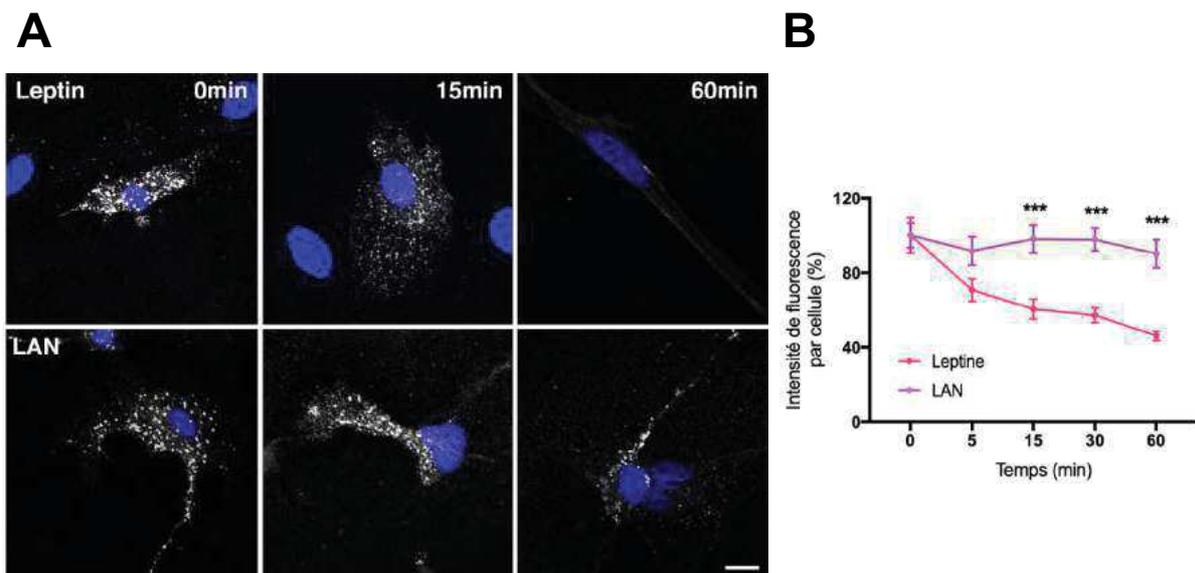


Figure 28 : Le relargage de la leptine par les tanocytes *in vitro* dépend des voies de signalisation. **A)** Images de microscopie confocale montrant les tanocytes incubés avec la leptine fluorescente (2 µg/ml, blanc) ou la leptine mutée LAN fluorescente (2 µg/ml, blanc) pendant 15 min (point 0 min) à 37°C, lavés puis incubés avec du milieu frais pendant 15 et 60 min, pour observer le relargage de la leptine au cours du temps. Barre d'échelle 10 µm. **B)** Graphique représentant l'intensité globale de fluorescence de la leptine fluorescente ou du LAN par cellule au cours du temps (min). Les valeurs représentent les moyennes de fluorescence ± SEM. Test de Mann-Whitney *** p<0,001. *Planche et graphique insérés dans la figure supplémentaire 2 de l'article Nat.metabolism,*

Pour répondre à cette question, j'ai utilisé l'expérience de « chasse ». Les cellules sont incubées en présence de leptine fluorescente (2 µg/ml) ou de LAN (2 µg/ml) pendant 15 min à 37°C. Après un lavage rapide, les cellules sont incubées dans un milieu de culture frais sans leptine (temps 0) et je quantifie l'évolution de la fluorescence de la leptine jusqu'à 60 minutes (5, 15, 30, 60 min). Comme démontré avant, la leptine et le LAN sont indifféremment internalisés par les tanocytes. En revanche, alors que l'intensité totale de fluorescence de la leptine décroît avec le temps, celle du LAN reste constante (figure 28, A, B). Ces résultats indiquent d'une part, qu'une fois transportée la leptine est sécrétée par les tanocytes, ce qui explique la diminution du marquage. En effet, lorsque je dose par méthode ELISA la leptine relarguée dans le milieu de culture à différents temps de mon expérience de chasse, j'observe une nette augmentation de la quantité de leptine (voir figure 15, E) démontrant bien que les tanocytes sécrètent la leptine préalablement internalisée. D'autre part, mes données indiquent qu'à l'inverse le LAN n'est pas sécrété suggérant que l'activation des voies de signalisation via Ob-R est essentielle à la sécrétion de leptine par les tanocytes.

Nos collaborateurs ont suggéré l'implication potentielle de la voie ERK dans le relargage de la leptine du sang vers le LCR par les tanocytes *in vivo*⁷². Je me suis alors demandé si cette voie contrôle le trafic vésiculaire de leptine dans les tanocytes *in vitro*. Pour cela j'ai choisi une approche inhibitrice en utilisant la molécule U0126 (Sigma) un inhibiteur de MEK1/2, une protéine kinase activatrice qui se trouve en amont de ERK1/2.

Dans un second temps, je me suis intéressée à l'impact de l'inhibition de la voie ERK sur le transport et la sécrétion de la leptine dans les tanocytes en culture. Pour ce faire, les cellules sont prétraitées avec le U0126 (10 µM) ou du DMSO, incubées avec la leptine (2 µg/ml) pendant 15 minutes, lavées et incubées avec du milieu frais pour « chasser » la leptine au cours du temps. Dans les cellules traitées au DMSO, la fluorescence de leptine, qui s'est accumulé dans les tanocytes pendant les 15 minutes d'incubation (point 0 min, 100%), baisse progressivement atteignant 40% après 60 minutes (figure 29, B et C). Cette baisse de fluorescence coïncide avec une augmentation de la quantité de leptine dosée par ELISA dans le milieu extracellulaire, confirmant bien la sécrétion de la leptine internalisée (figure 29, A). En revanche, un traitement par le U0126 prévient la décroissance de fluorescence de la leptine au cours du temps et inhibe fortement la quantité de leptine détectée dans le milieu extracellulaire (figure 29, B et C).

Je peux conclure ici, qu'à l'instar de la leptine mutée LAN, l'inhibition de la voie ERK empêche la sécrétion de leptine internalisée par les tanocytes. L'ensemble de ces données indique que la signalisation du récepteur Ob-R est essentielle à la sécrétion de leptine alors qu'elle n'est pas nécessaire pour son internalisation.

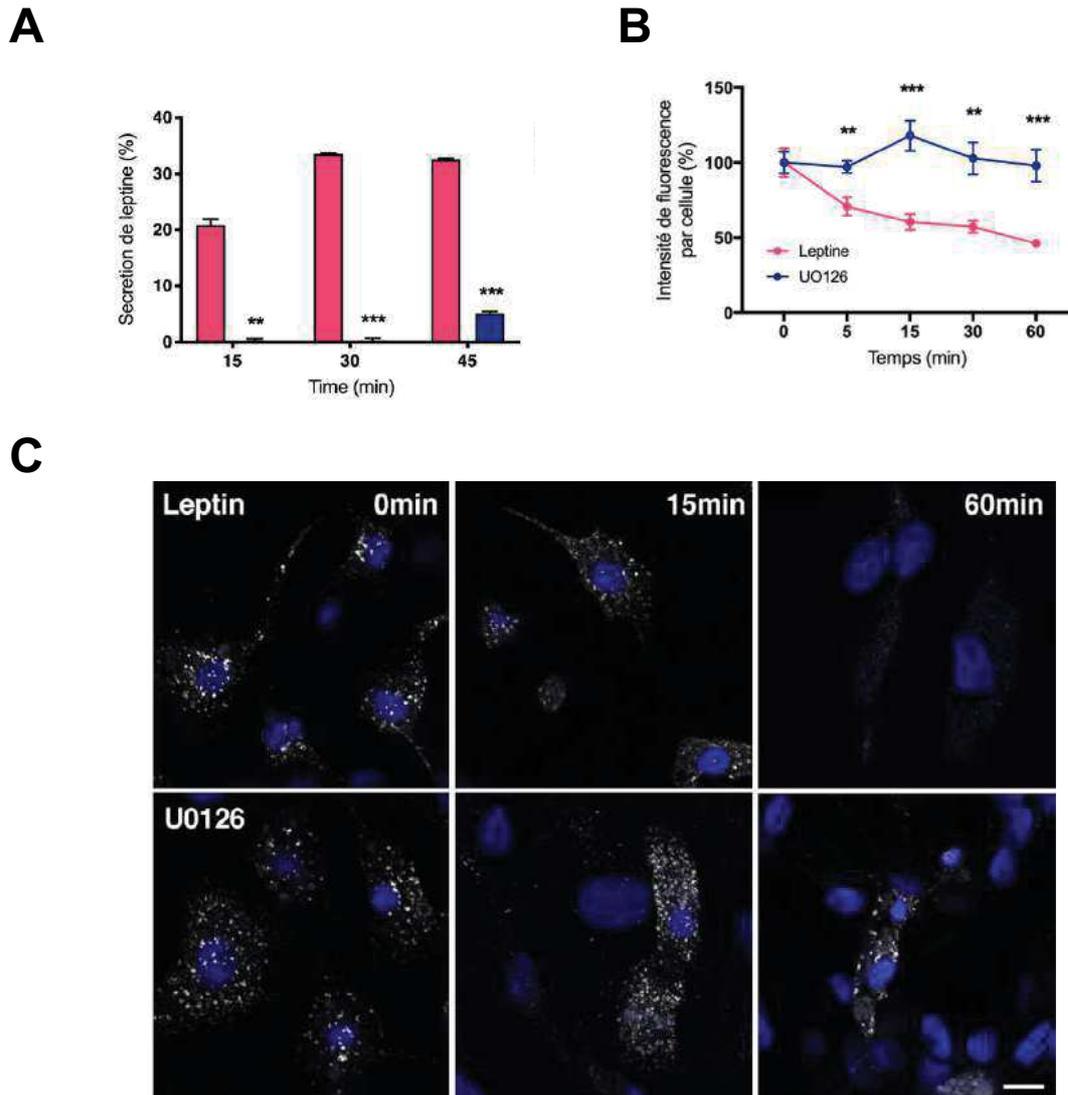


Figure 29 : La signalisation de Ob-R est impliquée dans le relargage de la leptine.

A) Graphique représentant le pourcentage de leptine sécrétée dans le milieu par les tanycytes après un dosage Elisa. Pour chaque échantillon, une boîte de 10 cm de tanycytes à confluence est utilisée. Les cellules sont placées en restriction pendant 48h puis prétraités avec du DMSO (CTR) ou l'inhibiteur U0126 (10 μ M) pendant 15 min et incubés avec la leptine (2 μ g/ml) pendant 15 min (point 0 min) à 37°C, lavés puis incubés avec du milieu frais pendant différents temps (15, 30 et 45 min). **B)** Graphique représentant l'intensité globale de fluorescence de la leptine dans les cellules CTR ou traitées avec le U0126 au cours du temps. Les valeurs représentent les moyennes de fluorescence \pm SEM. **C)** Tanycytes représentés après prétraitement au DMSO ou U0126 (10 μ M) pendant 15 min puis incubés avec la leptine fluorescente (2 μ g/ml, blanc) pendant 15 min à 37°C. Après un lavage rapide, les cellules sont incubées avec du milieu frais pendant 15 et 60 min puis fixées. Les noyaux sont ensuite marqués au Hoechst (bleu) pendant 30 min. Barre d'échelle 10 μ M. Test de Mann-Whitney ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. La planche et le graphique sont retrouvés en figure supplémentaire 2 du Nat.metabolism.

Est-ce que le blocage des voies de signalisation induites par l'activation d'Ob-R empêche le processus de sécrétion lui-même ou bien est-ce le transport de leptine qui est perturbé, l'empêchant de rejoindre le compartiment de sécrétion ? Pour tenter d'aborder cette question, j'ai d'abord voulu vérifier si le transport de la leptine vers les endosomes précoces était normal.

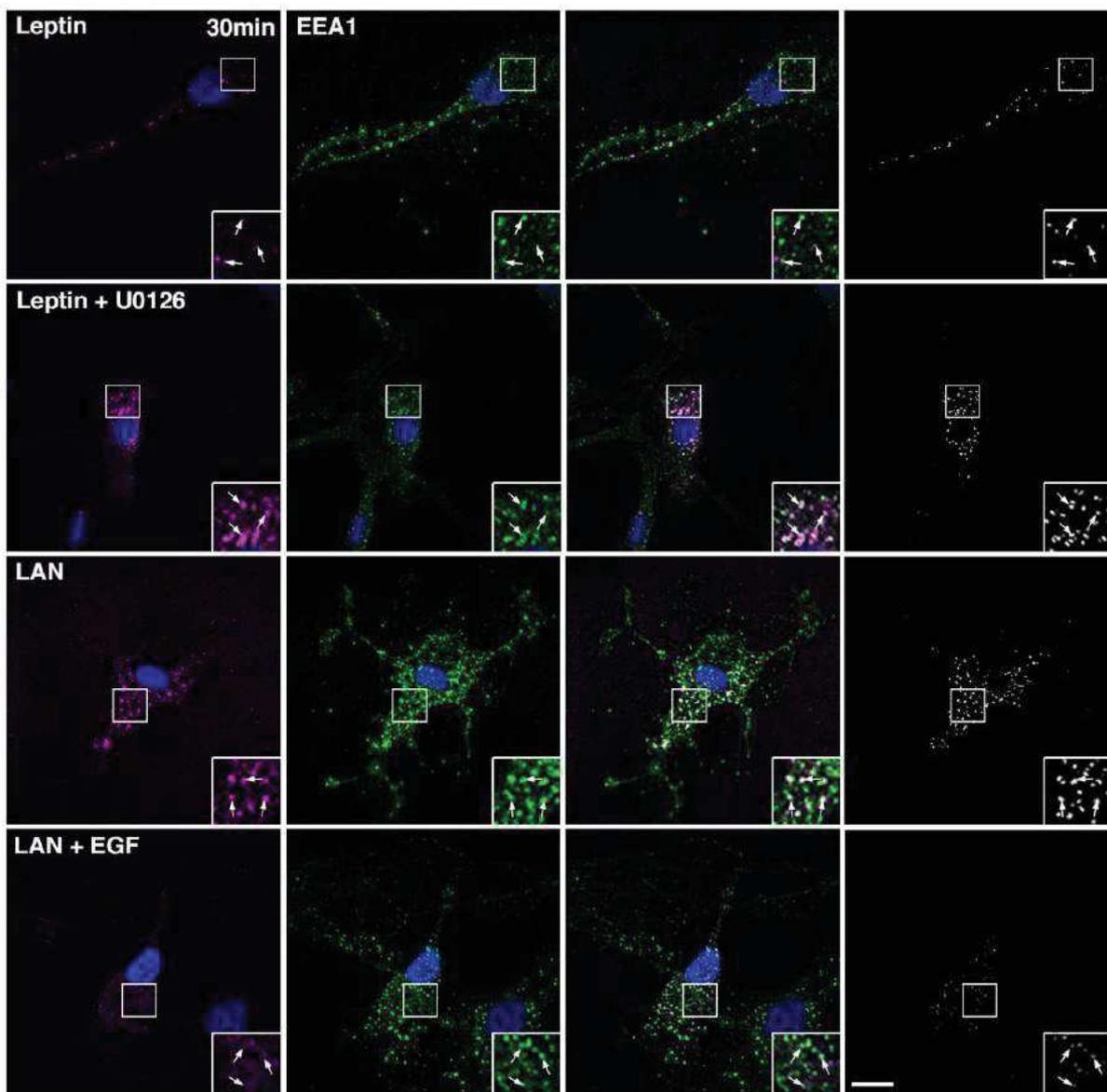
De façon intéressante, j'ai pu observer que l'entrée de la leptine dans les endosomes précoces n'est pas perturbée mais qu'en revanche, la leptine semble y rester bloquer (figure 30). En effet, l'analyse au cours du temps du transport du LAN indique que l'intensité moyenne de fluorescence du LAN dans les compartiments positifs pour EEA1 reste constante au cours du temps contrairement à celle de la leptine non mutée, suggérant que le LAN puisse être séquestré dans les endosomes précoces (figure 30, A et C). J'observe exactement les mêmes résultats en bloquant la voie ERK. En effet, l'inhibition de MEK1/2 par un traitement des tanocytes avec l'U0126 conduit à l'accumulation de leptine fluorescente dans les endosomes précoces positifs pour EEA1 (figure 30, C).

L'ensemble de ces données indique que la signalisation du récepteur OB-R contrôle le trafic intracellulaire de la leptine et plus spécifiquement, le transport depuis les endosomes précoces.

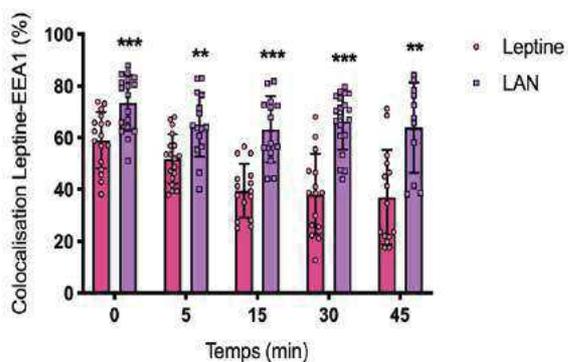
J'ai ensuite voulu vérifier si la sortie du LAN fluorescent des endosomes précoces pouvait être restaurée par une activation directe de la voie de signalisation EGFR-ERK dans les tanocytes. En effet, nos collaborateurs avaient montré que l'EGF pouvait avoir un effet sur le transport de la leptine vers le cerveau chez les souris DIO et induire une perte de poids chez ces animaux en restaurant le phénotype des souris contrôles⁷². Pour ce faire, les cellules sont prétraitées avec l'EGF (10 ng/ml) pendant 15 min puis incubées avec la leptine mutée LAN fluorescente (2 µg/ml) pendant 15 min à 37°C. Les tanocytes sont ensuite lavés et incubés avec du milieu de culture frais pour observer la sortie de la leptine au cours du temps en présence de l'EGF. Le traitement à l'EGF restaure le trafic du LAN muté fluorescent et sa sortie des endosomes précoces (figure 30, A). En effet, l'analyse de l'intensité de fluorescence du LAN montre une baisse du signal au cours du temps (figure 30, C) indiquant, comme observé pour la leptine fluorescente, sa sécrétion par les tanocytes en présence de l'EGF.

Ces résultats suggèrent que le transport transcellulaire de la leptine dans les tanocytes requiert la voie EGFR-ERK et que l'activation de cette voie est dépendante de l'activation du récepteur Ob-R.

A



B



C

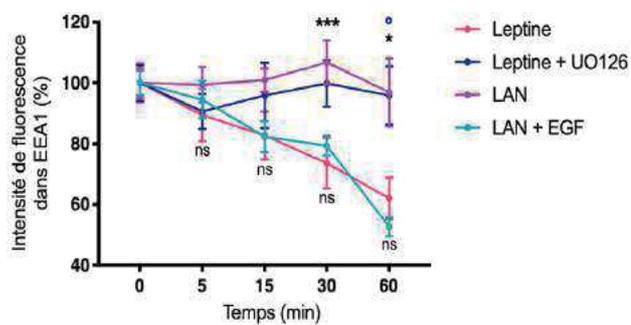
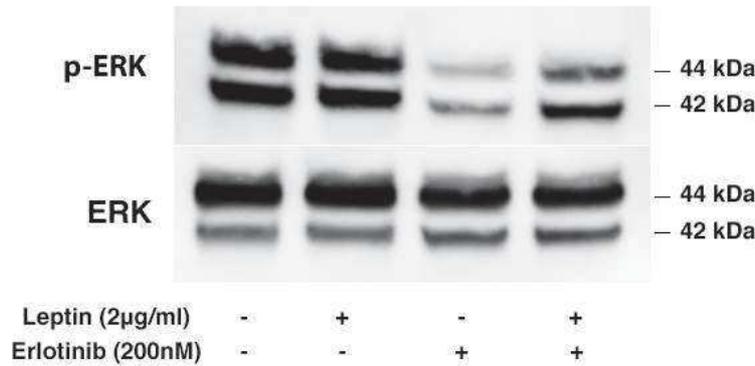


Figure 30 : L'inhibition de ERK1/2 bloque la sortie de la leptine des endosomes précoces. A) Image de microscopie confocale de tancytes CTR ou pré-traités avec l'inhibiteur UO126 (10 μ M ; leptine) ou l'EGF (10 ng/ml ; LAN) et incubés avec la leptine fluorescente (2 μ g/ml) ou la leptine mutée LAN fluorescente (2 μ g/ml) pendant 15 min à 37°C (point 0 min). Les cellules sont lavées et incubées dans du milieu frais pendant différents temps (5-15-30-60 min). Après fixation et perméabilisation les cellules sont marquées avec un anticorps primaire anti-EEA1 (vert), et révélées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Les noyaux (bleu) sont marqués au Hoechst. En blanc est représenté le masque de colocalisation obtenu avec le logiciel ICY. Les flèches blanches représentent des exemples de pixels colocalisés. Barre d'échelle 10 μ m. **B)** Graphique représentant le pourcentage de colocalisation de la leptine fluorescente et du LAN fluorescent avec les compartiments positifs pour EEA1. **C)** Graphique représentant le pourcentage de leptine fluorescente ou de LAN fluorescent dans les compartiments positifs pour EEA1 pour les cellules traitées ou non avec le UO126 (leptine) ou l'EGF (LAN) au cours du temps. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM. Test de Mann-Whitney ; ns : non significatif ; * : $p < 0,1$; ** : $p < 0,01$ ***: $p < 0.001$. *Planche en figure supplémentaire 2 de l'article Nat. Metabolism.*

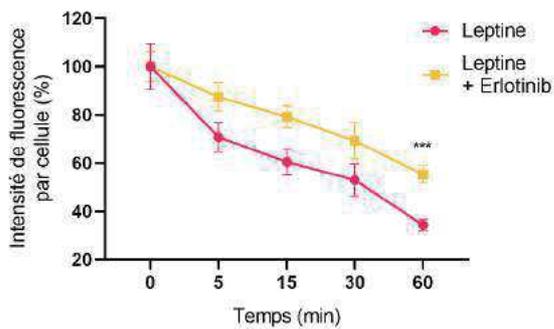
III.3. L'ACTIVATION DE LA VOIE ERK ET DE LA VOIE DE L'EGFR SONT-ELLES NECESSAIRES POUR LE TRANSPORT DE LA LEPTINE DANS LES TANCYTES ?

Afin d'aller plus loin dans la compréhension du lien qui existe entre le transport de la leptine dépendant de la voie ERK et l'action de l'EGF sur celui-ci, j'ai utilisé l'erlotinib, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du récepteur EGF, empêchant ainsi sa phosphorylation intracellulaire et l'activation des voies sous-jacentes. Dans un premier temps, je me suis intéressée à son action sur l'activité de la voie ERK, que j'ai vérifiée par la technique de Western blot. Les cellules sont prétraitées ou non avec erlotinib pendant 15 min puis incubées ou non avec la leptine pendant 15 min. L'analyse par Western blot montre que, lors d'un traitement avec l'erlotinib, la phosphorylation de ERK est inhibée suggérant son action inhibitrice sur la voie EGFR qui est en lien étroit avec la voie ERK. J'observe également une plus faible activation de la voie ERK induite par la leptine quand les cellules traitées avec l'erlotinib suggérant un lien entre les voies induites par le récepteur à la leptine et le récepteur à l'EGF (figure 31, A). J'ai ensuite réalisé une cinétique d'exocytose de la leptine fluorescente au cours du temps dans les tancytes prétraités avec erlotinib (200 nM) pendant 15 min. J'observe que la baisse de fluorescence au cours du temps due à la sécrétion de leptine est ralentie dans les cellules prétraitées en comparaison avec les cellules contrôles (58 % restant après 60 min de chasse versus 32 % ; figure 31, B). L'analyse de l'intensité de leptine dans les endosomes précoces indique un léger ralentissement de sa sortie des endosomes précoces mais qui reste non significatif, (figure 31, C), suggérant que le ralentissement de la sécrétion de leptine induit par l'erlotinib n'est pas spécifiquement la conséquence d'un blocage de transport au niveau des endosomes précoces. L'ensemble de ces données suggère un lien entre le transport de leptine et l'activation du récepteur à l'EGF.

A



B



C

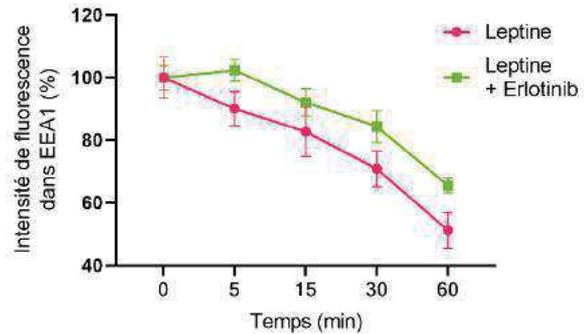


Figure 31 : L'inhibition de la voie de l'EGFR ralentit la sortie de la leptine des tanocytes. **A)** Détection de l'activation de la voie ERK par Western blot. Les tanocytes sont pré-traités avec l'inhibiteur de l'EGFR Erlotinib (200 nM ; 30 min) ou du DMSO et incubés ou non avec la leptine (2 µg/ml) pendant 15 min puis lysées. Le total de protéine ERK est utilisé comme contrôle. **B)** Graphique représentant l'intensité moyenne de fluorescence de la leptine dans les tanocytes traités avec Erlotinib (jaune) ou DMSO (leptine, rose) au cours du temps. **C)** Graphique représentant l'intensité moyenne de fluorescence de leptine dans les endosomes précoces marqués avec EEA1 en condition contrôle (Leptine, rose) ou traitée avec l'inhibiteur Erlotinib (vert). Les valeurs représentent les moyennes ± SEM. Test de Mann-Whitney ; ***: p<0.001.

IV. CONCLUSION ET ARTICLE

Il a été montré chez la souris que la leptine est acheminée du sang jusqu'aux neurones du noyau arqué par les tanocytes de l'EM participant ainsi au contrôle du métabolisme énergétique. Cependant, la régulation de son transport ainsi que les mécanismes sous-jacents restent inconnus.

Cette partie de mon travail a permis de mettre en avant, *in vitro*, une internalisation de la leptine indépendante de l'activité de son récepteur Ob-R, et dépendante des vésicules de clathrine et de la dynamine. J'ai également montré que la leptine, lors de son trafic intracellulaire, rejoint les endosomes précoces, puis qu'une partie de la leptine transite *via* les endosomes de recyclage et les lysosomes. De plus, j'ai montré que la voie ERK dépendante de Ob-R est nécessaire pour le trafic post-endosomes précoces démontrant un lien entre la signalisation Ob-R et le contrôle du trafic intracellulaire de la leptine. L'ensemble contribue à mieux comprendre la voie empruntée par la leptine dans les tanocytes, et éclaire les acteurs de ce transport important dans le contrôle de la balance énergétique.

Une partie de mes résultats a été incorporée dans une publication collaborative actuellement en révision à *Nature Metabolism* pour laquelle je suis co-deuxième auteur (Duquenne et al., Leptin enters the brain through a LepR:EGFR shuttle in tanocytes to regulate peripheral lipogenesis and pancreatic β -cell function). L'ensemble de mes autres données servira à un second article que je signerai en premier auteur et qui portera sur la caractérisation de la voie de transport et de sécrétion de la leptine dans les tanocytes.

Dans ce premier article, les expériences de localisation du récepteur à la leptine sont présentées figure 1F et celles montrant la cinétique d'endocytose de la leptine et sa localisation dans les endosomes précoces sont décrites figure 2 A, B, C et D. Enfin, mes données sur le rôle de la signalisation ERK dans le transport de la leptine à la sortie des endosomes précoces (LAN vs leptine) sont retrouvées dans la figure supplémentaire 2 (panels A-B-C-D). Plus généralement, l'étude développée dans cet article se focalise sur le rôle fonctionnel du récepteur à la leptine dans la régulation du métabolisme énergétique. Grâce à la combinaison d'approches *in vitro* et *in vivo*, plusieurs notions importantes ont pu émaner de cette collaboration. Nous observons non seulement que le récepteur à la leptine est présent dans les tanocytes mais également qu'il est fonctionnel. Nous mettons en évidence une activation précoce de la voie de l'EGFR par la leptine et montrons une association entre les deux récepteurs LepR-EGFR qui activent la voie ERK impliquée dans la transcytose de la leptine vers le LCR.

De plus, l'utilisation d'un nouveau modèle de souris transgénique invalidée pour le récepteur à la leptine (LepR^{tanKO}) montre que l'absence du récepteur spécifiquement dans les tanocytes entraîne chez les souris une augmentation de la prise alimentaire et une accumulation des lipides dans les adipocytes, conduisant à terme à une insulino-résistance.

Cette étude éclaire l'importance du transport tanocytaire de la leptine à travers l'éminence médiane, un processus qui semble jouer un rôle vital dans le contrôle central de la fonction des cellules β -pancréatiques, l'accumulation de lipides périphériques et l'homéostasie du glucose, soulevant de nouvelles pistes thérapeutiques pour les pathologies métaboliques.

Submission: November 12, 2019
Nature Metabolism
Research Article

Leptin enters the brain through a LepR:EGFR shuttle in tanycytes to regulate peripheral lipogenesis and pancreatic β -cell function

Manon Duquenne¹, Cintia Folgueira^{2#}, Cyril Bourrouh^{3#}, Marion Millet^{4,#}, Anisia Silva^{5#}, Jérôme Clasadonte^{1#}, Monica Imbernon¹, Soumya Kusumakshi⁶, Emilie Caron¹, S. Rasika¹, Nathalie Jouy^{1,11}, Asturo Oishi⁵, Massimiliano Mazzone⁷, Eric Trinquet⁸, Jan Tavernier⁹, Stéphane Ory⁴, Ralf Jockers⁵, Markus Schwaninger¹⁰, Ulrich Boehm⁶, Ruben Nogueira², Jean-Sébastien Annicotte³, Stéphane Gasman^{4&}, Julie Dam^{5&}, Vincent Prévot^{1&*}

¹ Laboratory of Development and Plasticity of the Neuroendocrine Brain, Jean-Pierre Aubert Research Centre, Inserm, University of Lille, CHU Lille, UMR_S1172, F-59000 Lille, France

² CIMUS, Universidade de Santiago de Compostela-Instituto de Investigación Sanitaria, Santiago de Compostela, 15782, Spain- CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn), 15706, Spain

³ Univ. Lille, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR 8199 - EGID, F-59000 Lille, France

⁴ Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, F-67000 Strasbourg, France.

⁵ Institut Cochin, Inserm U1016, CNRS UMR 8104, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁶ Experimental Pharmacology, Center for Molecular Signaling (PZMS), Saarland University School of Medicine, 66421, Homburg, Germany

⁷ Laboratory of Tumor Inflammation and Angiogenesis, Center for Cancer Biology, VIB, Department of Oncology, KU Leuven, Leuven, B3000, Belgium

⁸ Cisbio Bioassays, Parc Technologique Marcel Boiteux, BP84175, F-30200 Codolet, France

⁹ VIB-UGent Center for Medical Biotechnology, Gent, Belgium.

¹⁰ Institute for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology, University of Lübeck, Lübeck, Germany

¹¹ Flow core Facility, Bioluminescence Center of Lille, campus HU F-59000 Lille, France

These authors contributed equally to this work

& These authors jointly supervised this work

Running Title: Tanycytes are conduits for peripheral metabolic signals into the brain

* Corresponding author: Vincent Prévot, Ph.D., Inserm 1172, Bâtiment Biserte,
Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France
Tel : +33 612-90-38-76
Fax : +33 320-53-85-62
E-mail : vincent.prevot@inserm.fr

Number of text pages: 47

Number of figures: 4

Number of Supplementary Figures: 4

Number of tables: 0

Number of words (abstract): 142

Number of words (Text): 5800

SUMMARY

Metabolic health depends on the brain's ability to control food intake and nutrient use or storage, a process that requires peripheral hormones such as leptin to enter the brain and mobilize regulatory circuits. However, this process becomes dysfunctional in metabolic diseases. We have previously shown that hypothalamic tanycytes shuttle leptin across the blood-brain barrier. Here we show that tanycytes express functional leptin receptor (LepR), and that their transcytotic transport of leptin into the brain involves the activation of a LepR:EGFR complex. Selectively deleting LepR in tanycytes blocks this transport, increases food intake and lipid storage, and triggers glucose intolerance by dampening insulin secretion by pancreatic β -cells, with concomitant alterations in sympathetic nervous system elements. The LepR:EGFR-dependent transport of leptin into the brain by tanycytes could thus play a critical role in the pathophysiology of diabetes in addition to obesity, with therapeutic repercussions.

INTRODUCTION

Type 2 diabetes (TD2) is a common multigenic disorder affecting > 9% of the world's population ¹. However, the characteristics of this disorder do not appear to be homogeneous across the globe. In Asia, for example, TD2 develops in a much shorter time, in a younger age group, and in people with a much lower body-mass index (BMI) than in patients from other parts of the globe ². In addition, while Asian population studies suggest that a decrease in insulin production by β -cells is crucial for the development of diabetes, impaired insulin sensitivity, i.e. the ability to modulate glucose levels in response to circulating insulin, appears to be a prerequisite for incident diabetes in other ethnicities, including Europeans ^{2,3}.

Leptin is a 16-kDa peptide hormone produced by adipocytes. It functions as an afferent signal in a negative feedback loop that not only controls feeding and maintains energy homeostasis ⁴⁻⁹, but also regulates glucose metabolism ^{10,11} and substrate fluxes ^{12,13} by activating leptin receptor (LepR) signaling in the brain. How circulating leptin is transported into the central nervous system to reach its target neurons remains an enigma. However, an increasing body of evidence points to the median eminence, a structure in the basal hypothalamus adjacent to the arcuate nucleus (ARH), as a key entrance point for leptin into the metabolic brain ¹⁴⁻¹⁶.

The median eminence is a circumventricular organ that acts as a brain window at which circulating signals, including metabolic hormones, enter the brain by passive diffusion through the fenestrated or porous endothelium of pituitary portal blood capillaries ^{17,18}. In addition to neurons of the ARH that reside outside the blood-brain barrier, in the ventromedial ARH (vmARH) ^{19,17}, neurons that extend dendrites into the median eminence can thus also directly sense this blood-borne information ²⁰. However, tanycytes, a specialized glial cell type lining the floor of the third ventricle in the median eminence, form a blood-cerebrospinal-fluid (CSF) barrier that prevents these circulating metabolic signals from reaching deeper hypothalamic structures ¹⁴⁻¹⁶. In order to reach more distant targets such as the dorsomedial ARH (dmARH), these signals therefore require an active transport mechanism to cross the tanycytic blood-CSF barrier ^{21,22}.

In a previous study, we have shown that blood-borne leptin extravasates from the fenestrated capillaries of the median eminence and that tanycytes act as a shuttle for its transport into the CSF via an ERK-dependent signaling pathway ²³. However, the putative involvement of LepR in this process has remained unclear, with some authors questioning the expression of LepR by tanycytes ^{24,25}.

Here, by employing multiple *in vitro* and *in vivo* approaches and several mouse models, we demonstrate that tanycytes do indeed express functional LepR, and that this LepR expression is required for the transcytotic transport of peripheral leptin into the CSF, a process that appears to play a vital role in the central control of pancreatic β cell function, lipid accumulation and subsequent glucose homeostasis.

RESULTS

LepR is expressed and active in tanycytes of the median eminence

In order to probe the expression of LepR in tanycytes of the median eminence, we first searched for essential tools such as antibodies capable of reliably detecting LepR protein. We characterized the recently described biologically active allosteric antibody XPA, which was developed to target mouse LepR²⁶. Using isolated parts/fragments of the LepR extracellular domain (ECD), we found that the epitope targeted by the XPA antibody lays on the cytokine receptor homology 1 (CRH1) domain of LepR (Figure 1A), outside the orthosteric leptin-binding site of the CRH2 domain (Figure 1A, 1B). The use of LepR BRET biosensors indicated that XPA was capable of inducing conformational changes and the oligomerization of LepR, even though these changes were different from the ones promoted by the natural ligand (Figure 1C). Similarly to leptin (0.8 μ g/ml), treatment with 15 μ g/ml XPA triggered both STAT3 and ERK signaling pathways in HEK293 cells transfected with mouse LepR, (Figure 1D). XPA also induced the phosphorylation of STAT3 in primary cultures of tanycytes (Figure 1E), which we have previously shown to express LepR and to internalize fluorescently labeled leptin *in vitro*²³. This indicates that, rather than simply being a passive marker of LepR protein expression, XPA is also a vital marker for activated and internalized LepR. Accordingly, a 5 min co-application of fluorescent leptin (2 μ g/ml) and fluorescent XPA (5 μ g/ml) to primary tanycyte cultures showed that 100% of the cells that internalized fluorescent leptin also internalized fluorescent XPA and that 50 to 60% of the endocytosed leptin colocalized with XPA *in vitro* (Figure 1F), indicating that these cells expressed LepR and internalized it in response to leptin binding. To confirm that tanycytes also express LepR *in vivo*, we intravenously administered XPA (2 nmol/animal) or vehicle to mice 2 min before sacrifice. At this short interval, XPA was seen to colocalize with the vimentin-immunoreactive processes and cell bodies of tanycytes arching down to the fenestrated capillary plexus of the median eminence (Figure 1G).

In our quest for further indisputable evidence of LepR expression and function in median eminence tanycytes, we assessed whether tanycytes in living brain slices could respond to leptin and initiate Ca^{2+} signaling, as hypothalamic neurons do^{27,28}. To selectively target tanycytes, we generated mice expressing the GCamp3 calcium biosensor under the control of the *Trmp5* promoter, which is selectively expressed in tanycytes in the median eminence (Figure 1H)²⁹, by crossing *Trmp5::Cre* mice with those allowing Cre-dependent expression of GCamp3. Puffing 6 μM leptin onto the ventricular wall of brain slices against the flow of perfusion resulted in a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in the cell bodies of median eminence tanycytes, as seen using live imaging (Figure 1H, and 1I). A prior bath-application of 6 μM of LAN, a mutated leptin (L39A/D40A/F41A) which acts as a competitive antagonist, binding LepR but blocking its activity³⁰, before puffing leptin onto tanycytes, inhibited the leptin-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase in tanycytes (Figure 1I, and 1K), suggesting that LepR activation is required for this signaling cascade. To further test the actual involvement of LepR in this process, we generated mice in which LepR is selectively knocked out in cells expressing the *Trmp5* promoter. In these *Trmp5::Cre; LepR^{loxP/loxP}; GCamp3^{loxP/STOP/loxP}* mice (*Gcamp3^{Trmp5}; LepR^{Trmp5}* mice), puffs of leptin failed to promote any change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in tanycytes (Figure 1J, and 1K). However, puffs of 10 mM ATP, a well-known and potent activator of calcium waves in tanycytes^{31,32}, readily elevated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in both LAN-treated and mutated brain slices, showing the viability of the cells (Figure 1K, 1L, Supplementary Figure 1). Together, these data unequivocally show that tanycytes express active LepR *in vivo*, which mediates leptin-induced changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

EGFR-mediated LepR signaling is required for the transcellular trafficking of leptin in tanycytes

To characterize the mechanism by which tanycytes transport blood-borne leptin into the CSF and the rest of the hypothalamus, we next studied the transcytotic route followed by fluorescent leptin using primary cultures of tanycytes. As early as 2 min after the internalization of fluorescent bioactive leptin, the fluorescent signal was detected in EEA1-immunoreactive early endosomes (Figure 2A), where it accumulated for the first 10 min before exiting this subcellular compartment, as suggested by the subsequent decrease in intensity and extinction of fluorescence over time (Figure 2B, Figure 2C, Supplementary Figure 2A). Similarly, the fluorescent point-mutated leptin, LAN, which binds to but is unable to activate LepR, was also seen to be internalized (Supplementary Figure 2B) and to reach early endosomes (Supplementary Figure 2B). However, the overall intensity of LAN fluorescence

FIGURES

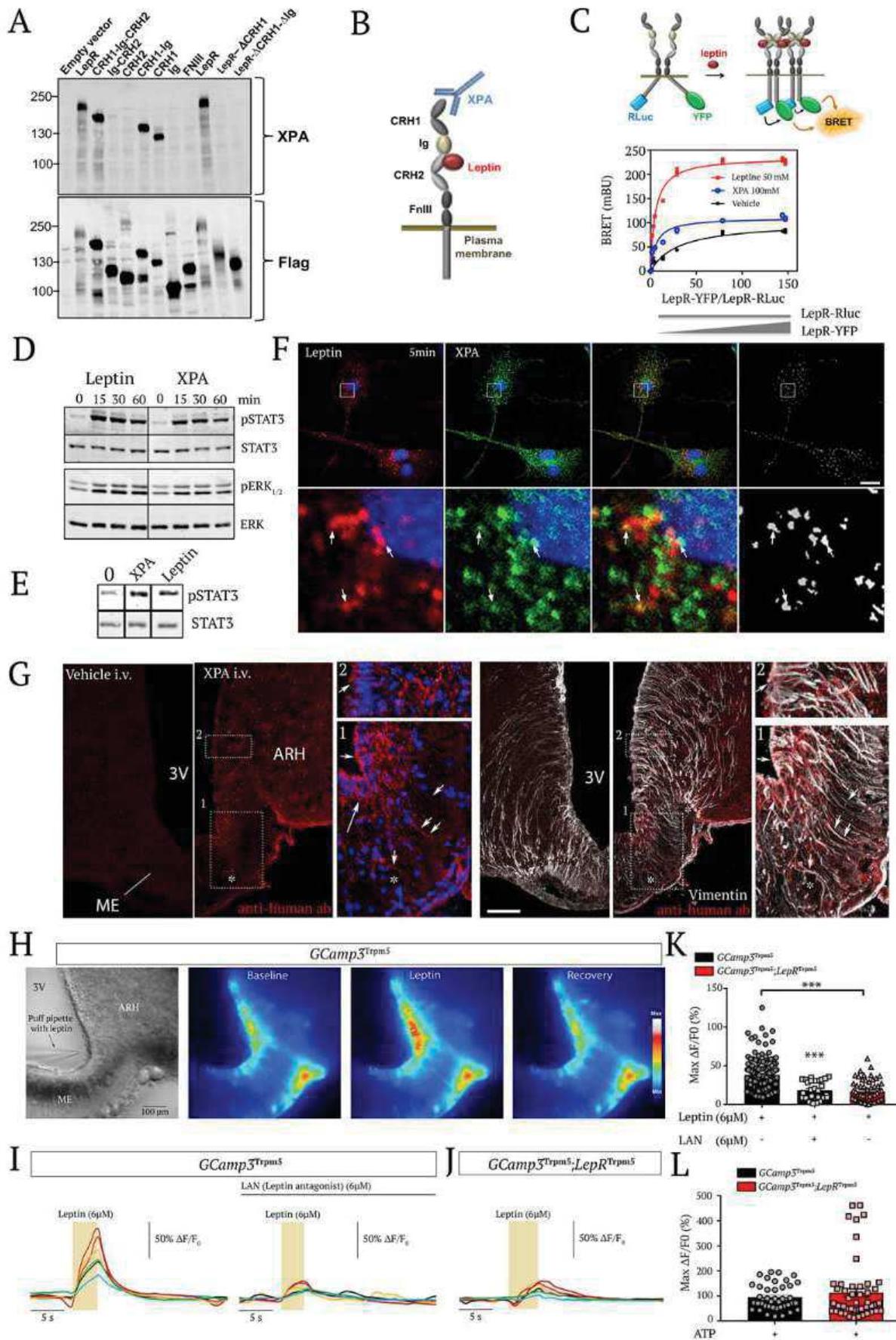


Figure 1. Tanycytes of the median eminence express functional leptin receptors

(A) Western blot detection of different exogenously expressed LepR domains in HEK293 cells by the XPA antibody.

(B) Schematic representation of leptin receptor domains and the XPA binding site.

(C) *Top*: schematic representation of the BRET assay to study the ligand-induced conformational change/interaction between LepR-RLuc and LepR-YFP. *Bottom*: BRET donor saturation curves in HEK293T cells with a constant expression level of LepR-RLuc and increasing levels of LepR-YFP, upon stimulation with vehicle, leptin (50nM) or XPA (100nM) for 30 min at 37 °C.

(D) STAT3 and ERK1/2 phosphorylation in HEK293 cells stably expressing LepR after stimulation with 50 nM leptin or 100 nM XPA for 5, 15, 30 or 60 minutes.

(E) STAT3 phosphorylation in tanycytes upon 50 nM leptin or 100 nM XPA stimulation for 30 minutes.

(F) Leptin colocalizes with LepR in primary tanycytes. Representative confocal images of tanycytes treated for 5 min with 125 nM fluorescent leptin (red) together with 33 nM XPA antibodies against LepR labeled with fluorescent secondary antibodies (green). The extent of colocalization is represented by the mask on the right. Arrows point to examples of colocalized pixels. Scale bar: 10 μ m.

(G) Representative photomicrograph revealing sites of XPA fixation in tanycytes of the median eminence (vimentin-positive cells) 2 minutes after intravenous XPA injection (2 nmol/animal) *in vivo*. White arrows show XPA (red) and vimentin (white) colocalization. 3V: third ventricle; ARH: arcuate nucleus of the hypothalamus; ME: median eminence. Scale bar: 200 μ m.

(H) Representative image of a living brain slice containing the median eminence from a *GCamp3^{Trpm5}* mouse under brightfield and fluorescence microscopy, showing the reversible increase in intracellular calcium levels in tanycytic cell bodies lining the third ventricle (3V) upon the local application of a puff of leptin (6 μ M) via a glass pipette. ME: median eminence. Scale bar: 100 μ m

(I) Representative curves of GCamp3 fluorescence (calcium current) over time (Delta T) compared to the baseline in tanycytes in living hypothalamic slices during a puff of leptin (yellow rectangle, 6 μ M), alone (left curve) or after pre-treatment with leptin antagonist (LAN, 6 μ M, top black line; right curve), in a *GCamp3^{Trpm5}* mouse.

(J) Same measurement as in (I) in a *GCamp3^{Trpm5}; LepR^{Trpm5}* mouse lacking LepR in tanycytes after a puff of leptin (6 μ M, yellow rectangle).

(K) Graph representing maximum difference in calcium concentration from baseline during the treatment of living brain slices in *GCamp3^{Trpm5}* and *GCamp3^{Trpm5}; LepR^{Trpm5}* mice, described in (I) and (J). Mann Whitney test; ***: $p < 0.001$; between indicated groups. Values indicate means \pm SEM.

(L) Graph representing maximum difference in calcium concentration from baseline during a puff of ATP (10 mM) in living brain slices from *GCamp3^{Trpm5}* and *GCamp3^{Trpm5}; LepR^{Trpm5}* mice. See also Supplementary Figure 1.

inside the cell remained constant over time (Supplementary Figure 2B), and LAN was seen to remain sequestered in EEA1-immunoreactive compartments (Figure 2D, Supplementary Figure 2C-D), suggesting that, in contrast to bioactive leptin, captured LAN could not be released from tanycytes. These results suggest that LepR signaling is not required for leptin uptake by early endosomes, but is required for internalized leptin to complete its transcytotic route across tanycytes into the CSF.

Next, since this transcytosis could be mediated by the leptin signaling cascade, characterized by the rapid activation of a series of tyrosine kinases (TK) and serine/threonine protein kinases (STK), we performed kinome profiling to explore differential global kinase activity in tanycytes in the presence or absence of 2 μ g/ml leptin for 2, 5, 10 and 15 min. We used the PamGene array, which consists of 140 immobilized tyrosine- and serine/threonine-containing peptides that are the targets of most known kinases (TK and STK PamChips). Peptides whose phosphorylation varied significantly between control and leptin-treated primary tanycytes indicated the putative involvement of specific kinases activated in response to leptin. This kinase analysis revealed the significant activation of the EGFR pathway 2 min after leptin treatment (Figure 2E) and of MAP kinases including ERK2 15 min after leptin treatment (Supplementary Figure 2E). We have previously reported that ERK activation is required for the release of leptin internalized by tanycytes *in vitro*, and that the alteration of blood-borne leptin shuttling into the hypothalamus in diet-induced obese mice can be rescued by activating ERK using potent inducers such as EGF²³. Here, the novel and unexpected finding that EGFR itself is activated directly by leptin in tanycytes suggests a possible molecular pathway underlying our previous observations.

We then explored the interaction between EGFR and LepR signaling. Co-transfection experiments in HEK293 cells showed, interestingly, that EGFR was immunoprecipitated with LepR, suggesting that the two receptors physically interact with each other even in the absence of a ligand (Figure 2F). To study the effect of ligand binding on this interaction, we next used Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer (TR-FRET) in living cells to investigate the proximity between leptin and EGF and their cognate receptors within the LepR:EGFR complex (Supplementary Figure 2F). Taking advantage of targeted fluorescently labeled SNAP-receptors (energy donor, Terbium (**Tb**)) and ligands (labeled with the energy acceptor, **d2**), TR-FRET enables the demonstration of the proximity of a ligand at a distance of 10 nm or less to a specific and unique receptor within a heteromeric receptor complex³³. Because leptin does not bind to EGFR, the incubation of fluorescent leptin-d2 even at high

concentrations with fluorescently labeled SNAP-EGFR did not lead to any TR-FRET signal (Figure 2G, Supplementary Figure 2F). However, the co-expression of unlabeled LepR in fluorescent SNAP-EGFR-expressing cells in the presence of leptin-d2 gave rise to a significant and specific TR-FRET signal, demonstrating the close proximity between SNAP-EGFR, LepR and leptin-d2 (Figure 2G, Supplementary Figure 2F). This binding of leptin-d2 to the SNAP-EGFR:LepR complex was seen to increase and to reach saturation in a concentration-dependent manner, with an affinity ($K_D(\text{SNAP-EGFR:LepRb}) = 0.42 [0.26-0.49] \text{ nM}$) similar to the affinity of leptin binding to isolated LepR³⁴ (Figure 2G). EGF binding to EGFR did not modify the affinity of leptin binding to the LepR:EGFR complex (Figure 2G), but the significantly higher Bmax of the saturation curve indicates that it likely induced a conformational change in LepR within the molecular complex (Figure 2G; Supplementary Figure 2G). Similarly, cells expressing EGFR and fluorescent SNAP-LepR that were stimulated by EGF-d2 (Supplementary Figure 2H) were seen to emit a specific TR-FRET signal, reflecting the interaction between SNAP-LepR:EGFR:EGF-d2 (Supplementary Figure 2I). A weak TR-FRET signal detected between SNAP-LEPR and EGF-d2 in the absence of heterologous EGFR may have arisen from a weak interaction between SNAP-LepR and endogenous EGFR. As suggested by the model fitting of the saturation curve, EGF-d2 interacted with EGFR within the LepR:EGFR complex with the same affinity ($K_D(\text{SNAP-LepRb:EGFR}) = 2.1 [1.6-2.5] \text{ nM}$) as to isolated EGFR alone ($K_D(\text{SNAP-EGFR}) = 3.2 [2.4-3.7]$) (Supplementary Figure 2J). In line with the binding of leptin-d2 or EGF-d2 to their cognate receptors within the complex, the proximity of fluorescent leptin-Tb (energy donor) to EGF-d2 (energy acceptor) was only detected when both LepR and EGFR were co-expressed (Supplementary Figure 2K, 2L), suggesting the formation of a quaternary complex including Leptin:LepR:EGFR:EGF in these cells.

In isolated tanycytes, combined treatment with leptin and EGF enhanced EGFR and ERK phosphorylation, supporting the intricate collaboration between these two receptors at the level of the tanycytic ERK signaling pathway (Figure 2H). Conversely, the inhibition of MEK1/2, the upstream activators of ERK, using U0126 led to the accumulation of fluorescent leptin in EAA1-immunoreactive early endosomes, thus phenocopying the behavior of fluorescent LAN, which does not activate LepR, after its internalization in tanycytes (Figure 2D, Supplementary Figure 2B, 2C, 2D). We next verified whether this lack of LAN release from the early endosome compartment in tanycytes could be bypassed by directly activating the EGFR-ERK signaling pathway. EGF treatment (10 ng/ml) strikingly

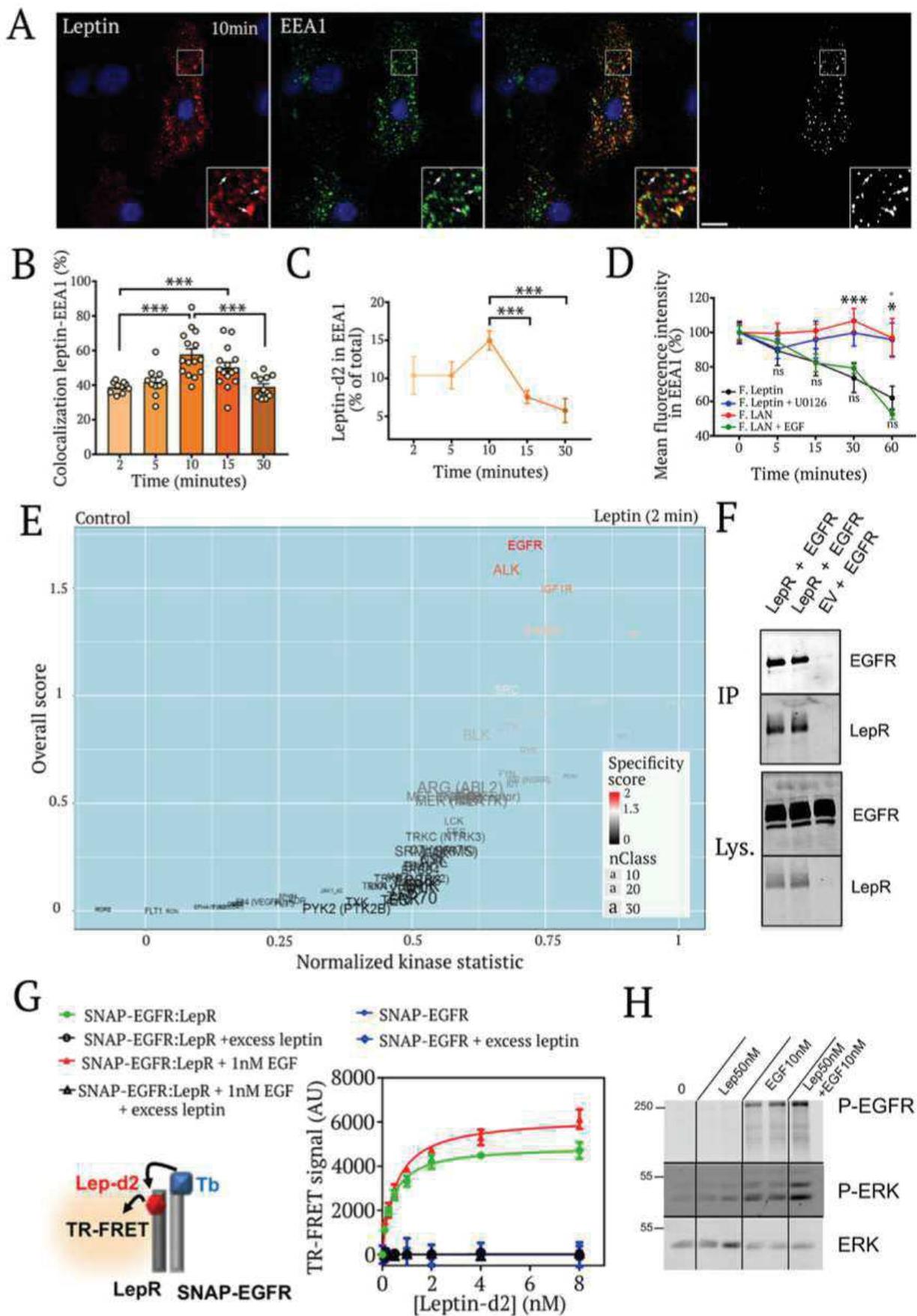


Figure 2. Tancytic EGFR activity is required for leptin transcytosis

(A) Endocytosed leptin colocalizing with early endosomes. Representative confocal images showing primary tanycytes treated for 10 min with 125 nM fluorescent leptin (red) and antibodies to the early endosome marker EEA1 (green). The extent of colocalization is represented by the mask on the right. Arrows in inset point to examples of colocalized pixels. Scale bar: 10 μ m.

(B) Percentage of leptin colocalizing with EEA1 over time following object-based detection of fluorescent leptin and EEA1 vesicles. Values represent means \pm SEM. A Mann-Whitney test was applied. ***: $p < 0.001$

(C) Percentage of endocytosed leptin found in the EEA1-positive compartment over time. Values represent means \pm SEM. A Mann-Whitney test was applied. ***: $p < 0.001$

(D) Percentage (as % of 0 min time point) of endocytosed fluorescent leptin or fluorescent LAN found in EEA1 compartments over time in cells treated or not with U0126 (leptin) or EGF (LAN). Values represent means \pm SEM. A Mann-Whitney test was applied. ***: $p < 0.001$

(E) Volcano plot showing differences in peptide phosphorylation between primary cultures of tanycytes treated for 2 min with vehicle (PBS pH 8.0) or leptin (1 μ g/ml in PBS pH 8.0) ($n=4$). Upstream kinases were identified using the Human Protein Reference Database.

(F) Co-immunoprecipitation of EGFR along with LepR in HEK293T cells; no co-immunoprecipitation of EGFR is observed when LepR is not expressed. IP, immunoprecipitation; Lys., cell lysate.

(G) Schematic representation of the TR-FRET technique (left). Right: specific saturation curves of leptin-d2 binding to its cognate receptor LepR within the LepR:SNAP-EGFR complex at the cell surface are obtained after 3h at 37°C; no TR-FRET signal is detected when SNAP-EGFR is expressed in the absence of LepR. Saturation binding experiments are performed by adding an increasing dose of leptin-d2, combined or not with 1nM EGF, to HEK293 cells expressing SNAP-EGFR alone or in combination with LepR and pre-labeled with the fluorescent SNAP-Tb substrate. The TR-FRET signal is strongly displaced by an excess of unlabeled leptin (200nM). Data are presented as means \pm SD of 3 replicates of 1 representative experiment out of 3 independent experiments. The mean dissociation constant was determined from the average of the K_d values extracted from a fitting analysis of the saturation curve of 3 independent experiments with non-linear regression "one-site specific binding equation.

(H) Phosphorylation of EGFR and ERK upon addition of leptin 50nM, EGF 10nM or both for 30min at 37°C in primary tanycytes.

restored the trafficking of fluorescent LAN downstream of early endosomes (Figure 2D) and its probable release by tanycytes (Supplementary Figure 2C). Overall, these data indicate that proper transcellular leptin transport in tanycytes requires LepR-EGFR-ERK signaling and that EGFR activation occurs downstream to LepR activation.

Mice lacking LepR in adult tanycytes show increased weight gain linked to restricted access of blood-borne leptin to the hypothalamus

To examine the functional role of LepR expression in adult tanycytes, we used the injection of the Tat-Cre recombinant protein into the third ventricle (3V) of *LepR^{loxP/loxP}* mice. The use of *tdTomato^{loxP-STOP-loxP}* reporter mice revealed that 2 μ l Tat-Cre infusion into the 3V (1.27 μ g/ μ l over 15 min) caused genetic recombination in about 60% of the tanycytes of the median eminence (Supplementary Figure 3B and 3C), but not in tanycytes of the area postrema, another circumventricular organ in the brainstem involved in the regulation of energy homeostasis³⁵ (Supplementary Figure 3D). In contrast, Tat-Cre infusion into the fourth ventricle (4V) was seen to target both median eminence and area postrema tanycytes (Supplementary Figure 3D). Notably, Tat-Cre infusion into the lateral ventricle was ineffective in inducing Tomato expression in median eminence tanycytes (Supplementary Figure 3A and 3C).

Isolation of median eminence tanycytes using FACS after the infusion of Tat-Cre into the 3V of *tdTomato^{loxP-STOP-loxP}; LepR^{loxP/loxP}* mice (Figure 3A) showed that the expression of transcripts encoding both the short forms of LepR as well as LepRb was significantly diminished in Tomato-positive cells, when compared to *tdTomato^{Tan}; LepR^{+/+}* mice (Figure 3B and 3C). Interestingly, the transcript of *Socs3*, a known leptin-responsive transcriptional target³⁶, was also found to be downregulated in Tomato-positive cells from *tdTomato^{Tan}; LepR^{TanKO}* mice (Figure 3D). Importantly, such downregulation of *LepR* and *Socs3* mRNA levels was not found in Tomato-negative cells (Figure 3B-3D).

Mice lacking LepR in tanycytes of the median eminence were seen to eat more (Figure 3E and Supplementary Figure 3E) and to gain significantly more weight (Figure 3F) than control littermates with normal tanycytic LepR expression. Surprisingly, this weight gain was independent of hyperphagia, since *LepR^{TanKO}* mice pair-fed with controls gained the same weight as *LepR^{TanKO}* mice fed *ad libitum*. To characterize the reason for this change in body weight, we monitored these mice using an indirect calorimetry system. Weight gain in *LepR^{TanKO}* mice was associated with an increased respiratory

exchange ratio (RER) during the light phase (Supplementary Figure 3F), a phenomenon that was conserved under the pair-fed condition (Figure 3G), in which *LepR*^{TankO} mice kept gaining more weight than *LepR*^{loxP/loxP} littermates (Figure 3F), even though energy expenditure (Supplementary Figure 3G and 3M) and locomotor activity (Supplementary Figure 3H and 3N) remained unchanged. These phenomena were reproduced when tanycytes were transduced with a viral vector expressing Cre under the control of the tanycyte-specific Dio2 promoter³¹, as an alternative to Tat-Cre infusion into the 3V (Supplementary Figure 3I-3L).

Increased food intake (Figure 3E) despite elevated adiposity and circulating levels of leptin in *LepR*^{TankO} mice (Figure 3I and 3J) raises the possibility that these animals may be developing hypothalamic resistance to circulating leptin, which could be linked to defective leptin transport across the blood-brain barrier into the CSF by tanycytes, as seen in various animal models at early stages of diet-induced obesity^{23,37}. First, to confirm that this phenomenon occurs under physiological conditions, we assessed endogenous STAT3 activation in the ARH at lights on, after overnight feeding, when circulating leptin levels are at their highest³⁸, and which has previously been shown to be linked to endogenous LepR activation^{22,39}. While the number of P-STAT3-immunoreactive cells lying outside the blood-brain barrier in the ventromedial ARH (vmARH) was seen to be unaffected in *LepR*^{TankO} mice (Figure 3K and 3L), the number of P-STAT-3 immunoreactive cells in the dorsomedial ARH (dmARH) was diminished by about 30% in these mutant mice when compared to *LepR*^{loxP/loxP} control littermates (Figure 3K and 3M). Next, to determine how this decreased sensitivity to peripheral leptin could impact the neuronal populations of the ARH involved in the control of body homeostasis, we analyzed the expression of several key transcripts by q-PCR. Figure 3N shows that, in *LepR*^{TankO} mice, transcripts coding for the melanocortin receptor antagonist *Agrp* were significantly induced, whereas *Socs3* mRNA levels were downregulated. However, examination of the fenestral diaphragms of median eminence endothelial cells using antibodies to MECA-32 showed that the number of fenestrated capillary loops in the median eminence and the vmARH were comparable in mutant and control mice, indicating that this decrease in leptin signaling in *LepR*^{TankO} mice was not accompanied by any changes in the permeability of ME capillary loops reaching the ARH (Figure 3K, 3O and 3P). Finally, we subjected *LepR*^{TankO} mice as well as their control littermates to intraperitoneal (i.p.) or intracerebroventricular (i.c.v.) injection of exogenous leptin and measured food intake 24h and 12h later, respectively (Figure 3Q). While exogenous leptin injected i.c.v. directly into the CSF was equally

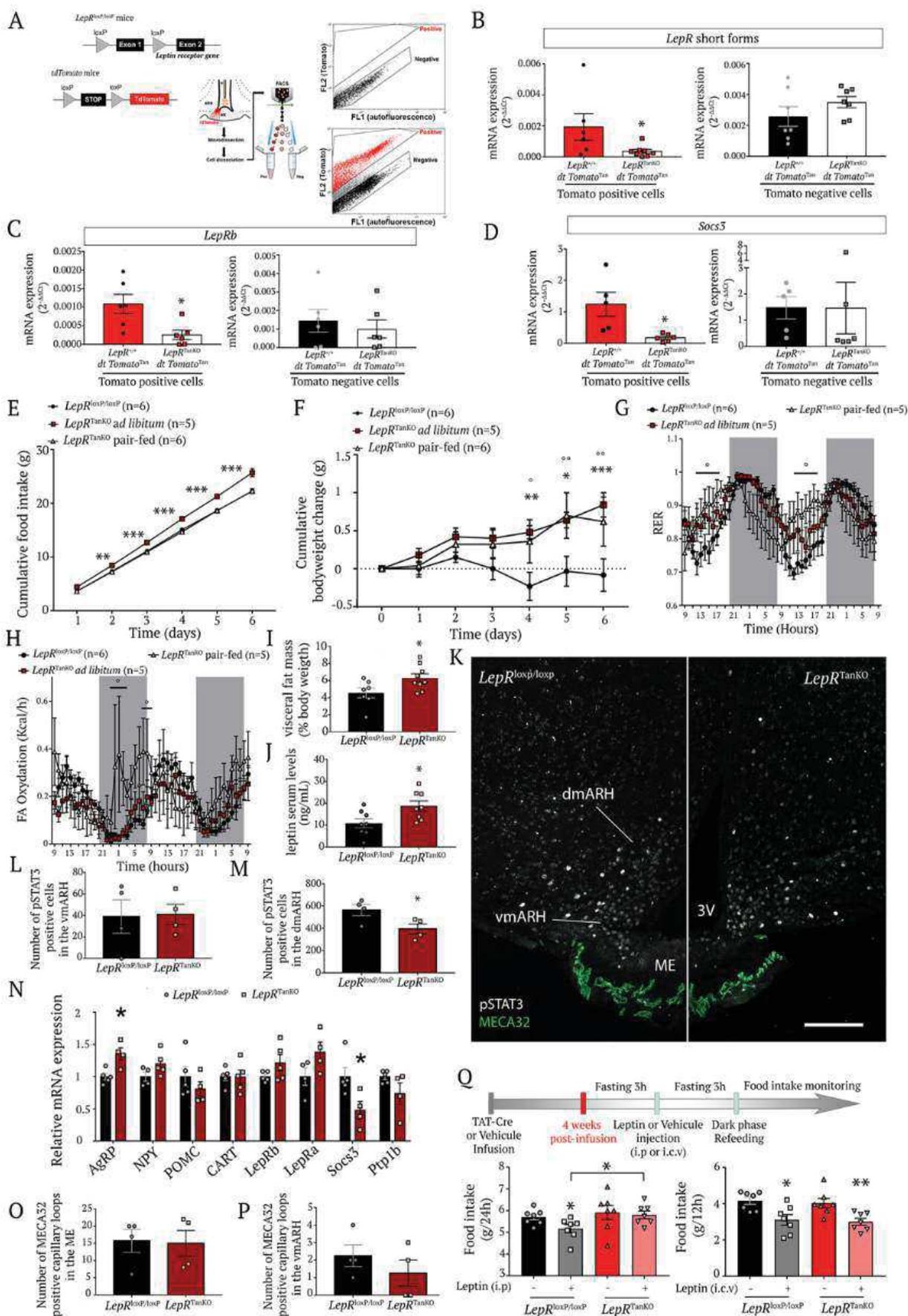


Figure 3. Selective *LepR* deletion in tanyocytes causes hypothalamic resistance to circulating leptin.

(A) Schematic diagram and gating strategy for sorting Tomato positive cells following vehicle (top panel) and TAT-Cre infusion (bottom panel) into the third ventricle (3V) of $LepR^{+/+};tdTomato^{loxP-STOP-loxP}$ or $LepR^{loxP/loxP};tdTomato^{loxP-STOP-loxP}$ littermates.

(B-D) mRNA expression levels of short forms (B) and the long form, LepRb (C), of the leptin receptor, and of Socs3 (D) in tdTomato-positive cells (left panels) and tdTomato-negative cells (right panels). A Student t-test or Mann-Whitney U test was applied, depending on Shapiro-Wilk normality test results. *: $p < 0.05$; $LepR^{+/+}$ tdTomato^{Tan} vs. $LepR^{TanKO}$ tdTomato^{Tan}. Values indicate means \pm SEM.

(E) Cumulative food intake in $LepR^{TanKO}$ pair-fed mice 12 weeks after TAT-Cre infusion compared to their control littermates. 2-way ANOVA with Tukey's correction; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ pair-fed vs. $LepR^{TanKO}$ fed ad libitum; ***: $p < 0.001$, $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ pair-fed vs $LepR^{TanKO}$ ad libitum. Values indicate means \pm SEM.

(F) Cumulative body weight change. 2-way ANOVA with Tukey's correction; *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$ fed ad libitum; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$ fed ad libitum; ***: $p < 0.001$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$ fed ad libitum; °: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$ pair-fed; °°: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$ pair-fed. Values indicate means \pm SEM.

(G) Energy ratio (RER) over time. 2-way ANOVA with uncorrelated Fisher's LSD test; °: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$ pair-fed. Values indicate means \pm SEM.

(H) Fatty-acid (FA) oxidation over time. 2-way ANOVA with uncorrelated Fisher's LSD test; °: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$ pair-fed. Values indicate means \pm SEM.

(I,J) Visceral fat mass (I) and serum leptin levels (J) 12 weeks after TAT-Cre infusion. Mann-Whitney U test; *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(K-M) Representative photomicrograph (K) and quantification of basal pSTAT3 immunofluorescence (L, M) in the ventromedial (vm) and dorsomedial (dm) arcuate nucleus (ARH) and the median eminence (ME). Scale bar: 200 μ m. Unpaired Student t-test was applied. *: $p < 0.05$ $LepR^{loxP/loxP}$ vs $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(N) Relative mRNA expression levels of several genes known to be involved in the hypothalamic regulation of energy homeostasis and leptin activity in the microdissected medio-basal hypothalamus (MBH) of $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Student t-test or Mann-Whitney U test was applied, depending Shapiro-Wilk normality test results. *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(O, P) MECA32 quantification in the arcuate nucleus (ARH) and the median eminence (ME). Values indicate means \pm SEM.

(Q) Schematic diagram showing the design of the leptin tolerance test using either intraperitoneal (i.p) or intracerebroventricular (i.c.v) routes for leptin administration. Bottom left graph represents food intake in $LepR^{loxP/loxP}$ (black and grey bars) and $LepR^{TanKO}$ mice (red and pink bars) 24h after i.p. leptin (3mg/kg, grey and pink bars) or vehicle (PBS pH 8.0, black and red bars) administration. Bottom right graph represents food intake in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice 12h after i.c.v. leptin (2 μ g in 2 μ L) or vehicle (2 μ L PBS pH 8.0) injection. Mann-Whitney U test; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; leptin vs. vehicle and between indicated groups. Values indicate means \pm SEM.

efficient in reducing feeding in both groups of mice, *LepR^{TanKO}* mice, in contrast to *LepR^{loxP/loxP}* mice, were unable to respond to exogenous leptin injected i.p. by decreasing food intake (Figure 3Q), confirming that this decreased response to peripheral leptin in *LepR^{TanKO}* mice was due to an alteration in the LepR-dependent tanyctic transport of blood-borne leptin into the CSF.

Given the increase in RER in *LepR^{TanKO}* mice (Figure 3G), indicative of increased consumption of carbohydrates over lipids to meet energy requirements⁴⁰, we next examined how lipid metabolism was altered in mice in which leptin transport into the hypothalamus was defective. The changes in RER and food-intake-independent body weight gain in *LepR^{TanKO}* mice appeared to be due to decreased fatty acid oxidation (Figure 3H), which was associated with an increase in both visceral fat mass (Figure 3I) and leptinemia (Figure 3J) and elevated circulating levels of cholesterol and triglycerides (Figure 4A), but not of non-esterified free fatty acids (NEFAS) (Figure 4B). These data, together with an increase in the size of white adipocytes (Figure 4C), suggest that *LepR^{TanKO}* mice show hyperlipidemia and lipid accumulation in white adipocytes.

In agreement with the increased uptake of free fatty acids into white adipose tissue in response to central leptin deficiency¹³, *LepR^{TanKO}* mice showed a marked increase in protein levels of lipoprotein lipase (LPL), an enzyme that promotes the uptake of circulating triglycerides, and acetyl-CoA carboxylase (Acc) and fatty acid synthase (FAS), enzymes crucial for *de novo* lipogenesis, in ependymal fat (Figure 4D and 4E). Of note, the ratio of phospho-Acc to total Acc was decreased in *LepR^{TanKO}* mice (Figure 4D and 4E), which suggests, in agreement with previously published data¹³, that hypothalamic leptin regulates ACC in white adipose tissue. We next examined the expression of the key lipolytic enzyme hormone-sensitive lipase (Hsl), the activity of which is also known to be regulated by central leptin signaling¹³, and found that the levels of phosphorylation-activated Hsl were lower in *LepR^{TanKO}* mice than in control littermates (Figure 4D and 4E). Overall, these results indicate that the lack of LepR in tanyctes favors the accumulation of lipids by promoting lipogenesis and lipid uptake while inhibiting lipolysis in white adipose tissue. Importantly, these effects were independent of feeding since they occurred in both *LepR^{TanKO}* mice fed *ad libitum* and those pair-fed with the control group.

Increased accumulation of lipids was also noted in the liver of *LepR^{TanKO}* mice using oil red staining (Figure 4F). Accordingly, liver triglyceride content was seen to be increased in these mice even in the pair-fed condition (Figure 4G), whereas circulating triglyceride levels were comparable to those in

LepR^{loxP/loxP} controls (Figure 4A). Given the absence of any marked change in the expression of enzymes involved in lipid metabolism (Figure 4H and 4I), the increase in lipid accumulation in the liver of *LepR*^{TanKO} mice is likely not due to local *de novo* synthesis but indirectly to the increased weight and hyperlipidemia of these mice.

Mice lacking LepR in tanycytes sequentially develop insulin resistance and defective insulin-secretory capacity

Leptin has long been known to influence glucose homeostasis independent of its effect on body weight regulation^{41,42}. These effects appear to be mediated by leptin action on LepR-expressing neurons in the ARH, since the local reintroduction of LepR expression in otherwise LepR-knockout animals normalizes insulinemia in these animals¹¹. In light of the altered gene expression in ARH neurons observed in our mice, we therefore next investigated the effect of LepR deletion in tanycytes in glucose metabolism. Four weeks after LepR deletion, mice did not appear to have any problem in managing exogenous injections of glucose (Figure 5A). However, monitoring glucose-stimulated insulin release in *LepR*^{TanKO} mice at 4 weeks intriguingly showed that, despite normal glucose tolerance at this early time point (Figure 5A), the mice were secreting more insulin than control *LepR*^{loxP/loxP} littermates to manage the bolus of exogenous glucose, indicating the development of insulin resistance (Figure 5B). Interestingly, we also observed hyperinsulinemia in 4-week *LepR*^{TanKO} mice after a 12h fast (Figure 5C). This fasting hyperinsulinemia may be linked to the inability of ARH neurons to appropriately perceive circulating leptin levels, as suggested by decreased STAT3 activation after overnight feeding (Figure 3K) and the downregulation of *Socs3* in the ARH of *LepR*^{TanKO} mutants (Figure 3N).

By 12 weeks after LepR deletion, however, *LepR*^{TanKO} mice developed impaired tolerance to exogenous glucose (Figure 5D). This deficient glucose homeostasis was correlated with a significantly lower increase in glucose-stimulated insulin levels in *LepR*^{TanKO} mice, suggesting some degree of pancreatic dysfunction in these mice (Figure 5E). Insulin sensitivity was similar in the two genotypes (Figure 5F). To investigate possible alterations in pancreatic function in mice lacking LepR in tanycytes, we investigated glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) in isolated pancreatic islets from *LepR*^{TanKO} and *LepR*^{loxP/loxP} littermates. Although *LepR* deletion in tanycytes did not affect the total insulin content of islets (Figure 5H), insulin secretion from isolated islets was severely hampered

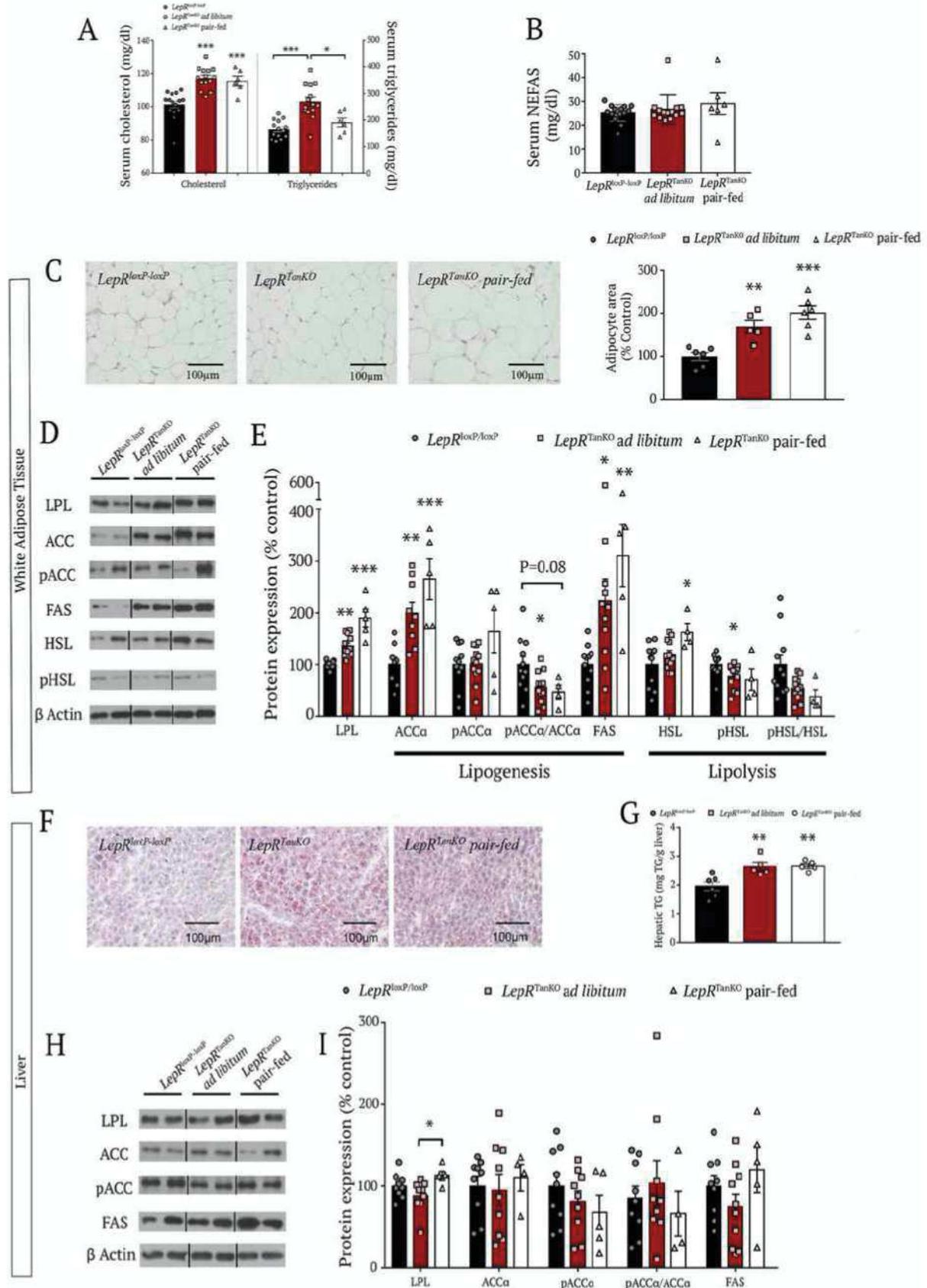


Figure 4: Selective LepR deletion in tanycytes causes hyperleptidemia and steatosis

(A) Graphs representing serum cholesterol and triglyceride concentrations in *LepR^{loxP/loxP}* and *LepR^{TanKO}* mice fed *ad libitum* on chow and *LepR^{TanKO}* mice pair-fed with *LepR^{loxP/loxP}* mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test or Kruskal-Wallis test with Dunn multiple comparison test were applied depending Shapiro-Wilk normality test results. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$, *LepR^{TanKO}* *ad libitum* or *LepR^{TanKO}* pair fed vs. *LepR^{loxP/loxP}* mice. Values indicate means \pm SEM.

(B) Graph representing serum non-esterified fatty acid (NEFAS) concentrations in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice fed *ad libitum* on chow and $LepR^{TanKO}$ mice pair-fed with $LepR^{loxP/loxP}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$, $LepR^{TanKO}$ *ad libitum* or $LepR^{TanKO}$ pair fed vs. $LepR^{loxP/loxP}$ mice. Values indicate means \pm SEM.

(C) Representative images of histological hematoxylin-eosin staining of the adipose tissue in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice fed *ad libitum* on chow and $LepR^{TanKO}$ mice pair-fed with $LepR^{loxP/loxP}$ mice. Graph shows quantification of adipocyte size. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, $LepR^{TanKO}$ *ad libitum* or $LepR^{TanKO}$ pair fed vs. $LepR^{loxP/loxP}$ mice. Values indicate means \pm SEM.

(D) Representative western blots of the different proteins mentioned in (E).

(E) Graph representing protein expression levels of several proteins implicated in fatty acid synthesis or fatty acid lipolysis in white adipose tissue from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Lipoprotein lipase (LPL) is implicated in the lipids uptake from the circulation to the adipose tissue. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test or Krustal-Wallis test with Dunn multiple comparison test. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$, $LepR^{TanKO}$ *ad libitum* or $LepR^{TanKO}$ pair fed vs. $LepR^{loxP/loxP}$ mice. Values indicate means \pm SEM.

(F) Representative Oil-Red-stained images from the liver of $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice fed *ad libitum* and $LepR^{TanKO}$ mice pair-fed with $LepR^{loxP/loxP}$ mice.

(G) Quantification of triglycerides in the liver of $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice fed *ad libitum* and $LepR^{TanKO}$ mice paired-fed with $LepR^{loxP/loxP}$ mice. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test. **: $p < 0.01$, $LepR^{TanKO}$ *ad libitum* or $LepR^{TanKO}$ pair fed vs. $LepR^{loxP/loxP}$ mice. Values indicate means \pm SEM.

(H) Representative western blots of the different proteins mentioned in (I).

(I) Graph representing protein expression levels of several proteins implicated in fatty acid synthesis and lipid uptake from the circulation into the liver in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice fed *ad libitum* and $LepR^{TanKO}$ mice paired-fed with $LepR^{loxP/loxP}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. One-way ANOVA with Tukey multiple comparison test. *: $p < 0.05$; $LepR^{TanKO}$ pair fed vs. $LepR^{TanKO}$ *ad libitum* mice. Values indicate means \pm SEM.

under high glucose conditions in 12-week *LepR^{TanKO}* mice when compared to *LepR^{loxP/loxP}* controls (Figure 5G). Gene expression analysis in islets from 12-week *LepR^{TanKO}* mice compared to controls revealed the increased expression of genes involved in glucose sensing (*Glut2*, *Gck*) and insulin maturation (*Pcsk1*) but decreased expression of key β -cell identity genes such as *Pdx1* ($p=0.065$) and *MafA* (Figure 5I). *LepR^{TanKO}* islets also exhibited an increase in the expression of markers of the endoplasmic reticulum (ER) unfolded protein response (UPR^{er}) pathway, including *Atf4* ($p=0.016$), *Xpb1t* and *Chop* (Figure 5J), thought to be associated with impaired β -cell function and T2D development⁴³. The number of α (glucagon-positive) and β (insulin-positive) cells per islet was similar in the pancreas of the two genotypes (Figure 5K, 5L, 5M). Altogether, these data suggest that the loss of *LepR* function in tanycytes impairs glucose homeostasis and insulin secretion through the transcriptional control of key pancreatic β -cell and UPR^{er} markers, preceded by the development of mild insulin resistance, and that the whole sequence of events unfolds within 3 months of altering the tanycytic shuttling of leptin into the hypothalamus.

Impaired access of leptin to the hypothalamus could mediate central effects on glucose and lipid metabolism through altered melanocortin signaling and sympathetic tone

Finally, the central effects of leptin on glucose homeostasis appear to involve the melanocortin system⁴⁴, which we have shown above to be altered in *LepR^{TanKO}* mice, and which impinges onto the sympathetic nervous system^{45,46}. In addition, the sympathetic nervous system is also known to mediate the central effects of leptin on white adipose tissue lipid metabolism¹³. We therefore next assessed circulating noradrenaline levels in *LepR^{TanKO}* mice, with their defective tanycytic shuttling of leptin into the hypothalamus (Figure 3K, 3M and 3Q), and found that the levels of noradrenaline were reduced, suggesting an overt decrease in sympathetic tone when compared to control *LepR^{loxP/loxP}* littermates (Figure 5N). Interestingly, the pancreatic islets of *LepR^{TanKO}* animals express more $\alpha 2A$ adrenergic receptors compared to their littermates without affecting the expression of $\beta 2$ adrenergic receptors (Figure 5O). $\alpha 2A$ adrenergic receptors are known for their inhibitory action on insulin secretion by the pancreas^{47,48}. Together, these results suggest a possible mechanistic pathway whereby decreased leptin access to hypothalamic neurons controlling bodily homeostasis alters melanocortin signaling in these neurons and overall sympathetic tone, which mediate its effects on peripheral glucose and lipid metabolism.

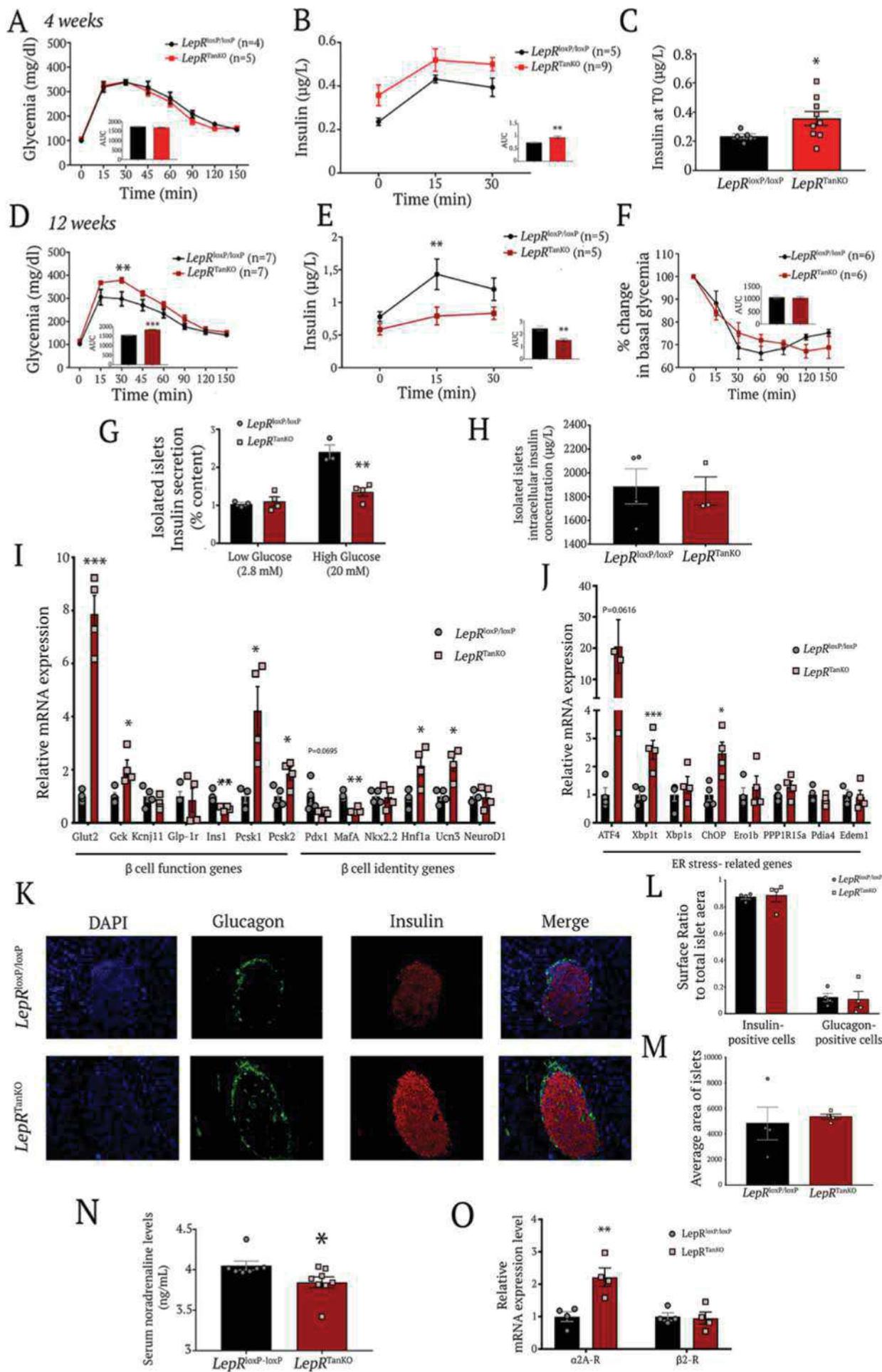


Figure 5. Loss of LepR expression in median eminence tanycytes causes severe pancreatic β cell dysfunction possibly due to defective noradrenaline activity

(A) Curve representing glycemia during a glucose tolerance test in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 4 weeks after TAT-Cre infusion. Graph represents the area under the curve; 2-way ANOVA with Tukey's correction. Values indicate means \pm SEM.

(B) Serum insulin concentrations during the first 30 mins of a glucose tolerance test in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 4 weeks after TAT-Cre infusion; 2-way ANOVA with Tukey's correction; *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Graph represents the area under the curve; Student's t-test; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(C) Graph representing serum insulin concentrations at T0 of the glucose tolerance test; Student's t-test; *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(D) Curve representing glycemia during a glucose tolerance test in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion; 2-way ANOVA with Tukey's correction; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Graph represents the area under the curve; Student's t-test; ***: $p < 0.001$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(E) Serum insulin concentrations during the first 30 mins of a glucose tolerance test in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion; 2-way ANOVA with Tukey's correction; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs $LepR^{TanKO}$. Graph represents the area under the curve; Student's t-test; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(F) Percentage change in basal glycemia during an insulin tolerance test in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means \pm SEM.

(G) Graph representing insulin secretion from total isolated pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion, following treatment with low or high glucose concentrations. Student's t-test; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(H) Graph representing insulin concentrations in isolated pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means \pm SEM.

(I) Relative mRNA expression levels of markers of β cell function and identity in isolated pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. A Student t-test or Mann-Whitney U test was applied, depending on Shapiro-Wilk normality test results. *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(J) Relative mRNA expression levels of ER stress markers in isolated pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. A Student t-test or Mann-Whitney U test was applied, depending on Shapiro-Wilk normality test results. *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(K) Confocal images representing nuclei (blue), glucagon (green) and insulin (red) in isolated pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion.

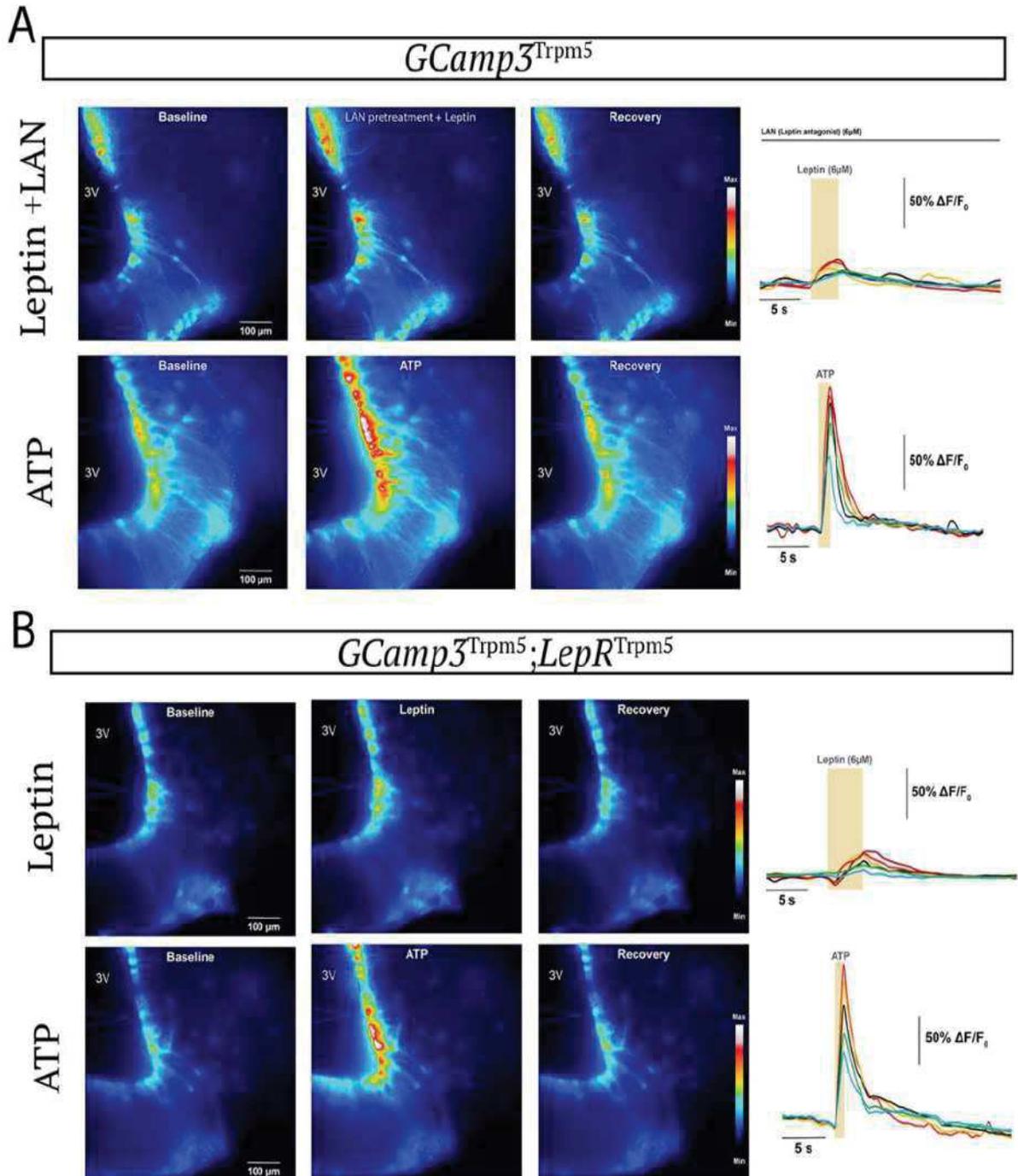
(L) Graphs representing the ratio between insulin-positive (left) or glucagon-positive area (right) to the total islet surface area in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means \pm SEM.

(M) Graph representing the average surface area of pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means \pm SEM.

(N) Graph representing serum noradrenaline concentrations in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Student's t-test. *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM. Student's t-test; *: $p < 0.05$

(O) Relative mRNA expression levels of adrenergic receptors in isolated pancreatic islets from $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Student's t-test; **: $p < 0.01$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

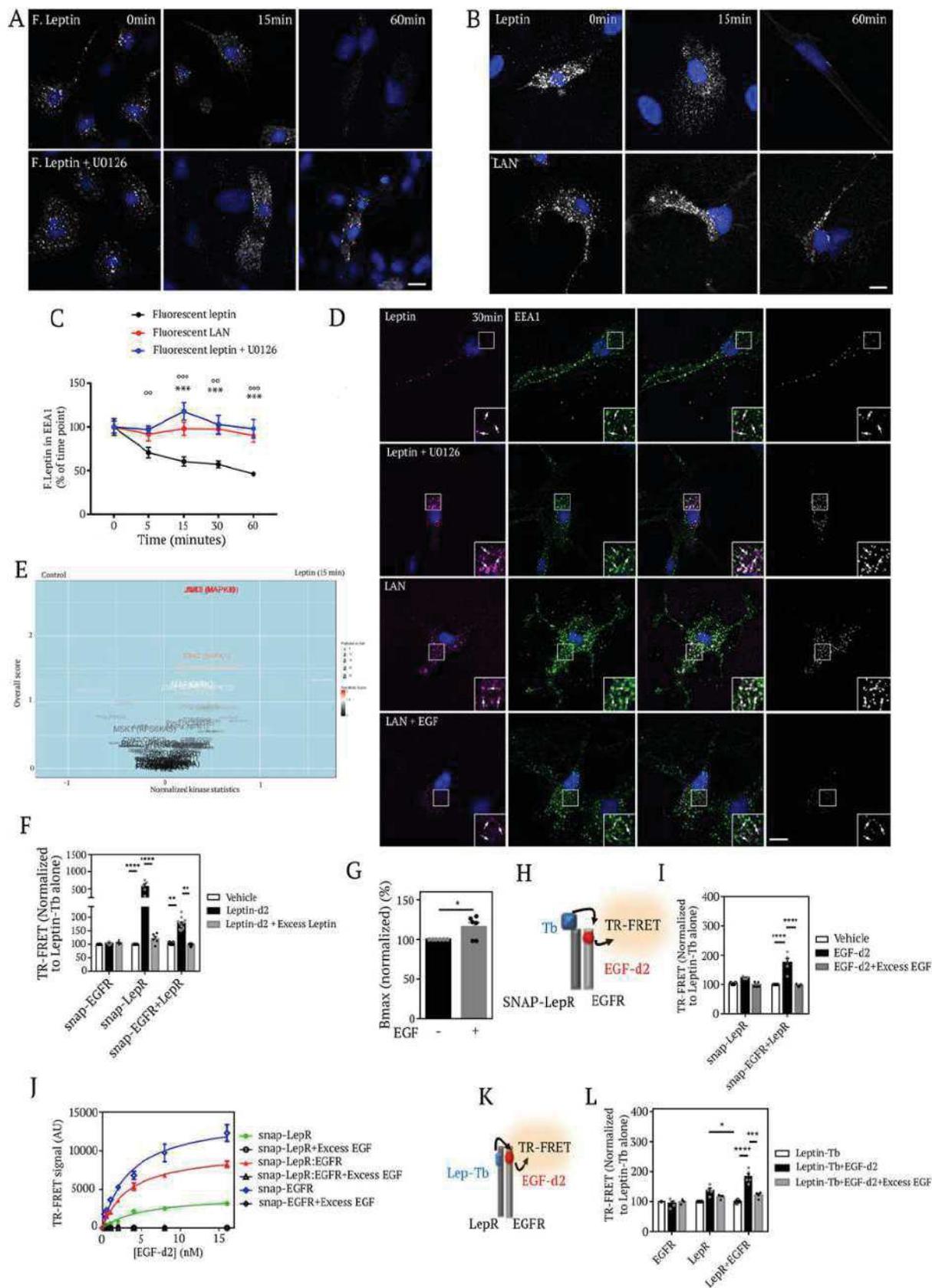
SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 1. Calcium waves in tanyocytes in response to local puffs of leptin and ATP in living brain slices from *GCamp3^{Trpm5}* and *GCamp3^{Trpm5}; LepR^{Trpm5}* mice.

(A) Representative changes in intracellular calcium concentrations in tanyocytes in living brain slices from *GCamp3^{Trpm5}* mice upon puffs of leptin (6 μ M) after bath-application of LAN (6 μ M, upper panels) and of ATP (10mM, lower panels).

(B) Representative changes in intracellular calcium concentrations in tanyocytes in living brain slices from *GCamp3^{Trpm5}; LepR^{Trpm5}* mice upon puffs of leptin (6 μ M, upper panels) and ATP (10mM, lower panels).



Supplementary Figure 2. MEK1/2 inhibition blocks leptin release from the EEA1 compartment of tanyocytes.

(A) Kinetics of leptin release by tanyocytes. Representative confocal images of tanyocytes subjected to a leptin pulse (125 nM) for 15 min (before the 0 min time point) and chased for 15 or 60 min in the absence or presence of the MEK1/2 inhibitor (U0126, 10 μM). Scale bar: 10 μm

(B) Kinetics of LAN release by tanyocytes. Representative confocal images for tanyocytes subjected to a fluorescent LAN pulse (125 nM) for 15 min (before the 0 min time point) and chased for 15 or 60 min. Scale bar: 10 μm

(C) Graph representing amounts of fluorescent leptin or LAN in cells treated or not with U0126 during the chase experiment (as a % of values at the 0 min time point). Mann-Whitney test. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Values indicate means \pm SEM.

(D) MAPK signaling is required for leptin to exit early endosomes. Representative confocal images for tanycytes subjected to a fluorescent leptin or LAN pulse for 15 min and chased for 30 min in the absence or presence of U0126 (leptin) or EGF (LAN). Cells were labeled for EEA1 (green). Colocalized pixels are shown on the right panel and arrows in inset point to examples of colocalization. Scale bar: 10 μ m.

(E) Volcano plot showing differences in peptide phosphorylation between primary cultures of tanycytes treated with leptin (1 μ g/ml in PBS pH 8.0) or vehicle (PBS pH 8.0) for 15 min ($n=4$ per group). Upstream kinases were identified using the Human Protein Reference Database.

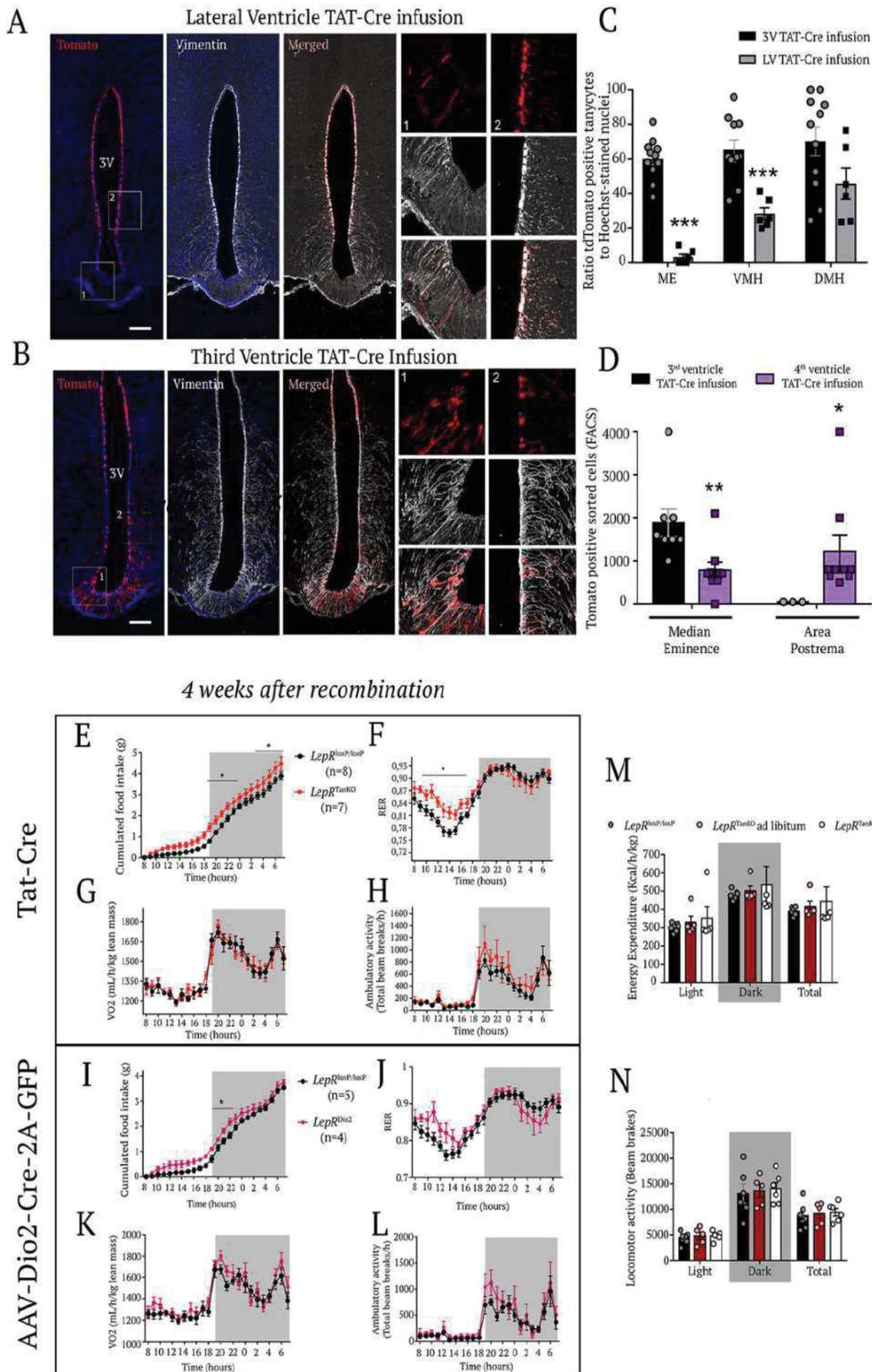
(F) The TR-FRET signal generated upon the close proximity of leptin-d2 (1nM) to fluorescent SNAP-EGFR is observed with the LepR:SNAP-EGFR complex but not with fluorescent SNAP-EGFR expressed alone. Values indicate means \pm SEM. Two-way ANOVA with Tukey multiple comparison test was applied. **, $p < 0.01$, ****: $p < 0.0001$.

(G) Increased Bmax values under conditions of co-stimulation with leptin-d2 +EGF. Values indicate means \pm SEM. Student's t-test. *: $p < 0.05$.

(H) Schematic diagram of the TR-FRET-based assay for EGF-d2 binding to the SNAP-LepR:EGFR complex.

(I) The TR-FRET signal due to the close proximity of EGF-d2 (1nM) to fluorescent SNAP-LepR, associated with endogenously expressed EGFR, is increased with the ectopic expression of EGFR, favoring the formation of the SNAP-LepR:EGFR complex. Values indicate means \pm SEM. Two-way ANOVA with Tukey multiple comparison test was applied. ****: $p < 0.0001$. (J) Saturation of binding of EGF-d2 to SNAP-LepRb- or (LepRb + EGFR)-expressing cells yielded a $K_D = 3.90$ [2.09-5.71] nM and $K_D = 2.08$ [1.63-2.53] nM, respectively. These mean K_D values are comparable to EGF-d2 binding to SNAP-EGFR ($K_D = 3.21$ [2.40-3.69] nM). Data are presented as means \pm SD of 3 replicates of 1 representative experiment out of 3 independent experiments. The mean dissociation constant was determined from the average of the K_D values extracted from a fitting analysis of the saturation curve of 3 independent experiments with non-linear regression "one-site specific binding equation" (graphpad).

(K-L) The TR-FRET signal is detected only when LepR and EGFR are co-expressed in cells allowing the proximity of fluorescent leptin-Tb (1nM) with fluorescent EGF-d2 (1nM), with both ligands binding specifically to their cognate receptors within the LepR:EGFR complex. By competing with EGF-d2, an excess of unlabeled EGF (200nM) drastically abrogated the TR-FRET signal. Values indicate means \pm SEM. Two-way ANOVA with Tukey multiple comparison test was applied. *: $p < 0,05$, ***, $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$.



Supplementary Figure 3: Tat-Cre injected into the third ventricle is the optimal method to induce gene recombination in median eminence tanycytes.

(A-B) Representative photomicrographs of endogenous tdTomato (red) and Vimentin (white) in the median eminence and walls of third ventricle after TAT-Cre infusion into the lateral ventricle (**A**) or third ventricle (**B**). Insets magnified at right to show the cell shape and precise colocalization between vimentin and tdTomato labeling. Scale bar: 200 μ m.

(C) Graph representing ratio of tdTomato-positive tanycytes to Hoechst-stained nuclei at different levels of the third ventricle after TAT-Cre infusion in the lateral ventricle (LV) and the third ventricle (3V). Student's t-test; ***: $p < 0.001$, 3V injection vs. LV injection. Values indicate means \pm SEM.

(D) Graph representing the number of tdTomato-positive FACS-sorted cells from the median eminence (black) and area postrema (purple) after TAT-Cre injection into the 3rd (black bars) or 4th ventricle (magenta bars). Student's t-test; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, 3V injection vs. 4V injection. Values indicate means \pm SEM.

(E-L) Four weeks after effective recombination, TAT-Cre (**E-H**) and AAV-Dio2-iCre-2A-GFP virus infusion (**I-L**) induce the same phenotype in $LepR^{loxP/loxP}$ mice for basal metabolism. Two-day basal food intake (**E,I**), respiratory energy ratio (RER, **F,J**), oxygen consumption (**G,K**) and locomotor activity (**H,L**) monitored in $LepR^{TanKO}$ mice 4 weeks after Cre infusion/expression and in control littermates. 2-way ANOVA with uncorrelated Fisher's LSD test; *: $p < 0.05$, $LepR^{loxP/loxP}$ vs. $LepR^{TanKO}$. Values indicate means \pm SEM.

(M-N) Bar graphs representing energy expenditure and locomotor activity during the pair-fed experiment in $LepR^{loxP/loxP}$ and $LepR^{TanKO}$ mice, 12 weeks after TAT-Cre infusion. Values indicate means \pm SEM.

DISCUSSION

Leptin, a hormone secreted by adipocytes in the periphery, plays a fundamental role in the regulation of energy homeostasis by controlling food intake and energy expenditure⁴⁻⁹. To achieve its central effects, leptin needs to cross the blood-brain barrier and gain access to specific leptin-sensitive neurons in the hypothalamus and elsewhere, a process mediated by tanycytes²³. Our results convincingly show that, in contrast to recent studies that question the expression of the leptin receptor LepR in tanycytes²⁵, LepR is not only expressed but is functionally active in hypothalamic median eminence tanycytes. Possible explanations for the assumption that LepR is not expressed in tanycytes could be the fact that, like astrocytes, these specialized hypothalamic glia do not express the cre-dependent reporter genes commonly used in *LepR::Cre* animal models²⁴ or that most of the alternative detection techniques used so far are not sensitive enough²⁵. In addition, in the inducible Cre-driver mouse lines used by others²⁵, the accessibility of the *LepR* gene in tanycytes may be impaired by the use of tamoxifen, which is known to alter chromatin architecture⁴⁹, interfere with estrogen receptor activity and impact metabolism on its own⁵⁰. These technical problems were overcome in the current study with an array of methods to detect not only the presence of LepR protein in ME tanycytes but also its function. In addition, we demonstrate that LepR signaling in tanycytes plays a critical role in the transcytotic mechanism by which they shuttle blood-borne leptin into the hypothalamus, and show that the leptin-mediated activation of LepR causes the early activation of EGFR, which we had previously and serendipitously shown to be able to rescue diet-induced obese animals from central resistance to peripheral leptin²³. This leptin-LepR-dependent activation of EGFR in tanycytes is required for the release of internalized leptin from the early endosome cell compartment by triggering the downstream ERK signaling pathway. While LepR and EGFR appear to form a complex capable of binding both leptin and EGF, it remains to be determined whether the activation of EGFR by EGF further modulates the effects of leptin binding on downstream processes including ERK activation or leptin release.

Brain-borne leptin also exerts specific and complementary peripheral effects on adipose tissue through the regulation of nutrient partitioning by decreasing the expression of key *de novo* lipogenic enzymes and stimulating the levels of pHSL, essential for the activation of lipolysis^{7,13}. Interestingly, in addition to mild consequences on body weight, we show that deleting tanycytic LepR expression in the

median eminence of adult mice increases food intake, modifies nutrient partitioning to favor the disproportionate use of carbohydrates, thus favoring lipid accumulation, and dramatically alters the ability of the brain to control glucose homeostasis in association with a marked impairment in pancreatic β cell function and altered sympathetic tone.

The capacity of leptin to regulate these diverse metabolic parameters resides in LepR-expressing neurons in the ARH, namely proopiomelanocortin (Pomc) and agouti-related peptide (Agrp) expressing neurons, which are known to be involved in the control of adipose tissue lipogenesis (Buettner et al., 2008) and glucose homeostasis (Coppari et al., 2005), in response to this adiposity signal. For instance, the deletion of LepR in either Pomc or Agrp neurons leads to moderate obesity, while the knock-out of LepR in both Agrp and Pomc neurons combined has clear cumulative effects on adiposity despite a comparable effect on food intake^{51,52}. The fact that our mice mimic this metabolic phenotype suggests that the depletion of LepR in tanycytes precludes the access of leptin to Pomc and Agrp neurons and its subsequent actions in these neuronal populations. This hypothesis is supported by the fact that transcripts for both *Agrp*, a melanocortin receptor antagonist, and *Socs3*, a known leptin-responsive gene³⁶, are downregulated in the ARH when tanycytic LepR is removed. Interestingly, the melanocortin system is involved both in glucose homeostasis^{11,44,53} and in the sympathetic nervous system-mediated regulation of lipid metabolism in white adipose tissue¹³, and circulating noradrenaline levels are reduced in mice lacking tanycytic LepR. In light of these findings, we propose that the lack of leptin-regulated activity of Pomc and Agrp neurons in the dmARH alters their capacity to properly communicate via the melanocortin signaling pathway^{54,55} with neurons of the autonomous nervous system in the brainstem and the spinal cord^{45,56}, and thus their control of target peripheral tissues^{7,57}.

In keeping with the hypothesis above, we found that the decrease in insulin secretion by pancreatic β cells in mice lacking LepR in tanycytes was associated with a significant increase in their expression of α 2A adrenergic receptors. This is also in agreement with previous studies showing that the activation of these receptors is associated with a decrease in both glucose tolerance and insulin exocytosis by β islets⁴⁷. In addition, in humans, a polymorphism leading to the overexpression of the α 2A adrenergic receptor ADRA2A is associated with an increased risk of developing T2D⁴⁸. Our results suggest that the removal of leptin receptor expression in tanycytes may lead to a decrease in insulin secretion that can be explained by an overexpression of adrenergic receptors α 2A. Overall, our

results fill the gaps in our understanding of the mechanism of leptin action: i) blood-borne leptin reaches dmARH neurons through a singular route involving transcytotic transport by median eminence tanycytes, which depends on the activation of a LepR:EGFR complex and ERK signaling, ii) leptin then stimulates the dmARH neurons controlling the melanocortin system and sympathetic outflow, and iii) this diminishes lipid storage in adipose tissue and controls glucose homeostasis by shaping the function and plasticity of pancreatic islet cells through their expression of α 2A adrenergic receptors. Conversely, alterations in tanycytic leptin transport manifest as decreased sympathetic tone, increased visceral adiposity, hepatic steatosis and glucose intolerance with pancreatic dysfunction. Longitudinal human studies show that T2D develops in subjects exhibiting insulin hypersecretion in normoglycemic and prediabetic phases in order to keep glycemia near normal, in a context of chronic nutrient surfeit and obesity-associated insulin resistance, until they reach a threshold at which this compensatory β cell response becomes unsustainable⁵⁸. Compensating for insulin resistance by increasing insulin secretion usually requires both enhanced β cell function and expansion of the β cell mass, the latter being stimulated by the increased nutrient supply, including glucose and free fatty acids⁵⁹. However, diabetes is a heterogeneous disease⁶⁰, and an alternative pattern characterized by the alteration of insulin secretion due to a β cell functional deficit could predominate in some ethnic groups. This phenotypic variability can be seen in a Japanese study in which the proportion of patients progressing to the onset of T2D was 50% in patients with a dysfunction of isolated β cells, as compared to 14% for patients with insulin resistance⁶¹. Intriguingly, an epidemiological study of Korean patients with T2D showed that they developed impaired insulin secretion and insulin resistance 10 years before the onset of diabetes, and impaired β cell compensation with an abrupt decrease in insulin secretion during the last 2 years before onset³, underscoring the central role of β cell dysfunction in the pathogenesis of T2D in Asian populations. The existence of two patterns of disease progression can also be seen from the fact that East Asian T2D patients have a much lower BMI than European patients but more intra-abdominal fat for similar BMI values². In our current model, the attenuation of tanycytic leptin transport leads to an initial deficit of insulin secretion that precedes the development of insulin resistance. Twelve weeks after selectively deleting LepR in median eminence tanycytes, *LepR^{tanKO}* mice develop impaired insulin secretion in response to glucose, against a backdrop of increased visceral fat but normal insulin sensitivity. This alteration of glucose-stimulated insulin secretion, which likely underlies the alteration of glucose homeostasis, can

be seen at the level of isolated pancreatic islets despite the lack of any apparent change in their size or organization, suggesting a modification of β cell functional integrity instead, mimicking the principal human phenotype described above.

To summarize, the study of our *LepR*^{tanKO} mouse model thus appears to have unmasked two important aspects of leptin action: i) the molecular and cellular mechanisms that regulate the physiological access of leptin to leptin-responsive neurons in the brain, i.e. the LepR-EGFR-ERK-mediated transcytotic transport of blood-borne leptin into the hypothalamus by tanycytes, and ii) the link between deficient leptin transport by tanycytes and the pathophysiology of pancreatic β cell failure and lipid dysmetabolism in the context of moderate overweight. Together, these findings shed light on the central control of peripheral lipid and glucose homeostasis by leptin, and create new therapeutic avenues for metabolic disorders.

METHODS

Animals

All C57Bl/6J mice were housed under specific pathogen-free conditions in a temperature-controlled room (21-22°C) with a 12h light/dark cycle and *ad libitum* access to food and water. *tdTomato*^{loxP-STOP-loxP} (IMSR Cat# JAX:007914, RRID:IMSR_JAX:007914) and *GCamp3*^{loxP-STOP-loxP} (IMSR Cat# JAX:025406, RRID:IMSR_JAX:025406) reporter mice and *LepR*^{loxP/loxP} mice (IMSR Cat# JAX:008327, RRID:IMSR_JAX:008327)⁶² were purchased from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). *Trmp5::Cre* mice have been engineered by Dr. Ulrich Boehm (University of Saarland, Homburg, Germany) and published elsewhere²⁹. Animal studies were approved by The Institutional Ethics Committees for the Care and Use of Experimental Animals of the University of Lille; all experiments were performed in accordance with the guidelines for animal use specified by the European Union Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/EU).

TAT-Cre and pAAV-Dio2-iCre-2A-GFP Delivery

A TAT-Cre fusion protein and the AAV 1/2 *Dio2::Cre* virus were produced as detailed previously^{31,63}. Both products were stereotaxically infused into the third ventricle (2 μ L over 7 min at 1,27 mg/ml; anteroposterior, -1.7 mm; midline, 0 mm; dorsoventral, -5.6 mm), the lateral ventricle (Anteroposterior, -0.3 mm; midline, +/- 1 mm; dorsoventral, -3 mm) or the forth ventricle (Anteroposterior, -6 mm;

midline, 0 mm; dorsoventral, -4 mm) of 24-h fasted isoflurane-anesthetized floxed mice 1 week before experiments for the TAT-Cre one and 3 weeks before experiments for the virus one.

Evaluation of TAT-Cre recombination efficiency

Four weeks after lateral ventricle or 3rd ventricle TAT-Cre infusion in *TdTomato* mice, animals were anesthetized with ketamine (8mg/kg body weight) + xylazine (3mg/kg body weight) before being perfused with Saline (0,9% NaCl) and 4% paraformaldehyde. Brains were collected before being cryoprotected in 20% sucrose solution overnight, embedded in Tissue Tek (Sakura®) and frozen freshly. 16 µm-thick coronal sections were cut and processed for immunofluorescence using chicken anti-Vimentin (1:2000; Millipore Cat# AB5733, RRID:AB_11212377) primary antibodies and Alexa647-conjugated anti-chicken antibody (1/1000; Thermo Fisher Scientific Cat# A-21449, RRID:AB_2535866). Images were acquired using an Axio Imager Z2 Apotome microscope (AxioCam MRm camera, Zeiss). 8 median eminence representative slides per animal were then coded to conceal treatment groups and the tanycytes (Vimentin positive cells) were divided into three groups depending their projections (median eminence and arcuate nucleus, ventromedial hypothalamus, dorsomedial hypothalamus). Number of DAPI+/Tomato+/Vimentin+ cells was reported on DAPI+/Vimentin+ cells bordering the 3rd ventricle. The ratio was compared between different groups. To compare 3rd and 4th ventricle TAT-Cre infusion, the number of FACS -sorted Tomato positive cells was compared in ME and 4th ventricle microdissected samples, 1 week after TAT-cre infusion.

Fluorescence-Activated Cell Sorting and Real-Time PCR Analyses

Isolation of hypothalamic tanycytes using Fluorescence Activated Cell Sorting

Median eminence from TAT-Cre injected *tdTomato*^{loxP/+} and *LepR*^{oxP/loxP}; *tdTomato*^{loxP/+} mice were microdissected, and enzymatically dissociated using Papain Dissociation System (Worthington, Lakewood, NJ) to obtain single-cell suspensions. FACS was performed using an ARIA SORP cell sorter cytometer device (BD Bioscience, Inc). The sort decision was based on measurements of tdTomato fluorescence (excitation 561nm; detection: bandpass 675+/-20nm) by comparing cell suspensions from tdTomato positive and wild-type animals, as indicated in Figure 3A. For each animal, 4000 cells tdTomato positive and negative cells and negative cells were sorted directly into

10 μ L extraction buffer: 0,1% Triton® X-100 (Sigma-Aldrich) and 0,4 U/ μ l RNaseOUT™ (ThermoFisher).

Quantitative RT-PCR analyses

For gene expression analyses, mRNAs obtained from microdissected hypothalamic explants or FACS-sorted tanycytes were reverse transcribed using SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies) and a linear preamplification step was performed for the sorted cells only using the TaqMan® PreAmp Master Mix Kit protocol (P/N 4366128, Applied Biosystems). Real-time PCR was carried out on Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System using exon-boundary-specific TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems): DARPP32 (Ppp1r1b_Mm00454892_m1); LEPR (Variant 1, long form) (LepR_Mm1265583_m1); LEPR (Variant 3, short form) (LepR_Mm01262070_m1), NPY (NPY-Mm03048253_m1), MECA32 (Pivap-Mm00453379_m1), POMC (POMC-Mm00435874_m1), AgRP (AgRP-Mm00475829_g1), CART (CARTPT-Mm04210469_m1), Socs3 (Socs3-Mm00545913_s1), Ptp1b (Ptp1b-Mm00448427_m1). Control housekeeping genes: r18S (18S-Hs99999901_s1); ACTB (Actb-Mm00607939_s1). Gene expression data were analyzed using SDS 2.4.1 and Data Assist 3.0.1 software (Applied Biosystem).

Physiological measurements

Analysis of basal metabolism

Mice were analyzed for total energy expenditure, oxygen consumption and carbon dioxide production, food intake and ambulatory movements (total beam breaks/h) using calorimetric cages (TSE Systems GmbH, Germany) and standard procedures. Mice were individually housed and acclimatized to the cages for 48h before experimental measurements. During the pair-fed test, paired-fed animals had the mean weight of food than the control group ate during the last previous 24 hours.

Glucose Tolerance Test and Insulin dosage

Mice were fasted overnight before the experiment (12 hours). Blood sample for insulin dosage was taken before, 15 and 30 min after glucose administration with glass capillary at the tail. Samples were kept on ice during the experiments before being centrifuged (4°C, 600 rpm, 15 min) to collect serum

and frozen at -80°C until insulin ELISA (Merckodia). Basal blood glucose level was measured before glucose i.p administration (1,5 mg glucose/g of body weight), 15, 30, 45, 60, 120 and 150 min after glucose administration using glucometer (OneTouch® Verio meter)

Insulin Tolerance Test

Mice were fasted 6 hours before the experiment. Basal blood glucose level was measured before insulin i.p administration (0,75UI/kg of body weight), 15, 30, 45, 60, 120 and 150 min after glucose administration using glucometer (OneTouch® Verio meter)

In vivo leptin sensitivity test

Mice were first separated one per cage and fasted during 3 hours in the afternoon. Then they are divided into two groups which received i.p or i.c.v injections of recombinant murine leptin (3mg/kg; Harbor-UCLA Medical Center, California) or vehicle (PBS pH 8.0) 3 hours before being refeed. Body weight and food intake were measured before, 12h and 24h after treatment period.

Brain and peripheral tissues analysis

Brain slice preparation and calcium imaging

Eight to 12 weeks old male *GCaMP3^{Trmp5}* and *GCaMP3^{Trmp5}, LepR^{Trmp5}* mice were anaesthetized with isoflurane, and after decapitation, the brain was rapidly removed and put in ice-cold oxygenated (O₂ 95% / CO₂ 5%) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing the following (in mM): 120 NaCl, 3.2 KCl, 1 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 glucose (300 mOsm, pH 7.4). After removal of the cerebellum, the brain was glued and coronal hypothalamic slices 200 µm thick containing the median eminence and lateral walls of the third ventricle were cut using a vibratome (VT1200S; Leica) as previously described⁶⁴. Before recording, slices were incubated at 35°C for a recovery period of 1 h. After recovery, slices were placed in a submerged recording chamber (31°C; Warner Instruments) and continuously perfused (2 ml/min) with oxygenated ACSF. Tanycytes were observed with a 40x water immersion objective in an upright Leica DM-LFSA microscope by using infrared differential interference contrast (IR-DIC). To detect GFP fluorescence, a blue illumination was provided via a 470 nm LED and an ORCA-Flash4.0 LT digital CMOS camera (Hamamatsu) was used to collect images.

MetaMorph image acquisition software (Molecular Devices) was used to control the illumination and camera. Analysis of imaging data was performed off-line using MetaMorph (Molecular Devices) and Fiji software. Regions of interest (ROI) were drawn around individual tanycyte cell bodies from the infrared and/or the fluorescence images. Changes in fluorescence intensity of GCaMP3 were measured by plotting the intensity of ROI over time, after the intensity of a background ROI had been subtracted. Then, an initial baseline fluorescence signal was computed before drug application at resting state (F_0) and subsequent fluorescence values ($F-F_0=\Delta F$) were normalized to this ($\Delta F/F_0$). Drugs were applied via puffs from a patch pipette made of borosilicate glass (World Precision Instruments) and pulled on a P1000 puller (Sutter Instrument Co). The tip of the pipette was positioned 25 μm away from tanycyte cell bodies. Puffs were delivered in the opposite direction of the flow of the perfusion chamber at a pressure of 4 psi using a PV820 pneumatic PicoPump (World Precision Instruments). The concentration of Leptin and ATP (Sigma) in the patch pipette was 6 μM and 10 mM (both prepared in ACSF), respectively. To exclude mechanical responses of tanycytes to the puff, patch pipettes were also filled with ACSF alone.

pSTAT3 and MECA-32 immunohistochemistry and analysis

Adult mice were sacrificed by decapitation in the morning at lights on. Brains were collected before being embedded in Tissue Tek (Sakura®) and frozen freshly. 20 μm -thick coronal sections were cut, postfixed with a solution of 2% paraformaldehyde during one hour and processed for immunofluorescence as previously described (Bouret et al., 2012) using rabbit anti-pSTAT3 (Tyr705) (1:1000; Cell Signaling Technology Cat# 9131, RRID:AB_331586) and rat anti-MECA32 (1:500; BD Biosciences Cat# 550563, RRID:AB_393754) primary antibodies and revealed with Goat anti-rabbit 647 (1/500; Molecular Probes Cat# A-21244, RRID:AB_141663), and Goat anti-rat 488 (1/500; Molecular Probes Cat# A-11006, RRID:AB_141373). Double-immunofluorescence images were acquired using an Axio Imager.Z2 Apotome microscope (AxioCam MRm camera, Zeiss). Slides were then coded to conceal treatment groups, and pSTAT3 immunoreactive (IR) cells counted in eight sections par animal. MECA-32 immunoreactive vessels are visualized in the primary superficial plexus of the external zone of the median eminence but some MECA-32-immunoreactive vessels form intrainfundibular capillary loops. The total number of fenestrated loops was evaluated throughout the

rostrocaudal extent of the median eminence an ARH in each animal (8 representative median eminence sections per animal). The mean number of immunopositive cells or vessels per zone was compared between groups.

Pancreatic Islet Studies

Pancreata were digested by type V collagenase (C9263; 1,5 mg/ml) for 11 min at 37°C as described previously (Annicotte et al., 2009, Rabhi et al., 2016). Briefly, after digestion and separation in a density gradient medium, islets were purified by handpicking under microscope and cultured overnight in a 1640 RPMI (Gibco, 61870-010) media containing 1mM of FBS (Gibco, 10270-106) and Penicillin/streptomycin. For insulin secretion tests, approximately thirty islets were exposed to either 2,8 mM or 20 mM glucose in Krebs-Ringer bicarbonate HEPES buffer containing 0,5% fatty-acid-free BSA. Insulin released in the medium was measured 1 hour later using the Ultrasensitive Insulin ELISA kit (Merckodia). Data are expressed as a ratio of total insulin content..

RNA Extraction, Measurements and Profiling of pancreatic islets

Total RNA was extracted from islets using RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's recommendations. mRNA expression was measured after reverse transcription by real-time qPCR with FastStart SYBR Green master mix (Roche) according to the manufacturer's recommendations and gene-specific oligonucleotides. Real-time qPCR results were normalized to endogenous cyclophilin reference mRNA levels. Results are expressed as the relative mRNA level of a specific gene expression using the formula $2^{-\Delta Ct}$. List of used primers are summarized in the table below.

Gene	Sense Primer	Antisense Primer
Cyclophiline	ATGGCACTGGCGGCAGGTCC	TTGCCATTCTGGACCCAAA
Glut2	AACCGGGATGATTGGCATGT	GGCGAATTTATCCAGCAGCA
Gck	GCTCAGTGAACCCCGGTCAGC	TGTGCGCAGCTGCTCTGAGG
Kcnj11	CACAAGCTGGGTTGGGGGCTC	TGCCCTCAGCTGGGTTCTGC
Glp-1r	GTTTCCTCACGGAAGCGCCA	AAGGAACCTGGGGGCCATC
Ins1	GCCAAACAGCAAAGTCCAGG	GTTGAAACAATGACCTGCTTGC
Pcsk1	TGATGATCGTGTGACGTGGG	GGCAGAGCTGCAGTCATTCT
Pcsk2	AAAGATGGCGCTGCAACAAG	TTGCCCAGTGTTGAACAGGT
Pdx1	ATTGTGCGGTGACCTCGGGC	GATGCTGGAGGGCTGTGGCG

MafA	TCCGACTGAAACAGAAGCGG	CTCTGGAGCTGGCACTTCTC
Nkx2.2	GTGCAGGGAGTATTGGAGGC	GAAGGGCCAGAGGAGGAGA
Hnf1a	GGTGCGTGTCTACAACCTGGT	ACCGTACACCGTGGACCTTA
Ucn3	TGATGCCACCTACTTCCTG	CTGTGTTGAGGCAGCTGAAG
NeuroD1	CTTGCCCAAGAACTACATCTGG	GGAGTAGGGATGCACCGGGAA
ATF4	ATGGCCGGCTATGGATGAT	CGAAGTCAAACCTTTTCAGATCCATT
Xbp1t	GAGCAGCAAGTGGTGGATTT	CCGTGAGTTTTCTCCCGTAA
Xbp1s	GAGTCCGCAGCAGGTG	GTGTCAGAGTCCATGGGA
ChOP	CTGCCTTTCACCTTGGAGAC	CGTTTCCTGGGGATGAGATA
Ero1b	GGGCCAAGTCATTAAAGGAA	TTTATCGCACCCAACACAGT
PPP1R15a	GAGATTCCTCTAAAAGCTCGG	CAGGGACCTCGACGGCAGC
Pdia4	AGTCAAGGTGGTGGTGGGAAAG	TGGGAGCAAATAGATGGTAGGG
Edem1	AAGTCTCAGGAGCTCAGAGTCATTAA	CGATCTGGCGCATGTAGATG

Immunofluorescence (IF) on pancreatic sections

IF was performed as described previously (Annicotte et al., 2009, Blanchett et al., 2011). Briefly, after antigen retrieval using citrate buffer (Sigma) 5 μ m formalin fixed pancreatic sections were incubated with primary antibodies: Anti-Insulin (1:1000, Agilent Cat# A0564, RRID:AB_10013624), anti-Glucagon (1:1000, Sigma-Aldrich Cat# G2654, RRID:AB_259852). Immunofluorescence stainings were revealed using Goat Alexa 594-conjugated anti Guinea-Pig antibody (1:500, Molecular Probes Cat# A-11076, RRID:AB_141930) and Goat Alexa 488-conjugated anti-Mouse (1:500, Thermo Fisher Scientific Cat# A-11001, RRID:AB_2534069). Nuclei were stained with Hoescht. For morphometric analysis, images were processed by ImageJ software by an observer blinded to experimental groups.

Western Blot analysis on liver and WAT

Tissues were homogenized using a TissueLyser II (Qiagen, Tokyo, Japan) in cold RIPA buffer (containing 200 mM Tris/HCl (pH 7.4), 130 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0.1% (v/v) SDS, 1% (v/v) Triton X-100, 10 mM MgCl₂) with anti-proteases and anti-phosphatases (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). The tissue lysates were centrifuged for 30 minutes at 18000 g in a microfuge at 4°C. Liver and White Adipose Tissue total protein lysates were subjected to sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE), then electrotransferred on a PVDF membrane and probed successively with the

following antibodies: Hormone sensitive lipase/HSL: (Abcam Cat# ab45422, RRID:AB_2135367) ; Phospho-HSL (Ser660) (Cell Signaling Technology Cat# 4126, RRID:AB_490997) ; Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase (Ser79) (Cell Signaling Technology Cat# 3661, RRID:AB_330337) ; Acetyl CoA Carboxylase 1 : (Millipore Cat# 04-322, RRID:AB_673047) ; Lipoprotein lipase (LPL Antibody (H-53)): (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-32885, RRID:AB_2234585) ; Fatty Acid Synthase antibody (FAS): (Abcam Cat# ab128870, RRID:AB_11143436) ; CPT1A: (Abcam Cat# ab128568, RRID:AB_11141632) ; GAPDH: (Millipore Cat# CB1001, RRID:AB_2107426) ; β -actin: (Sigma-Aldrich Cat# A2228, RRID:AB_47669) after incubating the membranes with 5% BSA blocking buffer. For protein detection we used horseradish-peroxidase-conjugated secondary antibodies (Dako Denmark, Glostrup, Denmark). Specific antigen-antibody bindings were visualized using chemiluminescence method according to the manufacturer's instructions (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific, USA). Values were expressed in relation to β -actin or GAPDH protein levels.

Blood lipids determinations

Serum cholesterol levels (1001093, Spinreact), triglycerides levels (1001310, Spinreact), free fatty acids levels (436-91995, 434-91795, WAKO) were measured by spectrophotometry in a ThermoScientific Multiskan GO spectrophotometer.

Histomorphology of WAT

WAT samples were fixed in 10% formalin for 24h and then were dehydrated and embedded in paraffin. Sections of 3 μ m were made on a microtome and stained by the standard hematoxylin/eosin alcoholic (BioOptica, Italy) and sections were observed and photographed using a Provis AX70 microscope (Olympus, Corp, Tokyo, Japan). Digital images were quantified with *ImageJ Software* (National Institute of Health; USA).

Triglycerides content in liver

Approx. 500mg of livers were homogenized for 3min in ice-cold chloroform-methanol (2:1, vol/vol). Triglycerides were extracted during 3hours shaking at room temperature. For phase separation, mili-Q water was added. Samples were centrifuged and the organic bottom layer was recollected. The organic solvent was dried using a Speed Vac and re-dissolved in chloroform. Triglycerides content of the samples were measured after evaporation of the organic solvent (1001310, Spinreact) by spectrophotometry in a ThermoScientific Multiskan GO spectrophotometer.

Oil Red O Staining

Frozen sections of 8µm of liver were cut with a cryostat and stained in filtered oil Red O for 10 min. The sections were washed in distilled water, counterstained with Mayer's hematoxylin for 3 min, and mounted in aqueous mountant. Sections were observed and photographed using a Provis AX70 microscope (Olympus, Corp, Tokyo, Japan).

Primary cultures and cell lines experiments

Primary culture of tanycytes

Tanycytes were isolated from the median eminence of 10-day-old (P10) rats as described previously⁶⁵.

Pamgene experiments

Primary cultures of tanycytes were incubated at 37°C with leptin (2ug/mL) or DMSO for 2 or 15 minutes before washes and snap-freeze. For kinome analysis, STK microarrays were purchased from PamGene International BV (STK pamchips). Sample incubation, detection, and analysis were performed in a PamStation 12 according to the manufacturer's instructions and as previously described (Rabhi et al., 2018).

Fluorescent leptin internalization assay and immunofluorescence on primary culture

Tanycytes were seeded on poly-L-lysine-coated glass coverslips (10µg/ml) and incubated in TDM (DMEM/F-12 (#11039, ThermoFisher), 1% L-glutamine (#25030-024, ThermoFisher), 2% penicillin-streptomycin (#P4458, Sigma), insulin (1/1000, #15500, Sigma), putrescin (1/500, #P5780, Sigma)) for 24 hours before the experiment. Tanycytes were incubated for the indicated amount of time at 37°C with either bioactive fluorescent leptin (F-leptin, 125 nM, Cisbio Bioassays) or with fluorescent leptin antagonist (LAN, 125 nM, Cisbio Bioassays) both diluted in TDM. Cells were then fixed for 10min at 4°C with 4% paraformaldehyde (PFA, v/v in PBS) and washed 3 times with PBS 1X. For cointernalization assay, tanycytes were incubated with F-leptin and XPA antibodies (5µg/ml in TDM, Xoma Laboratories) for 5 min, washed and fixed. Cells were then washed and permeabilized with 0.1 % Triton-X100 (v/v in PBS) for 5 min at room temperature. Antibodies were all diluted in PBS with 3% BSA and incubated for 45 min at room temperature. Cells were either incubated with primary anti-EEA1 antibodies (1/200; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-6415, RRID:AB_2096822) followed by the Alexa488-conjugated anti-goat antibodies (1/1000; Molecular Probes Cat# A-11055,

RRID:AB_2534102) or Alexa488-conjugated anti-human antibodies (1/1000; Molecular Probes Cat# A-11013, RRID:AB_141360) to stain XPA antibodies.

Fluorescent leptin release assay on primary culture

Tanycytes were incubated for 15 min at 37°C with either F-leptin (125 nM, Cisbio Bioassays) or LAN (125 nM ; Cisbio Bioassays). Cells were washed with TDM, incubated with TDM for the indicated amount of time and fixed for 10 min at 4°C with 4% PFA. To assess the role of MAPK pathway, tanycytes were pre-incubated for 30 min with the MAPK inhibitor UO126 (10 µM in TDM; #9903; Cell signaling technology). F-leptin uptake and release was performed in the presence of UO126. To check for LAN release with EGF, EGF-TRITC (10 ng/ml; #3481; Molecular probes) was added during the chase.

ELISA

To quantify leptin release, tanycytes were cultivated in 10 cm Petri dish and incubated with recombinant leptin (62.5 nM, Protein Rehovot Laboratory) diluted in TDM for 15 min at 37°C. Cells were then washed and incubated with TDM to chase leptin for the indicated amount of time. Leptin in the medium as well as leptin remaining in cells were quantified by Elisa assay according to the manufacturer's instruction (#MOB00 ; R&D systems). Leptin secretion was expressed as a percent of total leptin.

Image acquisition and analysis

Cells were observed under a confocal microscope TCS SP5 (Leica microsystems) and images were acquired according to Nyquist parameters using a 63x (NA 1.4) oil immersion objective. Single plane images were analyzed using the open source Icy software (<http://icy.bioimageanalysis.org/>). The cell periphery was manually delineated using phase contrast images and object-based segmentation using wavelet transform algorithm (spot detector plugin) was performed to detect vesicles in each channel. Objects were considered colocalized if the distance between their centroid was less than or equal to 3 pixels. EEA1 segmentation was used to estimate amounts of Leptin in EEA1 compartments and percent of total leptin in EEA1 determined by normalizing the integrated intensity of leptin in EEA1 to total leptin in cells.

Cells lines

HEK293T (human embryonic kidney) cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco, life technologies) with 4500 mg/l glucose and 10% fetal calf serum (Invitrogen) in a 10% CO₂ humidified atmosphere at 37°C. HEK293T cells were transiently transfected (48h) with jetPEI (Polyplus-transfection), with a mock pCDNA3 vector or LepR or EGFR expressing pCDNA3 plasmids.

Western Blot on primary cultures and cell lines

The sequences and protocols for the preparation of the extracellular sub-domains of LepR have been described previously by us⁶⁶. Cell lysates (in Laemmli buffer supplemented with 30mM DTT, 2mM orthovanadate and 10mM NaF) were separated by SDS/PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with anti-phospho-tyrosine (Tyr-705) STAT3 (Cell Signaling Technology Cat# 9145, RRID:AB_2491009) and anti-STAT3 antibodies (Cell Signaling Technology Cat# 9139, RRID:AB_331757), anti-phospho-tyrosine (Tyr-204) ERK1/2 (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-16982, RRID:AB_2139990) and anti-ERK2 (Proteintech Cat# 51068-1-AP, RRID:AB_2250380) antibodies, anti-FLAG tag (Sigma-Aldrich Cat# SAB4301135, RRID:AB_2811010), or XPA (Xoma Laboratories). Western Blots were scanned on the Odyssey infrared Imaging System (Licor).

Co-Immunoprecipitation

HEK293T cells were transfected with a Flag-EGFR-expressing vector either with LepR-YFP or an empty vector. 48h later, cells were harvested in lysis buffer containing Tris-EDTA-magnesium-1% Triton X-100 and solubilized for 2 hr (4°C, under rotation), centrifuged (14,000× g, 45 min), and supernatants were subjected to immunoprecipitation with 2 µg of antibody anti-GFP (Roche); 4 hr, 4°C, under rotation. Protein G beads (Sigma-Aldrich) were then added, and after a 2 hr incubation, the samples were washed in the 0.1% Triton X-100 buffer by repeated centrifugation (1,000× g, 5 min). The remaining pellet was resuspended in Laemmli buffer (62.5-mM Tris/HCl pH 6.8, 5% SDS, 10% glycerol, and 0.005% bromophenol blue), denaturated by heating (95°C, 5 min), and subjected to SDS-PAGE analysis.

Bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based LepR biosensor

HEK293T cells were transiently transfected in 12-well plates with 40 ng of LepR-Luciferase plasmid with increasing amounts of LepR-YFP plasmids. Cells were grown overnight and transferred into 96-

well-Optiplates (PerkinElmer Life Sciences), pre-coated with 10 µg/mL poly-l-lysine (Sigma), where they were grown for additional 24 h. The next day cells were stimulated with leptin, XPA or vehicle for 30min at 37°C. After washing with PBS, Coelenterazine (Interchim France), a Luciferase substrate was added and cells were subjected to measurement of emission at Luciferase and YFP wavelength on a plate reader Tecan F500 (Tecan; Männedorf, Switzerland).

TR-FRET binding assay

TR-FRET assays are based on the energy transfer between a fluorescently labeled donor molecule (the long-lived fluorophore Terbium cryptate (Tb)) and a fluorescently labeled acceptor (d2). In order to covalently label cell surface EGFR or LepR, with the Tb, the receptor is fused to the SNAP enzyme that can be covalently labeled with the Tb fluorophore at a stoichiometry of 1Tb per 1SNAP-receptor, using a suicide enzyme substrate-Tb. 48 hours post-transfection, HEK293T cells, expressing SNAP-EGFR +LepR or SNAP-LepR +EGFR, and previously plated in P96-well plates pre-coated with 10 µg/mL poly-l-lysine (Sigma), are incubated with 100 nM of Tb-SNAP substrate in Tag-lite labeling medium (Cisbio Bioassays; 1h, 4°C). After several washes, cells are treated with several doses of leptin-d2 or EGF-d2 (CisbioAssays) respectively. For each concentration, non-specific binding was determined by adding an excess of unlabeled leptin or unlabeled EGF (200-500nM). Regarding the binding data analysis, the B_{max} signal and the equilibrium dissociation constant (K_D) values were obtained by fitting the specific binding data points (triplicate) with one-binding site model using the GraphPad Prism software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Statistics

Results are given as mean \pm standard error mean (SEM). Samples or animals were excluded whether their values were outside the \pm 2-fold standard deviation, or whether an objective experimental failure was observed; studies were not blinded to investigators or formally randomized. To test if the populations follow a Gaussian distribution, a normality test was performed (Kolmogorov-Smirnov test for n between 5-7; Shapiro-Wilk test for $n \geq 7$). For normal distributions, parametric test were used; for two population comparisons, an unpaired t tests was used as indicated in figure legends ⁶⁷⁻⁶⁹⁶⁷⁻⁶⁹⁶⁷⁻⁶⁹(Charan and Biswas, 2013; Fay and Gerow, 2013; Student, 1908); for multiple comparison test, a one-way or two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* multiple comparison test (unless otherwise indicated in the figure legends), was performed. For non-Gaussian distributions was used; Mann-

Whitney test were used for two comparison test, and Kruskal-Wallis followed by Dunn *post hoc* test for multiple comparison. Data analysis was performed using GraphPad Prism Software Version 7 (GraphPad, San Diego, CA). The threshold for significance was $p < 0,05$.

REFERENCES

1. Swinburn, B.A., *et al.* The Global Syndemic of Obesity, Undernutrition, and Climate Change: The Lancet Commission report. *Lancet* **393**, 791-846 (2019).
2. Yoon, K.H., *et al.* Epidemic obesity and type 2 diabetes in Asia. *Lancet* **368**, 1681-1688 (2006).
3. Ohn, J.H., *et al.* 10-year trajectory of beta-cell function and insulin sensitivity in the development of type 2 diabetes: a community-based prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol* **4**, 27-34 (2016).
4. Ahima, R.S. & Flier, J.S. Leptin. *Annu Rev Physiol* **62**, 413-437 (2000).
5. de Luca, C., *et al.* Complete rescue of obesity, diabetes, and infertility in db/db mice by neuron-specific LEPR-B transgenes. *J Clin Invest* **115**, 3484-3493 (2005).
6. Cohen, P., *et al.* Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J.Clin.Invest* **108**, 1113-1121 (2001).
7. Caron, A., Lee, S., Elmquist, J.K. & Gautron, L. Leptin and brain-adipose crosstalks. *Nat Rev Neurosci* **19**, 153-165 (2018).
8. Pan, W.W. & Myers, M.G., Jr. Leptin and the maintenance of elevated body weight. *Nat Rev Neurosci* **19**, 95-105 (2018).
9. Friedman, J.M. Leptin and the endocrine control of energy balance. *Nature Metabolism* **1**, 754-764 (2019).
10. Kamohara, S., Burcelin, R., Halaas, J.L., Friedman, J.M. & Charron, M.J. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* **389**, 374-377 (1997).
11. Coppari, R., *et al.* The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab* **1**, 63-72 (2005).
12. Buettner, C., *et al.* Critical role of STAT3 in leptin's metabolic actions. *Cell Metab* **4**, 49-60 (2006).
13. Buettner, C., *et al.* Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med* **14**, 667-675 (2008).
14. Prevot, V., *et al.* The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr Rev* **39**, 333-368 (2018).
15. Garcia-Caceres, C., *et al.* Role of astrocytes, microglia, and tanycytes in brain control of systemic metabolism. *Nat Neurosci* **22**, 7-14 (2019).
16. Banks, W.A. The blood-brain barrier as an endocrine tissue. *Nat Rev Endocrinol* **15**, 444-455 (2019).
17. Schaeffer, M., *et al.* Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 1512-1517 (2013).
18. Ciofi, P., *et al.* Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* **150**, 5509-5519 (2009).
19. Yulyaningsih, E., *et al.* Acute Lesioning and Rapid Repair of Hypothalamic Neurons outside the Blood-Brain Barrier. *Cell Rep* **19**, 2257-2271 (2017).
20. Djogo, T., *et al.* Adult NG2-Glia Are Required for Median Eminence-Mediated Leptin Sensing and Body Weight Control. *Cell Metab* **23**, 797-810 (2016).
21. Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V. & Dehouck, B. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol* **518**, 943-962 (2010).

22. Langlet, F., *et al.* Tanycytic VEGF-A Boosts Blood-Hypothalamus Barrier Plasticity and Access of Metabolic Signals to the Arcuate Nucleus in Response to Fasting. *Cell Metab* **17**, 607-617 (2013).
23. Balland, E., *et al.* Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab* **19**, 293-301 (2014).
24. Yuan, X., Caron, A., Wu, H. & Gautron, L. Leptin Receptor Expression in Mouse Intracranial Perivascular Cells. *Front Neuroanat* **12**, 4 (2018).
25. Yoo, S., Cha, D., Kim, D.W., Hoang, T.V. & Blackshaw, S. Tanycyte-Independent Control of Hypothalamic Leptin Signaling. *Front Neurosci* **13**, 240 (2019).
26. Bhaskar, V., *et al.* An allosteric antibody to the leptin receptor reduces body weight and reverses the diabetic phenotype in the Lep(ob) /Lep(ob) mouse. *Obesity (Silver Spring)* **24**, 1687-1694 (2016).
27. Jo, Y.H., Chen, Y.J., Chua, S.C., Jr., Talmage, D.A. & Role, L.W. Integration of endocannabinoid and leptin signaling in an appetite-related neural circuit. *Neuron* **48**, 1055-1066 (2005).
28. Irani, B.G., Le Foll, C., Dunn-Meynell, A. & Levin, B.E. Effects of leptin on rat ventromedial hypothalamic neurons. *Endocrinology* **149**, 5146-5154 (2008).
29. Kusumakshi, S., *et al.* A Binary Genetic Approach to Characterize TRPM5 Cells in Mice. *Chem Senses* **40**, 413-425 (2015).
30. Niv-Spector, L., *et al.* Identification of the hydrophobic strand in the A-B loop of leptin as major binding site III: implications for large-scale preparation of potent recombinant human and ovine leptin antagonists. *Biochem J* **391**, 221-230 (2005).
31. Muller-Fielitz, H., *et al.* Tanycytes control the hormonal output of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Nat Commun* **8**, 484 (2017).
32. Frayling, C., Britton, R. & Dale, N. ATP-mediated glucosensing by hypothalamic tanycytes. *J Physiol* **589**, 2275-2286 (2011).
33. Auriiau, J., *et al.* Gain of affinity for VEGF165 binding within the VEGFR2/NRP1 cellular complex detected by an HTRF-based binding assay. *Biochem Pharmacol* **158**, 45-59 (2018).
34. Vauthier, V., *et al.* Design and validation of a homogeneous time-resolved fluorescence-based leptin receptor binding assay. *Anal Biochem* **436**, 1-9 (2013).
35. Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V. & Dehouck, B. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J Comp Neurol* **521**, 3389-3405 (2013).
36. Howard, J.K. & Flier, J.S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. *Trends Endocrinol Metab* **17**, 365-371 (2006).
37. Chmielewski, A., *et al.* Preclinical Assessment of Leptin Transport into the Cerebrospinal Fluid in Diet-Induced Obese Minipigs. *Obesity (Silver Spring)* **27**, 950-956 (2019).
38. Sukumaran, S., Xue, B., Jusko, W.J., Dubois, D.C. & Almon, R.R. Circadian variations in gene expression in rat abdominal adipose tissue and relationship to physiology. *Physiol Genomics* **42A**, 141-152 (2010).
39. Balland, E., Chen, W., Tiganis, T. & Cowley, M.A. Persistent leptin signalling in the arcuate nucleus impairs hypothalamic insulin signalling and glucose homeostasis in obese mice. *Neuroendocrinology* (2019).
40. Tschop, M., Smiley, D.L. & Heiman, M.L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**, 908-913 (2000).
41. Schwartz, M.W., *et al.* Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. *Diabetes* **45**, 531-535 (1996).
42. Pellemounter, M.A., *et al.* Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* **269**, 540-543 (1995).
43. Back, S.H. & Kaufman, R.J. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem* **81**, 767-793 (2012).

44. Berglund, E.D., *et al.* Direct leptin action on POMC neurons regulates glucose homeostasis and hepatic insulin sensitivity in mice. *J Clin Invest* **122**, 1000-1009 (2012).
45. Sohn, J.W., *et al.* Melanocortin 4 receptors reciprocally regulate sympathetic and parasympathetic preganglionic neurons. *Cell* **152**, 612-619 (2013).
46. Muzumdar, R., *et al.* Physiologic effect of leptin on insulin secretion is mediated mainly through central mechanisms. *FASEB J* **17**, 1130-1132 (2003).
47. Fagerholm, V., Haaparanta, M. & Scheinin, M. alpha2-adrenoceptor regulation of blood glucose homeostasis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **108**, 365-370 (2011).
48. Rosengren, A.H., *et al.* Overexpression of alpha2A-adrenergic receptors contributes to type 2 diabetes. *Science* **327**, 217-220 (2010).
49. Zhou, Y., *et al.* Temporal dynamic reorganization of 3D chromatin architecture in hormone-induced breast cancer and endocrine resistance. *Nat Commun* **10**, 1522 (2019).
50. Liu, Z., *et al.* Short-term tamoxifen treatment has long-term effects on metabolism in high-fat diet-fed mice with involvement of Nmnat2 in POMC neurons. *FEBS Lett* **592**, 3305-3316 (2018).
51. Balthasar, N., *et al.* Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* **42**, 983-991 (2004).
52. van de Wall, E., *et al.* Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* **149**, 1773-1785 (2008).
53. Vauthier, V., *et al.* Endospanin1 affects oppositely body weight regulation and glucose homeostasis by differentially regulating central leptin signaling. *Mol Metab* **6**, 159-172 (2017).
54. Obici, S., *et al.* Central melanocortin receptors regulate insulin action. *J Clin Invest* **108**, 1079-1085 (2001).
55. Fan, W., *et al.* The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology* **141**, 3072-3079 (2000).
56. Rossi, J., *et al.* Melanocortin-4 receptors expressed by cholinergic neurons regulate energy balance and glucose homeostasis. *Cell Metab* **13**, 195-204 (2011).
57. Coppari, R. & Bjorbaek, C. Leptin revisited: its mechanism of action and potential for treating diabetes. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 692-708 (2012).
58. Prentki, M. & Nolan, C.J. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* **116**, 1802-1812 (2006).
59. Steil, G.M., *et al.* Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**, E788-796 (2001).
60. Tuomi, T., *et al.* The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet* **383**, 1084-1094 (2014).
61. Morimoto, A., *et al.* Impact of impaired insulin secretion and insulin resistance on the incidence of type 2 diabetes mellitus in a Japanese population: the Saku study. *Diabetologia* **56**, 1671-1679 (2013).
62. Cohen, P., *et al.* Selective deletion of leptin receptor in neurons leads to obesity. *J Clin Invest* **108**, 1113-1121 (2001).
63. Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K. & Edenhofer, F. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 4489-4494 (2002).
64. Clasadonte, J., Scemes, E., Wang, Z., Boison, D. & Haydon, P.G. Connexin 43-Mediated Astroglial Metabolic Networks Contribute to the Regulation of the Sleep-Wake Cycle. *Neuron* **95**, 1365-1380 e1365 (2017).
65. Prevot, V., Cornea, A., Mungenast, A., Smiley, G. & Ojeda, S.R. Activation of erbB-1 signaling in tanycytes of the median eminence stimulates transforming growth factor beta1 release via prostaglandin E2 production and induces cell plasticity. *J. Neurosci.* **23**, 10622-10632 (2003).
66. Zabeau, L., *et al.* Selection of non-competitive leptin antagonists using a random nanobody-based approach. *Biochem J* **441**, 425-434 (2012).

67. Student. The probable error of a mean. *Biometrika* **6**, 1-25 (1908).
68. Fay, D.S. & Gerow, K. A biologist's guide to statistical thinking and analysis (). *WormBook : the online review of C. elegans biology*, 10.1895/wormbook.1891.1159.1891 (2013).
69. Charan, J. & Biswas, T. How to Calculate Sample Size for Different Study Designs in Medical Research? *Indian Journal of Psychological Medicine* **35**, 121-126 (2013).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence National de la Recherche (ANR, France) Grant ANR-15-CE14-0025 to VP, RJ and SG, « European Genomic Institute for Diabetes » (E.G.I.D, ANR-10-LABX-46 to JSA), BETAPLASTICITY, ANR-17-CE14-0034 to JSA, Université de Lille (to MD, CB and JSA), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, to MD), European Foundation for the Study of Diabetes (EFSD, to JSA), the European Research Council (ERC) Synergy Grant-2019-WATCH-810331 to V.P., R. N. and M. S, the "Who am I?" laboratory of excellence No.ANR-11-LABX-0071 (to JD), and the DHU Autoimmune and Hormonal Diseases (Authors) (JD). We thank Laure Rolland for excellent technical help with immunofluorescence analysis of pancreatic sections. We thank the BICeL and High-tech Animal House core facilities.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

M.D., C.F., C.B., M.M., A.S., J.C., M.I., S.K., E.C., N.J., A.O. and S.O carried out the experiments. M.M., J.T., E.T., M.S., S.K. and U.B. generated tools, vectors and animal models. R.J., M.S., U.B, R.N., J.-S.A., S.G., J.D. and V.P. designed and planned the study. All authors contributed to the preparation of the manuscript.

COMPETING INTERETS

The authors declare no competing interest.

PARTIE 2

MISE EN PLACE D'UN SYSTÈME DE CULTURE CELLULAIRE POUR L'ETUDE DU TRANSPORT POLARISE DE LA LEPTINE DANS LES TANYCYTES

Jusqu'à présent, grâce à l'utilisation de tanocytes en culture primaire, j'ai pu déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels la leptine entre dans la cellule et caractériser les compartiments intracellulaires par lesquels elle transite. Néanmoins, il existe une limite importante dans l'utilisation de la culture classique de cellules *in vitro* pour aller plus loin dans la caractérisation de la voie de transport de la leptine jusqu'à sa sécrétion. En effet, les tanocytes sont des cellules polarisées *in vivo* en dialogue permanent avec la périphérie grâce notamment à leur localisation dans l'éminence médiane qui les positionne à proximité des capillaires fenêtrés et au contact du liquide céphalo-rachidien (3e ventricule) au niveau des corps cellulaires^{72,51}. Or, *in vitro*, cette polarité cellulaire n'est pas maintenue et la leptine est internalisée de toutes parts par les tanocytes. C'est pourquoi, en parallèle de la première étude, j'ai tenté de développer un modèle de culture permettant de maintenir la polarisation cellulaire.

J'ai opté pour deux systèmes de culture différents permettant de séparer physiquement les corps cellulaires des tanocytes de leurs prolongements dans deux compartiments distincts. De cette manière, l'accès limité de la leptine à un pôle des tanocytes nous permet d'étudier son transport vers le pôle opposé. Dans cette étude, j'ai suivi la transcytose de la leptine des prolongements vers les corps cellulaires des tanocytes. Le premier système utilisé est une culture cellulaire dite en 3D qui consiste à ensemercer les tanocytes sur une membrane poreuse et de l'extrait de membrane basale (MB), constituant de l'environnement des tanocytes *in vivo*. Le second système de culture est basé sur l'utilisation de puces microfluidiques à deux compartiments, reliés par des micro-canaux dans lesquels les prolongements des tanocytes vont s'insérer.

Dans la seconde partie de mes résultats, je détaille tout d'abord la mise en place de ces deux nouveaux systèmes de culture *in vitro* adaptés à des cultures primaires de tanocytes. J'expose ensuite les différents paramètres testés pour optimiser la culture cellulaire ainsi que les tests d'internalisation de la leptine fluorescente.

I. MODELE DE CULTURE 3D AVEC GEL DE MATRICE EXTRACELLULAIRE

I.1. FORMATION DES PROLONGEMENTS TANCYTAIRES A TRAVERS LA MEMBRANE

Les tancytes de l'éminence médiane possèdent une organisation qui leur est propre. En effet, ces cellules forment une barrière étanche au niveau de l'EM par la présence de jonctions serrées au niveau des corps cellulaires qui bordent le 3e ventricule^{49,51}. Au pôle opposé, leurs prolongements s'étendent en direction des capillaires fenêtrés^{252,253} ou ils contactent l'espace péricapillaire limité par une lame basale continue (50 à 80 nm) qui se compose de protéines de structure telles que le collagène de type IV, l'élastine et d'autres protéines comme la laminine et la fibronectine²¹⁹. L'ensemble permet le maintien des propriétés du tissu et influence l'organisation des cellules de la BHE⁴⁸. Cet espace est un environnement riche qui est à l'interface des échanges entre le sang et le tissu nerveux composé de nombreuses cellules comme les neurones, les cellules gliales, les cellules endothéliales des capillaires et même des péricytes²⁵⁴. Dans cet environnement, les tancytes adoptent une morphologie polarisée et mettent en place un transport polarisé de molécules métaboliques.

Dans le but de se rapprocher de cet environnement *in vitro*, j'ai utilisé un gel d'extrait de membrane basale (MB) (12 mg/ml, Cultrex®, Trevigen) composé de collagène de type IV et de laminine. Dans un premier temps, j'ai tout simplement tenté de cultiver les tancytes sur le gel. Une goutte de 100 µl de gel a été mise à solidifier sur une lamelle de verre à 37°C avant d'y déposer 15 µl de suspension cellulaire. Une fois les tancytes adhérents, 400 µl de milieu est ajouté. Les cellules sont ensuite observées régulièrement au microscope optique.

Après 24h, les tancytes ont complètement pénétré le gel de MB et l'enchevêtrement des prolongements cellulaires forment un réseau dense (résultat non montré). La composition de la matrice semble donc propice à la culture des tancytes et au développement des prolongements cellulaires. Néanmoins, l'organisation des cellules est plutôt anarchique et l'agencement en monocouche cellulaire capable de former une barrière étanche caractéristique des tancytes n'est pas retrouvée. Ce résultat m'a donc poussée à utiliser une membrane poreuse qui pourrait permettre la formation des prolongements tout en isolant les corps cellulaires pour leur permettre d'entrer en contact et former des jonctions.

Pour cela, j'ai pensé à utiliser une membrane poreuse transparente de polyéthylène téréphtalate (PET, Millicel, Millipore) qui serait placée entre les cellules et le gel. Ce dispositif permet une séparation physique de deux compartiments, un supérieur dans lequel les tancytes sont

ensemencés et un inférieur, dans lequel on retrouve le gel de matrice extracellulaire en contact avec le milieu de culture (figure 32, A). Pour réaliser ce montage, l'insert est retourné, une goutte (60 μ l) d'extrait de MB est déposée sur la membrane poreuse et le tout est placé dans l'incubateur à 37°C pendant 35 minutes, temps nécessaire à la polymérisation du gel. L'insert est ensuite retourné et placé dans le puit contenant 800 μ l de milieu de culture. Les cellules sont ensuite ensemencées dans l'insert et cultivées pendant plusieurs jours avant utilisation.

Un certain nombre de paramètres ont dû être testés pour trouver les meilleures conditions de culture. Premièrement, j'ai utilisé deux tailles de pores de membrane, variant entre 1 μ m et 3 μ m de diamètre. Comme précédemment, les cellules sont ensemencées à l'intérieur de l'insert (partie supérieure) et le milieu de culture est changé toutes les 48h. Le contrôle chaque jour de l'organisation des tanocytes permet d'observer le développement des prolongements des tanocytes à travers les pores de la membrane qui viennent au contact du gel situé à la face inférieure. Après 6 jours de culture, les cellules sont fixées et marquées pour une analyse en immunofluorescence afin de caractériser l'organisation des cellules. Pour avoir une idée de l'organisation générale des tanocytes, j'ai marqué la vimentine qui permet de voir les contours cellulaires et les prolongements tanocytaires. Les images sont ensuite acquises au microscope confocal.

Les tanocytes cultivés sur la membrane avec des pores de 1 μ m sont capables d'émettre des prolongements qui vont s'insérer dans le gel. De longues structures positives pour la vimentine sont observées sous la membrane poreuse et dans le gel. Les noyaux marqués au Hoechst ne sont visibles que sur la face supérieure de la membrane indiquant que les corps cellulaires n'ont pas traversé la membrane (figure 32, B). En revanche, de nombreux noyaux ont été observés du côté du gel lorsque la membrane avec des pores de 3 μ m a été utilisée, indiquant que des cellules sont capables de migrer à travers ces pores (figure 32, C). Ainsi, pour la suite des expériences et pour forcer la séparation des deux pôles cellulaires, les membranes avec des pores d'1 μ m seront utilisées.

De plus, j'ai observé que les cellules en culture s'organisent sur la membrane formant une zone dense en corps cellulaires (figure 33, A) qui émettent des prolongements à travers les pores. Les prolongements cellulaires (partie inférieure) sont en contact les uns avec les autres, formant un réseau important dans le gel de membrane basale (figure 33, B).

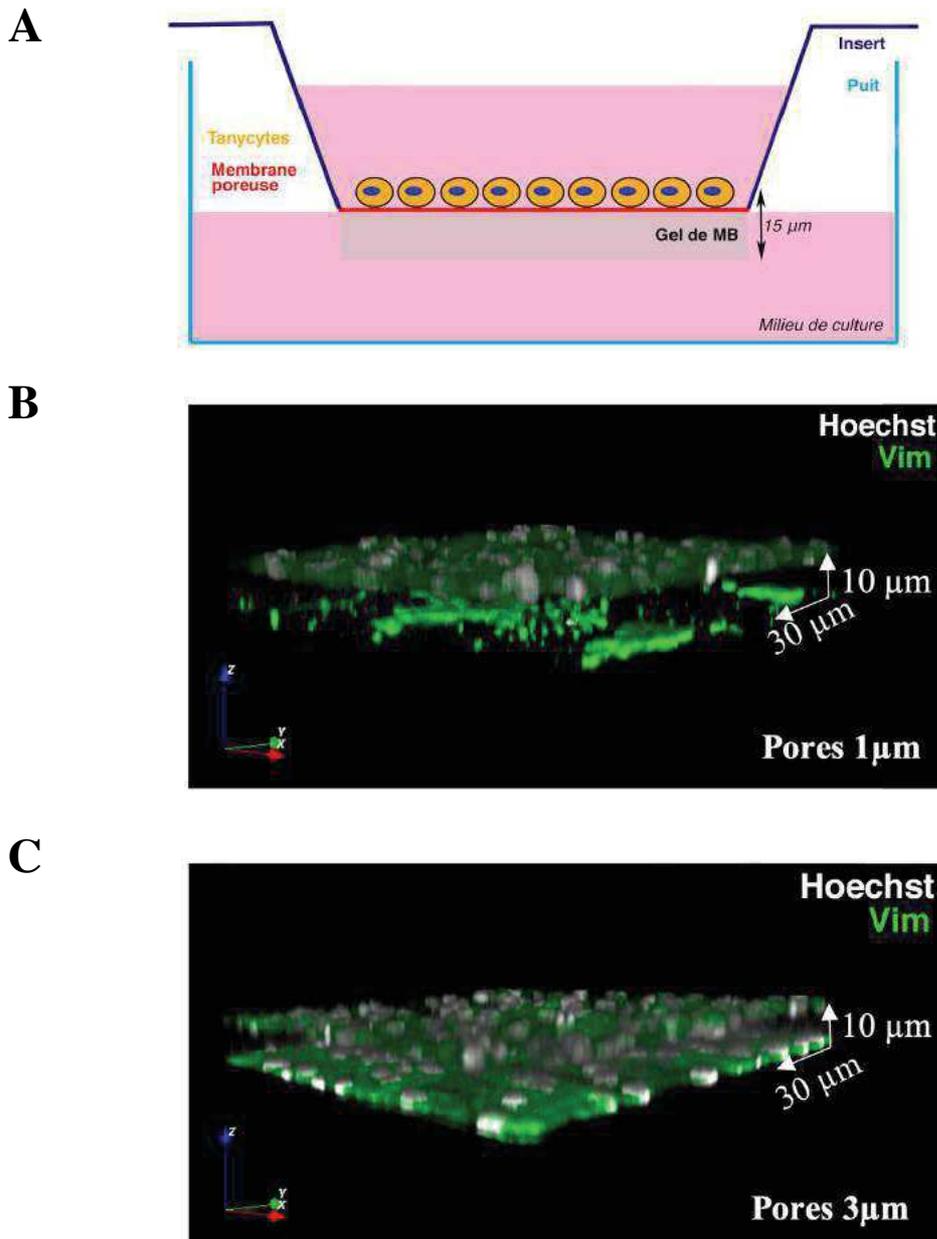


Figure 32 : Optimisation du système de culture de tanycytes en 3D. **A)** Schéma de l'organisation du système d'insert composé, d'une membrane poreuse sur laquelle les tanycytes sontensemencés, et d'un gel d'extrait de membrane basale (MB) dans lequel les prolongements tanycytaires se développent. **B-C)** Reconstitution 3D des images de microscopie confocale montrant l'organisation des cellules sur les membranes avec des pores de 1 μ m (B) et de 3 μ m de diamètre (C). Après 6 jours de culture sur les inserts, les cellules sont fixées au PFA 4% pendant 20 min, perméabilisées avec du triton 0,1% et incubées avec un anticorps primaire dirigé contre la vimentine (Vim, vert) puis révélées par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488. Les noyaux (blanc) sont marqués avec le Hoechst pendant 30 min. La partie supérieure représente le dessus de la membrane et l'inférieure, le gel de matrice extracellulaire. Les deux zones sont séparées par la membrane transparente de 10 μ m (espace transparent). Le repère orthogonale (x, y, z) indique la profondeur (z) des plans (x, y) dans l'espace.

Morphologiquement, les prolongements cellulaires ont une taille variable qui peut atteindre jusqu'à 200 μm et s'insèrent dans le gel de MB verticalement, visibles sous formes de petits points en coupe optique. Ils peuvent aussi longer la membrane (figure 33, B et D). Des images de microscopie électronique montrent que les tanocytes peuvent former des couches cellulaires (figure 33, C) et que les prolongements qui se développent le long de la membrane sont dépourvus de noyaux mais riche en organelles (figure 33, D). Rapporté au nombre de celluleensemencées sur la face supérieure de la membrane, le nombre de prolongement est en nombre plus faible. Même si 95% des cellules sont des tanocytes dans mes cultures primaires, j'ai voulu m'assurer que les prolongements observés dans le gel provenaient bien des tanocytes. Pour cela, j'ai marqué les cellules pour la vimentine et la GFAP, un marqueur des astrocytes. De manière similaire à la culture primaire dite classique, la majorité des cellules est positive pour le marquage vimentine et seulement quelques cellules (5 %) sont marquées pour la GFAP (résultat non montré). Ces données montrent que les tanocytes sont capables de se développer sur la membrane de l'insert, et de former des prolongements cellulaires validant ainsi l'utilisation de ce système de membrane avec des pores de 1 μm .

1.2. LES TANYCYTES FORMENT-ILS UNE BARRIERE TANYCYTAIRE SUR LA MEMBRANE BASALE ?

Dans un second temps, j'ai évalué la capacité des tanocytes à former des jonctions serrées, caractéristiques *in vivo* de l'organisation des tanocytes de l'éminence médiane. En effet, grâce à la présence de complexes jonctionnels, les corps cellulaires des tanocytes forment une barrière physique étanche pour contrebalancer la perméabilité des vaisseaux fenêtrés et de maintenir l'homéostasie cérébrale^{49,70,72} en protégeant le cerveau et en filtrant de manière sélective le passage des molécules du sang vers le liquide céphalorachidien au niveau du 3e ventricule.

Afin d'étudier l'organisation des jonctions dans la culture de tanocytes sur la membrane, les cellules sontensemencées pendant 6 jours sur la membrane poreuse puis marquées pour Zonula occludens-1 (ZO-1), un marqueur des protéines des jonctions serrées retrouvées au niveau des corps cellulaires des tanocytes⁵¹ et pour la vimentine. L'observation en microscopie confocale montre que le marquage de la protéine ZO-1 (jaune, image de gauche) s'accumulent entre les corps cellulaires des tanocytes (partie supérieure de la membrane) (figure 34, A) mais aussi au niveau des prolongements tanycytaires présents dans le gel et révélés par la vimentine (rouge) (figure 34, A ; image de gauche).

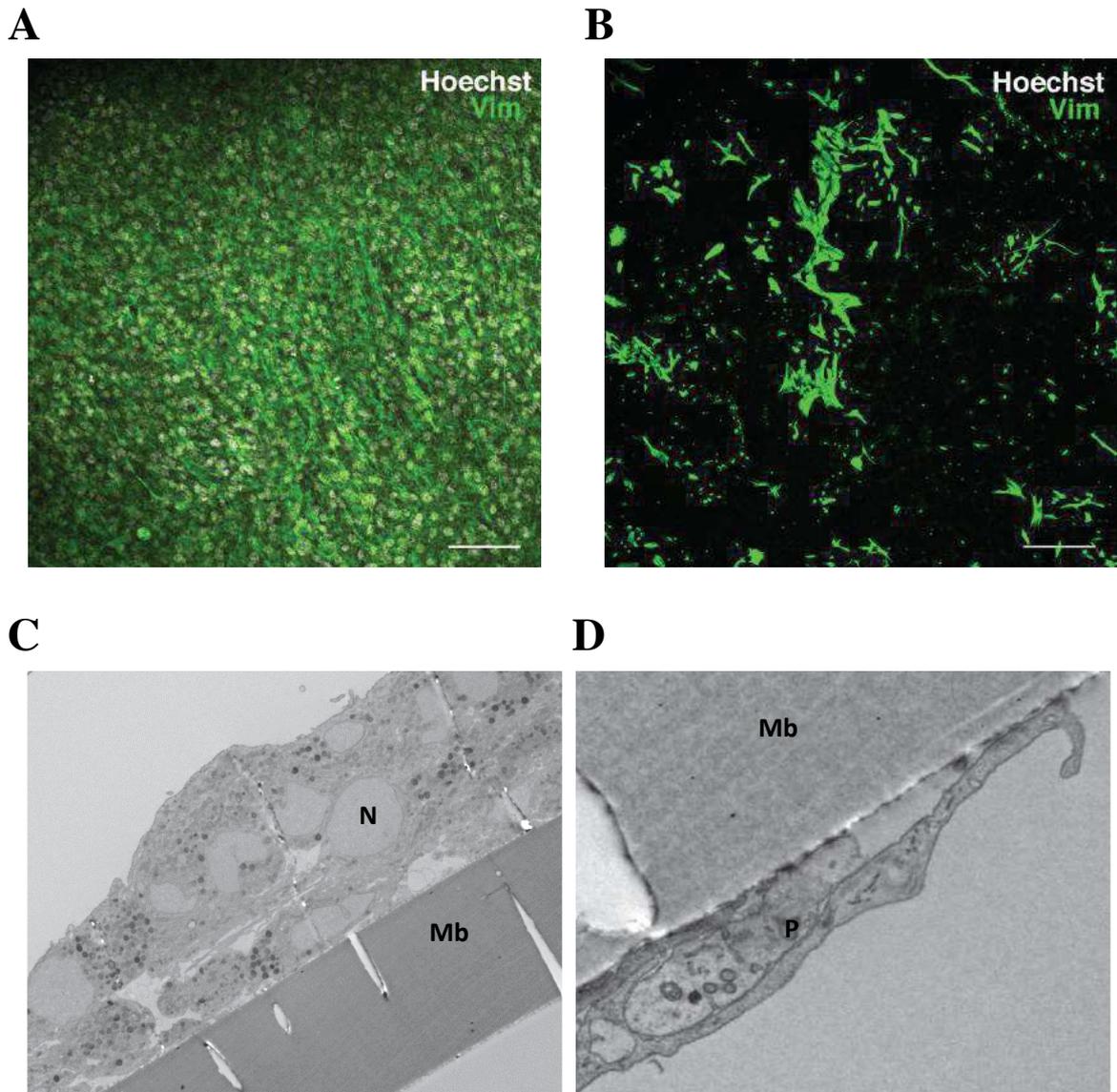
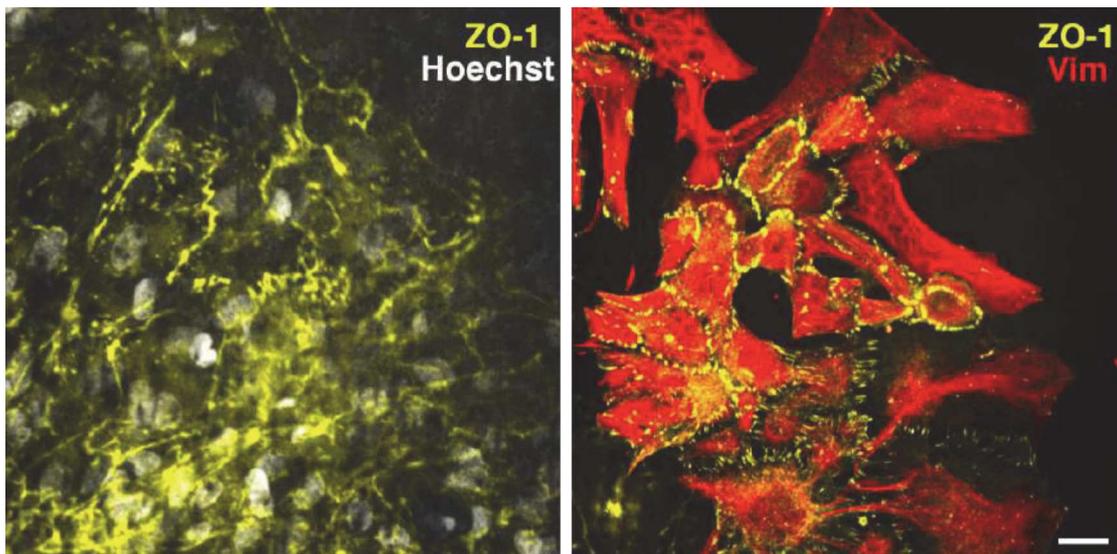


Figure 33 : Organisation des tanycytes en culture sur insert et extension des prolongements à travers la membrane. A-B) Images de microscopie confocale montrant

l'organisation des tanycytes sur les membranes avec des pores de 1 μm . En A, on observe sur la partie supérieure de la membrane les corps cellulaires (vert, vim) et les noyaux cellulaires (blancs) alors qu'en B, on observe uniquement sur la partie inférieure de la membrane les prolongements cellulaires (vert, vim). Après 6 jours de culture sur les inserts, les cellules sont fixées au PFA 4%, perméabilisées au triton 0,1%, puis incubées avec un anticorps primaire dirigé contre la vimentine (vim, vert) puis révélées par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa-488. Les noyaux (blanc) sont marqués avec le Hoechst. La zone supérieure représente le dessus de la membrane et l'inférieure, le gel de matrice extracellulaire. Les deux zones sont séparées par la membrane de 10 μm d'épaisseur. Le repère orthogonale (x, y, z) indique la profondeur (z) des plans (x, y) dans l'espace. Barre d'échelle 100 μm . **C-D)** Images de microscopie électronique représentant les tanycytes après 6 jours de culture sur insert. On repère les corps cellulaires des tanycytes (C) dans la partie supérieure formant plusieurs couches et les prolongements le long de la membrane, sur la partie inférieure (D). N : noyau ; Mb : membrane ; P : prolongement. Barre d'échelle 10 μm et 1 μm .

A



B



C

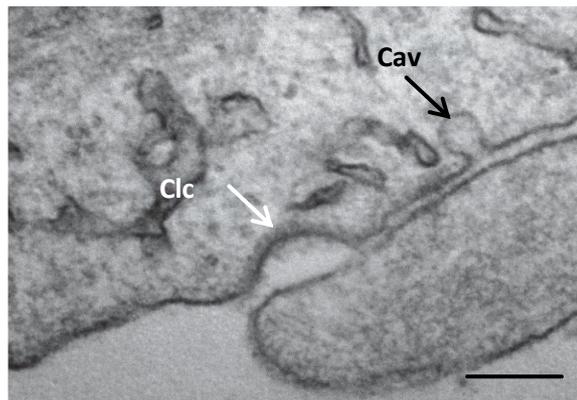


Figure 34 : Les tanyocytes en culture sur la membrane basale s'organisent en barrière et forment des jonctions serrées. **A)** Image de microscopie confocale montrant des tanyocytes ensemencés pendant 6 jours sur insert, fixés au PFA 4%, perméabilisés au triton 0,1% puis marqués avec un anticorps primaire dirigé contre la vimentine (Vim, rouge) et ZO-1 (zonula occludens, jaune), une protéine des jonctions serrées. Les cellules sont révélées par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 555 et 488 respectivement et les noyaux marqués au Hoechst (blanc) pendant 30 min. Barre d'échelle 20 μ m. **B-C)** Image de microscopie électronique représentant les prolongements des tanyocytes après 6 jours de culture sur insert montrant la formation de jonctions (**B**) entre les pieds tanyocytaires présents dans le gel de MB et la présence de puits de clathrine (flèche blanche) et de cavéoline (flèche noire). Échelle 100 nm. J : jonction ; Clc : clathrine ; Cav : cavéoline.

Une observation en microscopie électronique m'a permis de confirmer la présence de jonctions cellulaires entre deux prolongements tancytaires (figure 34, B), ainsi que la présence de structures d'endocytose, comme des puits de clathrine et des cavéoles (figure 34, C). L'ensemble de ces données suggère que les tancytes cultivés sur une membrane poreuse sont capables de former des jonctions serrées tant au niveau des corps cellulaires qu'au niveau des prolongements tancytaires. Cette organisation mime en partie celle observée *in vivo*.

1.3. LA LEPTINE EST-ELLE TRANSPORTEE PAR LES TANCYTES CULTIVES SUR MEMBRANE ?

L'organisation tridimensionnelle des tancytes *in vitro* reproduit donc en partie celle observée *in vivo* avec la formation de prolongements capables de croître dans un gel de membrane basale et la formation de jonctions serrées entre les corps cellulaires et les prolongements tancytaires. Cette organisation offre l'opportunité d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de la transcytose de la leptine dans les tancytes, c'est-à-dire le transport d'un pôle à un autre de la leptine.

J'ai tout d'abord testé la capacité des tancytes cultivés dans ce dispositif à endocyter la leptine fluorescente. Les tancytes sont cultivés sur la membrane pendant 6 jours, et de la leptine fluorescente (1 µg/ml) a été ajoutée au niveau des corps cellulaires (partie supérieure) pendant 30 min. Après fixation et marquage des noyaux, j'ai pu observer que la leptine fluorescente est internalisée par les corps cellulaires des tancytes en culture sur la membrane poreuse (figure 35, A). Elle est présente autour des noyaux des cellules mais également dans les prolongements qui n'ont probablement pas traversés les pores de la membrane. J'ai ensuite réalisé la même expérience en incubant cette fois la leptine dans le milieu de culture du puit inférieur, ou pénètrent les prolongements. J'ai pu observer que la leptine fluorescente est également retrouvée dans les corps cellulaires des tancytes suggérant son transport des prolongements jusqu'au corps cellulaires. Je n'ai cependant pas observé de leptine dans les prolongements, ceci pouvant notamment être expliqué par le choix du temps d'incubation (résultat non montré). Malgré la présence de leptine dans les corps cellulaires du compartiment supérieur, la question de la diffusion de la leptine à travers le gel de MB s'est posée. Dans un second temps, j'ai alors réalisé la même expérience en injectant la leptine fluorescente directement dans le gel de MB à l'aide d'une aiguille. 60 minutes après l'injection, les cellules sont fixées et la localisation de la leptine observée en microscopie confocale. De la leptine est retrouvée dans les prolongements ainsi que dans des corps cellulaires (figure 35, A et B). Ces résultats suggèrent que les tancytes ont endocyté la leptine présente dans le gel, au niveau de leurs prolongements d'où elle pourrait être transportée jusqu'au corps cellulaires.

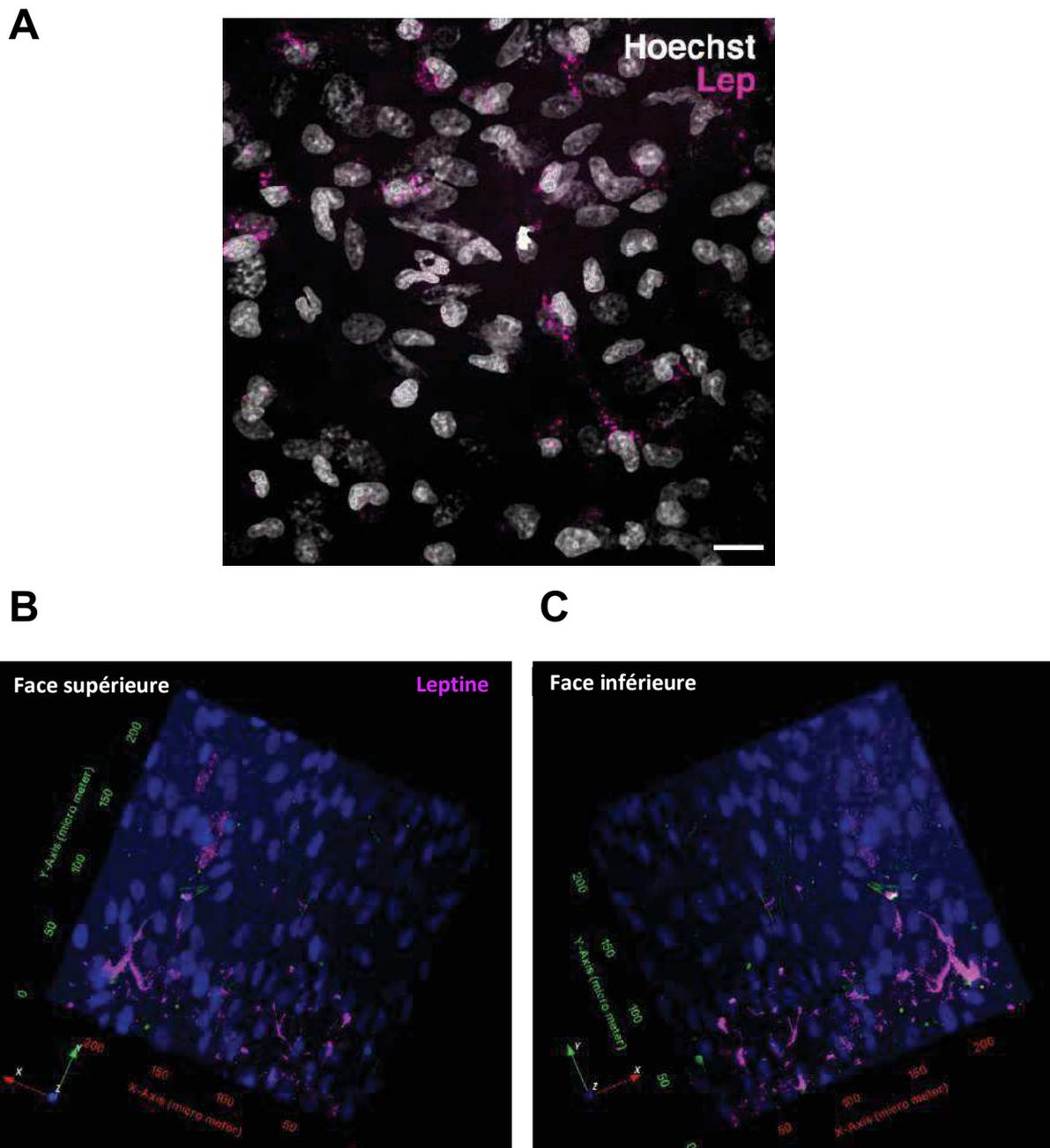


Figure 35 : La leptine est internalisée par les tanyocytes en culture sur insert.

A) Image de microscopie confocale de la face supérieure de l'insert montrant les corps cellulaires des tanyocytes après 6 jours de mise en culture sur la membrane. Les cellules sont incubées avec la leptine fluorescente (1 µg/ml, magenta) pendant 60 min, fixées au PFA 4% pendant 10 min, puis les noyaux (blanc) sont marqués au Hoechst pendant 30 min. Échelle 20 µm. **B-C)** Reconstitution en 3D de l'organisation des tanyocytes sur la membrane effectuée avec le logiciel ICY. Les images prises par microscopie confocale indiquent la présence de la leptine fluorescente (magenta) dans les corps cellulaires (B) situés dans la partie supérieure et dans les prolongements cellulaires (C) de la partie inférieure après une incubation de 60 min dans le gel de MB. Le repère orthogonale (x, y, z) indique la profondeur (z) des plans (x, y) dans l'espace.

L'utilisation de ce dispositif permet de suivre un transport de la leptine du compartiment inférieur vers le compartiment supérieur, donnant ainsi la possibilité de suivre le transport de la leptine des prolongements vers les corps cellulaires des tanycytes. Néanmoins, le volume du dispositif et l'épaisseur du gel rend l'imagerie plus complexe et l'étude du transport de la leptine sur cellules vivantes techniquement impossible. C'est pourquoi je me suis tournée vers un autre modèle de culture utilisant des puces microfluidiques.

II. CULTURE DES TANYCYTES SUR PUCES MICROFLUIDIQUES

II.1. ORGANISATION DES TANYCYTES DANS LA PUCE

Le dispositif précédent utilisant un gel de membrane basale à l'avantage de reconstituer une organisation tridimensionnelle qui se rapproche de la situation des tanycytes *in vivo*. Cependant, l'imagerie et les méthodes d'analyse sont limitées. A terme, il serait aussi informatif de visualiser le trafic de la leptine en temps réel, d'où l'idée de développer une méthode d'approche différente compatible à la fois avec le transport polarisé de la leptine et l'imagerie. Je me suis donc orientée vers l'utilisation de puces microfluidiques (Xona microfluidics) dont la géométrie permet d'envisager une séparation des corps cellulaires (compartiment A) et des pieds tanycytaires (compartiment B, figure 36, A). Les deux compartiments sont connectés par des micro-canaux (10 μm de large, 5 μm de haut, 150 μm de long) dans lesquels les prolongements pourraient s'étendre. Outre la géométrie, la diffusion des liquides est complètement contrôlée permettant de connaître le sens de diffusion des molécules d'intérêt (gauche vers la droite ²⁵⁵).

Les tanycytes ont donc été mis en culture dans le compartiment A et régulièrement observés au microscope. Après seulement 2 jours de culture, j'ai pu observer que des tanycytes émettent des prolongements dans les micro-canaux et qu'ils rejoignent le compartiment B (figure 36, B). Après 5 jours de culture, les tanycytes sont fixés et marqués pour l'actine. De longs prolongements riches en actine sont visibles et traversent les canaux. Les prolongements ainsi formés, dépassent les 150 μm de long. De plus, quelques cellules en migration sont retrouvées dans les micro-canaux centraux ainsi que dans le compartiment B, montrant que les corps cellulaires peuvent traverser des canaux de 10 μm (figure 36, C). Ainsi, une séparation physique peut s'établir entre l'extrémité du prolongement et le corps cellulaire lorsque les tanycytes sont cultivés dans les puces.

II.2. LA LEPTINE EST INTERNALISEE PAR LES PROLONGEMENTS TANYCYTAIRES ET TRANSITE PAR LES ENDOSOMES PRECOCES

Les tancytes émettent des prolongements permettant de connecter les deux compartiments de la puce. La géométrie des canaux et la différence de volume entre les compartiments empêchent la diffusion des molécules du canal B vers le canal A. Ainsi, ce dispositif devrait permettre de suivre le transport polarisé de la leptine puisque les prolongements cellulaires, mais pas les corps cellulaires, pourront être mis en contact de la leptine. Afin de caractériser ce transport, les tancytes sont cultivés pendant 5 jours sur les puces et de la leptine fluorescente est ajoutée (1 µg/ml) dans le compartiment B. Après 5 minutes, les cellules sont fixées puis les endosomes précoces (EEA1, jaune) et la vimentine (Vim, magenta) sont marqués. Les images de microscopie confocale montrent que la leptine fluorescente (cyan) est détectée dans les prolongements cellulaires et au niveau des corps cellulaires (figure 37, B). Un certain nombre de structures positives pour EEA1 sont aussi positives pour la leptine. Le marquage est punctiforme et principalement périnucléaire. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la leptine a été endocytée au niveau des prolongements cellulaires et acheminée jusqu'au corps cellulaire par les endosomes.

III. CONCLUSION

Mes travaux sur les systèmes de culture 3D ont permis de montrer que les tancytes s'organisent entre eux, et forment des jonctions cellulaires au niveau de leurs corps cellulaires et de leurs prolongements, mimant l'organisation de barrière observée *in vivo*.

J'ai pu montrer également que la leptine est internalisée par les prolongements des tancytes à la fois dans la culture sur membrane 3D et sur puce la microfluidique, pour être transportée jusqu'aux corps cellulaires des tancytes isolés. De plus, la leptine internalisée transite via les endosomes précoces dans les tancytes cultivés sur la puce microfluidique.

Ces systèmes de culture *in vitro* sont particulièrement intéressants et permettraient de suivre la transcytose de leptine dans des tancytes polarisées (culture 3D) et sur des cellules vivantes (microfluidique).

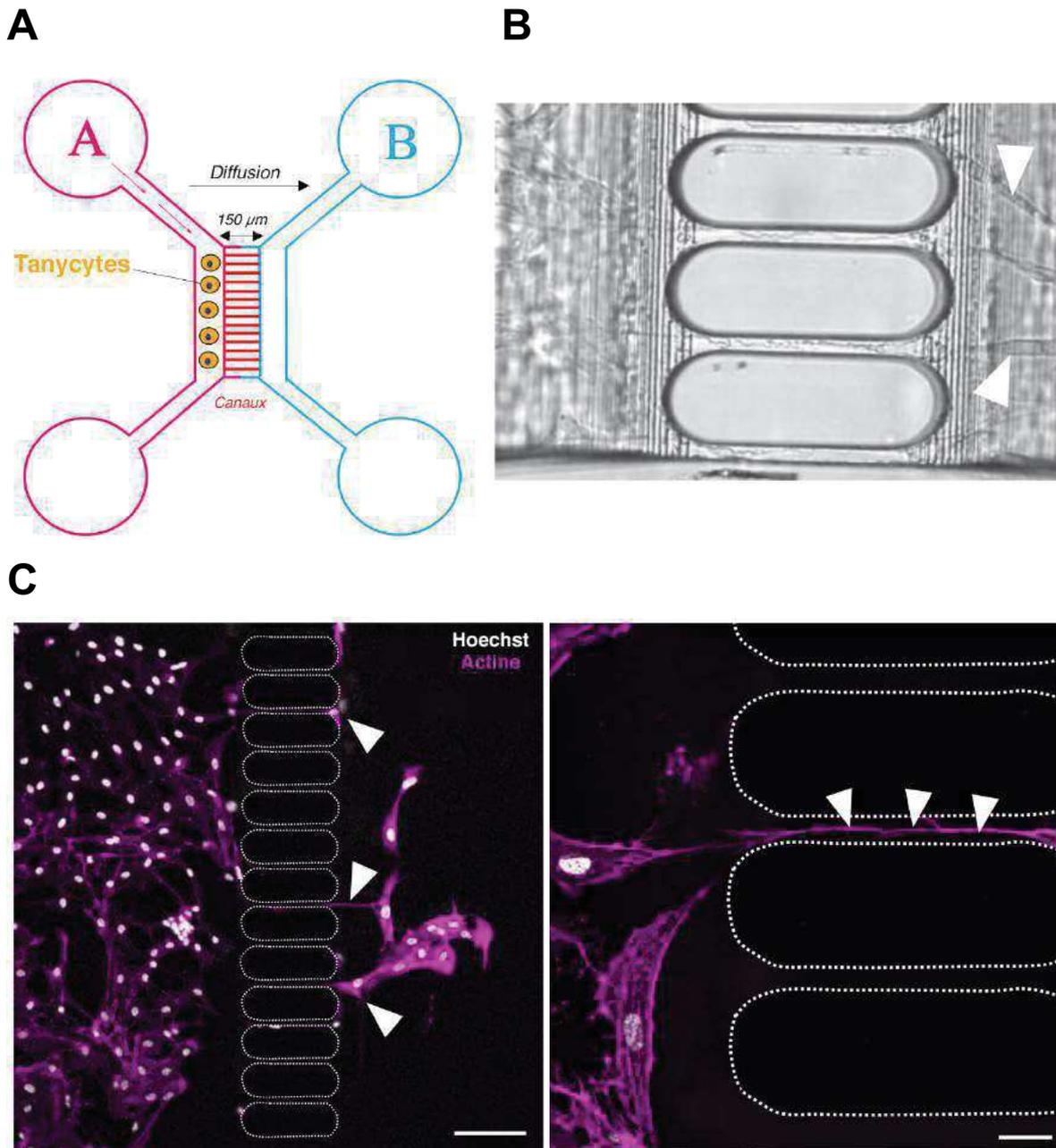


Figure 36 : Figure : Les tanycytes émettent des prolongements dans les canaux de la puce microfluidique. A) Schéma d'organisation de la puce microfluidique, composée de 2 compartiments séparés par des micro-canaux d'une longueur de 150 μm . Les tanycytes sont ensemencés dans le puit A et migrent vers le bas du puits et vers le compartiment B dans le sens du fluide. Le sens de diffusion des molécules est unidirectionnel, de la gauche vers la droite. Après 5 jours de culture, les cellules sont fixées au PFA 4%. **B)** Images de microscopie à contraste de phase après 2 jours de culture sur la puce microfluidique. Les flèches indiquent les prolongements des tanycytes à travers les canaux qui contactent le compartiment B. **C)** Images de microscopie confocale montrant les tanycytes marqués pour l'actine (magenta) après 5 jours de culture et les noyaux au Hoechst (blanc). Les flèches indiquent les tanycytes ayant traversé les micro-canaux. Échelle 100 μm . L'image de droite représente un prolongement tanycytaire traversant sur les micro-canaux. Échelle 20 μm .

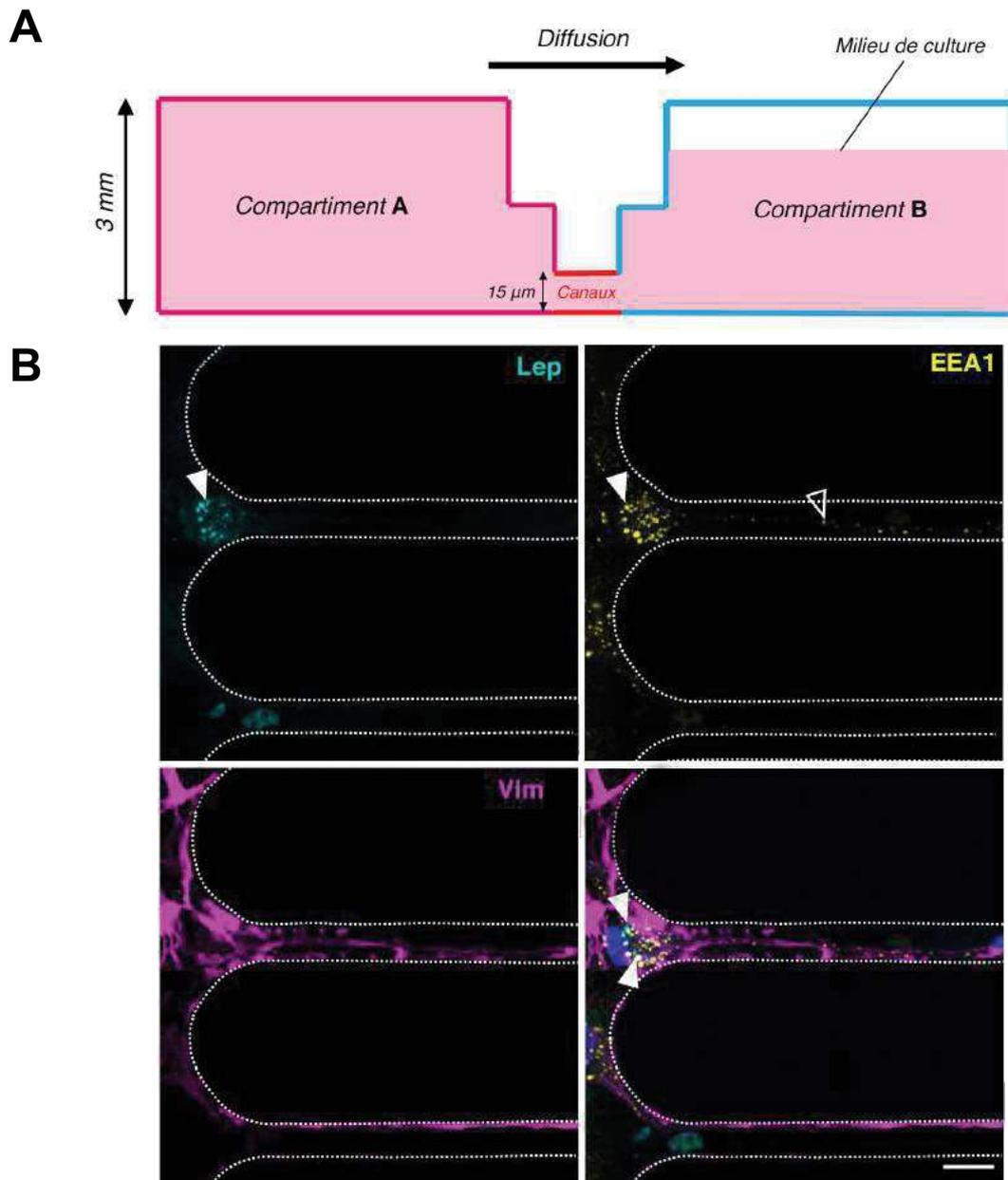


Figure 37 : La leptine est internalisée par les prolongements des tanocytes et rejoint les endosomes précoces. **A)** Schéma d'organisation de la puce microfluidique indiquant le sens de diffusion unidirectionnel des molécules (compartiment A vers B). Les tanocytes sontensemencés dans le puit A, et migrent vers les micro-canaux pour émettre des prolongements dans le compartiment B. **B)** Images de microscopie confocale montrant les tanocytes après 5 jours de culture sur la puce microfluidique. Les cellules sont incubées en présence de leptine pendant 5 minutes puis marquées pour la vimentine (Vim, magenta), les endosomes précoces (EEA1, jaune) et les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Les flèches blanches indiquent la présence de la leptine dans les endosomes précoces. La flèche vide pointe la présence d'endosomes précoces dans les prolongements des tanocytes. Échelle 20 µm.

DISCUSSION GENERALE

I. RECEPTEUR A LA LEPTINE OB-R ET INTERNALISATION

I.1 – EXPRESSION DU RECEPTEUR A LA LEPTINE DANS LES TANYCYTES

La leptine est une hormone circulante. Une fois sécrétée par les adipocytes, elle rejoint la circulation sanguine, puis l'hypothalamus pour réguler la balance énergétique et maintenir l'homéostasie. L'action centrale de la leptine peut se faire uniquement si elle est transportée du sang vers ses cibles hypothalamiques et les tanyocytes jouent un rôle clé dans ce processus en contrôlant l'entrée des molécules au niveau de l'EM⁷². Cependant, à ce jour, aucune étude n'a montré par quels mécanismes la leptine est internalisée et transportée par les tanyocytes. J'ai pu montrer au cours de ma thèse que les tanyocytes expriment le récepteur Ob-R et que l'internalisation de la leptine requiert la présence de son récepteur. En effet, j'observe que 20% des tanyocytes de la culture sont capables d'internaliser la leptine et que ces cellules sont marquées par l'anticorps XPA. La leptine est co-internalisée avec l'anticorps, suggérant la formation d'un complexe lors de l'endocytose.

Pourquoi une faible part seulement des tanyocytes *in vitro* exprime le récepteur et donc internalise la leptine ? Plusieurs hypothèses pourraient permettre de répondre à cette question. *In vivo*, les tanyocytes représentent une population hétérogène et sont classés en différents sous-types selon leur répartition et leur organisation le long du 3e ventricule et dans l'EM : les tanyocytes α -1, α -2, β -1 et β -2^{256,68}. Néanmoins, au cours des dernières années les études montrent que chaque sous-groupe de tanyocytes présente des phénotypes et caractéristiques propres⁶³. En effet, il est également important de prendre en considération l'interaction des tanyocytes avec les cellules neuronales et endothéliales et la différence dans l'expression des gènes des différents tanyocytes⁶²⁻⁶⁴. De cette manière, il est possible d'imaginer que la culture primaire de tanyocytes est également hétérogène, et qu'un seul sous-type de tanyocytes exprime le récepteur à la leptine et qu'il pourrait s'agir du sous-type β montré comme capable de transporter la leptine dans l'EM⁷². La proposition faite d'une nouvelle classification plus complète⁶², prenant en compte l'expression des gènes et de nouveaux marqueurs cellulaires semble nécessaire afin de cibler plus spécifiquement un sous-groupe et de mieux comprendre leur fonction dans le transport moléculaire et la régulation du métabolisme énergétique^{64,66}. Je me suis focalisée sur le marquage DARPP32 exprimé par l'ensemble des tanyocytes, et FGF10 exprimé par les tanyocytes β mais il serait nécessaire d'utiliser d'autres marqueurs plus spécifiques pour caractériser la culture⁸⁵. Récemment identifiés par la technique RNAseq, des marqueurs tels que *Adm* et *Col25a1* permettraient d'identifier les tanyocytes β ^{64,257,258}.

La seconde hypothèse pour expliquer le faible pourcentage de cellules leptine-positives pourrait être le niveau d'expression des récepteurs à la leptine à la surface des tanocytes. Outre le fait d'exprimer le récepteur Ob-R, la possibilité d'internaliser la leptine par les cellules dépend de la part des récepteurs Ob-R présents au niveau de la membrane plasmique et disponibles au moment de l'internalisation. C'est la résultante d'une balance entre : synthèse des récepteurs, acheminement à la membrane plasmique, internalisation dépendante ou indépendante de la leptine, recyclage et dégradation²⁵⁹. Plusieurs études réalisées *in vitro* sur des modèles hétérologues ont mis en évidence la présence de pools intracellulaires de récepteurs à la leptine principalement au niveau du golgi/TGN^{204,205}. Or, seulement une faible partie (5-20%) des récepteurs Ob-R néo-synthétisés et accumulés à ce niveau est adressée à la membrane plasmique pour induire une activation des voies de signalisation. Ceci peut s'expliquer par une endocytose constitutive du récepteur, indépendante de la fixation de la leptine et qui ne conduit pas à un recyclage mais à une dégradation de Ob-R par les lysosomes^{205,211}. C'est l'observation qui a été faite sur les cellules HeLa par l'équipe de Yves Rouillé montrant, que l'internalisation de Ob-Ra et Ob-Rb est constitutive²⁰⁵. Les auteurs ont également montré plus tard, que les récepteurs Ob-Ra et Ob-Rb sont ubiquitinylés au niveau de leur queue cytoplasmique (sur deux résidus lysine), un processus requis uniquement dans le cas de l'isoforme Ob-Ra lors de l'endocytose dépendante de la clathrine²⁰⁶. L'ubiquitination affecte la dégradation des récepteurs et plus généralement leur trafic, modulant l'exposition des récepteurs à la surface cellulaire et la voie empruntée dans la cellule²⁵⁹.

La machinerie impliquée dans la régulation de l'expression des récepteurs Ob-R à la membrane reste encore à déterminer mais l'implication de certaines familles de protéines a émergé depuis les années 2000. Des auteurs ont montré l'implication d'une protéine de la famille des endospanines, l'endospanine-1, également connue sous le nom de Ob-RGRP (*Ob-R gene-related protein*) ou LEPROT (*leptin receptor overlapping transcript*), dans la régulation de l'adressage à la membrane plasmique des récepteurs à la leptine. Cette protéine codée par le même gène que le récepteur à la leptine est présente dans les endosomes²⁶⁰. C'est un régulateur négatif de l'expression du récepteur Ob-Rb à la surface cellulaire²¹⁴. Quelques années plus tard, les travaux de Séron et collaborateurs ont montré l'interaction de l'endospanine-1 avec le récepteur Ob-Rb et son rôle dans la modulation de son expression à la surface membranaire en l'adressant, des endosomes vers les lysosomes, favorisant ainsi sa dégradation²⁶¹. L'endospanine-1 est définie comme un intégrateur hypothalamique impliqué dans le contrôle de la signalisation du récepteur à la leptine et son inactivation favorise un recyclage du récepteur à la membrane plasmique et donc la disponibilité d'Ob-R à la surface cellulaire^{215,261,262}.

D'autres protéines ont également été identifiées comme impliquées dans la régulation du trafic intracellulaire du récepteur Ob-R telles que les protéines du syndrome de Bardet-Biedl (BBS). Dans le syndrome de Bardet-Biedl (maladie génétique), les protéines BBS, sont impliquées dans le trafic de récepteurs dans les neurones²⁶³. Des mutations dans les gènes BBS conduisent chez les patients atteints ce syndrome, au développement d'une obésité caractéristique²⁶⁴. Dans la famille des protéines BBS, 8 sont connues, dont BBS1 et BBS2, pour interagir avec Ob-R et jouer un rôle dans son adressage à la surface cellulaire. Contrairement au rôle négatif de l'endospanine-1, la protéine BBS1 va favoriser la présence du récepteur Ob-R à la surface de la cellule, et le rendre disponible pour la leptine. Ainsi, chez la souris, une délétion de BBS1 dans les neurones qui expriment Ob-Rb, empêche la fixation de la leptine sur son récepteur. La leptine ne pouvant induire son action anorexigène, ces souris développent une obésité^{265,266}.

L'ensemble de ces travaux montrent que la régulation du trafic du récepteur à la leptine OB-R est un mécanisme central dans la mise en place de l'obésité. Il est donc important de mieux comprendre les acteurs impliqués. L'étude de l'expression et de la signalisation du récepteur Ob-R reste néanmoins difficile. La faible expression de Ob-R au niveau de la membrane plasmique associée à un manque d'outils de détection constituent un frein dans son suivi et rend difficile son étude dans des systèmes non surexprimés. Afin de mieux comprendre sa régulation et les processus mis en jeu, il est primordial de développer et d'utiliser de nouveaux modèles.

1.2- ROLE PHYSIOLOGIQUE DU RECEPTEUR OB-R DANS LES TANYCYTES

Lors de mes travaux et grâce à l'utilisation de l'anticorps XPA qui reconnaît le domaine CRH1 du récepteur à la leptine et de la leptine fluorescente, j'apporte des évidences qu'une partie des tanyocytes *in vitro* semblent endocyter la leptine grâce à son récepteur ObR. Ces résultats ont été intégrés dans un article réalisé en collaboration avec l'équipe de Vincent Prévot qui montre l'implication du récepteur Ob-R dans le transport et l'action centrale de la leptine au niveau des tanyocytes. Ces résultats ont été obtenus grâce à un modèle de souris LepRloxP/loxP qui permet, par injection stéréotaxique dans le 3e ventricule de la recombinaison Cre recombinante capable d'entrer dans les cellules (tat-Cre), de cibler les cellules bordant le 3e ventricule et de supprimer le récepteur Ob-R, spécifiquement dans les tanyocytes. L'ablation de Ob-Ra et Ob-Rb ainsi obtenue conduit à une obésité modérée et à une augmentation de l'adiposité chez les souris. Cette inhibition empêche le transport de la leptine vers ses cibles neuronales présentes dans le NA dont notamment les neurones POMC et AgRP

conduisant à une augmentation de la prise alimentaire et à une accumulation de lipides (voir article page 8). Ces données sont en lien avec des travaux montrant qu'une délétion de Ob-R dans ces deux populations neuronales conduit à une augmentation de l'adiposité^{267,268}. L'ensemble s'accompagne par une altération du contrôle central de l'homéostasie du glucose et au niveau périphérique par une déficience de fonction des cellules β -pancréatiques. De manière intéressante, on retrouve une sous-expression des gènes de réponse à l'action de la leptine dans le NA quand le récepteur Ob-R est supprimé dans les tanocytes.

L'association de nos données *in vitro et in vivo*, montre clairement que les tanocytes expriment le récepteur à la leptine et que celui-ci est fonctionnel. De plus, l'expression du récepteur est essentielle pour la transcytose de la leptine dans les tanocytes et son transport du sang vers le LCR afin de rejoindre ces cibles neuronales dans le NA. De manière générale, ce transport induit par Ob-R semble jouer un rôle vital dans le contrôle de la fonction des cellules β -pancréatiques, le stockage lipidique et l'homéostasie du glucose.

Malgré ces résultats, la littérature récente jette le trouble sur l'expression du récepteur Ob-R dans les tanocytes. En effet, des travaux publiés en 2019 par l'équipe de Blackshaw suggèrent que le récepteur Ob-R n'est pas exprimé dans les tanocytes ou en très faible quantité. Néanmoins, comme expliqué précédemment, les méthodes de détection du récepteur à la leptine étant une limite importante, il est possible que les techniques utilisées ne soient pas assez sensibles pour le détecter. Les auteurs montrent également que la délétion de Ob-R dans les tanocytes n'affecte pas l'activation de la signalisation STAT3 dans les neurones hypothalamiques¹⁶¹, facteur final d'activation de la voie induite par Ob-R. Dans ces travaux, le modèle de souris Rax-CreERT2²⁶⁹ pour lequel le récepteur à la leptine est délété sélectivement dans les tanocytes est utilisé. La recombinaison dépendante de l'expression de la recombinaise Cre exprimée dans les tanocytes est induite après une injection intrapéritonéale de tamoxifène ou par ingestion de nourriture contenant le tamoxifène. Or, il est important de considérer que cette molécule est connue pour altérer structurellement le cytosquelette d'actine, et pour interférer plus globalement, lors d'une prise prolongée, avec la régulation du métabolisme et l'axe de reproduction²⁷⁰. Ces altérations physiologiques globales pourraient masquer les effets de la délétion du récepteur Ob-R dans les tanocytes.

Dans notre étude, nous utilisons une autre méthode qui a permis de s'affranchir de ces effets indésirables par l'injection de tat-Cre recombinaise directement dans le 3e ventricule des souris^{70,271}. L'ensemble des cellules bordant le ventricule sont touchées, dont les tanocytes, les cellules épendymaires et le plexus choroïde. Cependant, il est important de noter que quelques neurones du parenchyme peuvent être également recombinés par diffusion de la tat-Cre²⁷².

Pour tenter de trancher et ajouter un niveau de preuve supplémentaire à l'action du récepteur à la leptine, il serait intéressant d'utiliser le modèle de rat Koletsky fak/fak (SHROB) qui, en conséquence d'une mutation récessive non-sens, n'exprime pas le récepteur à la leptine²⁷³. Les rats porteurs de cette mutation développent une obésité associée à une hypertension, une hypertriglycémie, une hyperlipidémie et hyperinsulinémie. Il serait donc intéressant d'effectuer une culture primaire de tanocytes de rats SHROB et de les incuber en présence de leptine fluorescente afin de voir l'effet d'une délétion de Ob-R dans les tanocytes *in vitro*. Je m'attends à ce que la leptine ne soit pas internalisée par ces tanocytes et que l'endocytose soit bloquée. L'étape finale de cette expérience serait de transfecter ces tanocytes avec un plasmide codant pour Ob-Ra et Ob-Rb dans le but d'observer une restauration de l'endocytose de la leptine et déterminer dans quelle mesure les deux isoformes sont impliqués dans ce processus.

1.3 – ENDOCYTOSE DE LA LEPTINE, UNE SEULE VOIE IMPLIQUEE ?

Au cours de ma thèse, j'ai montré que la leptine est internalisée par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. L'inhibition de cette voie par l'utilisation d'un mutant dominant négatif de l'Epsine-15 et d'un ARN interférent dirigé contre la chaîne lourde de la clathrine, induit un blocage de l'internalisation de la leptine fluorescente. Mes résultats sont en accord avec les travaux réalisés par Belouzard et Rouillé en 2006²⁰⁶, qui montrent que les récepteurs Ob-Ra et Ob-Rb sont internalisés par la voie dépendante de la clathrine. De plus, une étude portant sur le transport d'une autre hormone métabolique dans les tanocytes de l'EM, la ghréline, suggère également que son endocytose dépend de la clathrine⁷³. Cependant, on peut se demander si l'endocytose dépendante de la clathrine constitue la seule et unique voie d'internalisation empruntée par la leptine dans les tanocytes ? En effet, mes données indiquent un pourcentage de colocalisation seulement de 30% entre la leptine et la clathrine ce qui pourrait suggérer l'implication d'une autre voie d'internalisation pour la leptine et le récepteur Ob-R par les tanocytes. L'observation des tanocytes en culture au microscope électronique a attiré notre attention sur la présence d'un autre type d'invaginations membranaires de forme plus allongée, qui contrairement aux vésicules de clathrine ne possède pas de zone dense autour de la vésicule, caractéristique du manteau de clathrine. Ces structures pourraient s'apparenter à des cavéoles (figure 38, A).

Identifiées la première fois par l'équipe de Georges Palade dans les années 1950, le rôle des cavéoles dans l'internalisation de complexe hormone/récepteur a été mis en avant au cours du processus de transcytose dans les vaisseaux sanguins¹⁸². On les retrouve également dans les cellules

endothéliales de la barrière hémato-encéphalique présentes dans le NA⁶⁶. De plus, dans l'hypothalamus médio-basal, la cavéoline-1 serait retrouvée dans les tanocytes β mais pas dans les tanocytes α . Elle est exprimée au niveau apical mais également au niveau des prolongements des tanocytes $\beta 1$ et $\beta 2$ ²⁵². Cette distribution pourrait traduire une différence dans les mécanismes de transport des molécules par les différents types de tanocytes. Pour éclairer le rôle possible des cavéoles dans l'endocytose de la leptine par les tanocytes, j'ai réalisé un marquage de la cavéoline-1 (cav-1) à différents temps d'internalisation de la leptine. L'observation d'un marquage punctiforme de cav-1 dans les cellules valide la présence des cavéoles observés en ME dans les tanocytes (figure 38, B). De plus, environ 30% de la leptine fluorescente colocalise avec Cav-1, après 5 minutes d'internalisation (figure 38, C). Ces données préliminaires suggèrent qu'une partie de la leptine pourrait être également internalisée dans les vésicules de cavéoline dans les tanocytes. Cependant, il est nécessaire d'aller plus loin dans les expériences pour montrer son implication fonctionnelle. Il serait en effet intéressant d'utiliser un ARN interférant (sh-RNA) dirigé contre la cavéoline-1 ce qui permettrait d'éclairer son rôle dans le processus d'endocytose de la leptine par les tanocytes.

Il n'est pas absurde de penser qu'un complexe hormone/récepteur pourrait emprunter deux voies d'endocytose différentes dans un type cellulaire. Selon la voie d'internalisation empruntée, un cargo n'a pas la même destination dans la cellule et va rejoindre différents compartiments, participant au recyclage ou à la dégradation par exemple. De plus, à l'instar de l'EGF, une seconde voie d'internalisation pourrait être impliquée de manière dépendante à la concentration de leptine utilisée. En effet, une quantité trop importante de leptine circulante pourrait être acheminée dans les voies de dégradation afin de limiter son passage dans le LCR et protéger les cibles hypothalamiques d'une certaine toxicité. Dans ma culture de tanocytes, j'utilise une quantité de leptine de 2 $\mu\text{g/ml}$, or physiologiquement, les rats ont un taux plasmatique de leptine circulante variant de 5 ng/ml en basal à 9 ng/ml environ au pic de la journée selon les rythmes circadiens²⁷⁴. Il est donc important de considérer cette différence de concentration bien supérieure à la concentration physiologique, qui pourrait conduire à l'activation d'autres voies de trafic ou encore de dégradation.

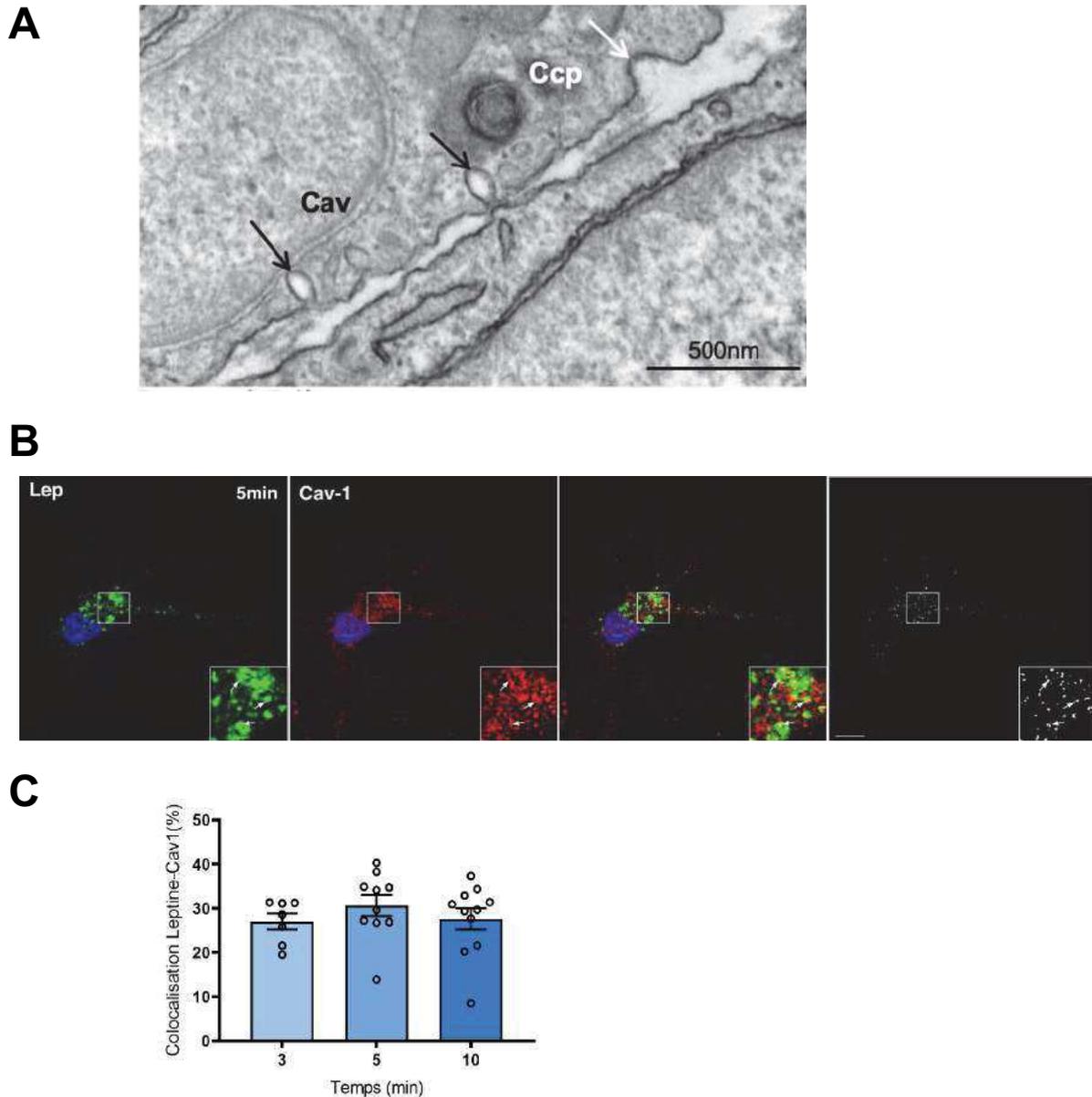


Figure 38 : La leptine colocalise avec la cavéoline dans les tanyocytes *in vitro*.

A) Image de microscopie électronique représentant des tanyocytes après 12 jours de culture. Cav = cavéole (flèche noire) ; ccp = vésicule de clathrine (flèche blanche). Barre d'échelle 500 nm. **B)** Images de microscopie confocale de tanyocytes maintenus dans du milieu de restriction pendant 48h et incubés avec la leptine fluorescente (Lep, 2 µg/ml, vert) en continu pendant 3, 5 et 10 min à 37°C. Après 10 min de fixation au PFA 4% et une perméabilisation au triton 0,1% pendant 5 min, les tanyocytes sont marqués avec un anticorps primaire dirigé contre cav-1 (rouge) puis révélés avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 555 et les noyaux des tanyocytes sont marqués au Hoechst (bleu) pendant 30 min. Barre d'échelle 10 µm. **C)** Graphique de colocalisation de la leptine avec la cavéoline-1 au cours du temps. Le graphique représente le pourcentage moyen de colocalisation de la leptine avec la cavéoline-1 (%) ± SEM.

1.4 – ENDOCYTOSE DE LA LEPTINE, ACTION DE LA DYNAMINE ?

La dynamine est une protéine à activité GTPase contrôlant la fission membranaire, assurant ainsi le détachement des vésicules d'endocytose de la membrane plasmique. L'action des dynamines a été montrée dans divers processus d'endocytose dont ceux dépendants de la clathrine où des cavéoles. Il existe 3 dynamines, la dynamine-1 et la dynamine-3 étant principalement exprimées dans le cerveau, tandis que la dynamine-2 est exprimée de façon ubiquiste²⁷⁵.

Des résultats préliminaires m'ont permis de suggérer l'implication de la dynamine dans le processus d'internalisation de la leptine dans les tanocytes. En effet, l'inhibition non spécifique de l'activité GTPase des dynamines par l'utilisation d'un agent chimique tel que le dynasore altère l'endocytose de la leptine. Le dynasore est un inhibiteur réversible et non compétitif de l'activité GTPase de la dynamine 1 et 2 qui pénètre à travers les membranes²⁷⁶. J'observe dans les tanocytes pré-traitées avec le dynasore (50 μ M, 30 min) un blocage de l'endocytose de la leptine. Cette observation a également été faite lors du suivi de l'internalisation de la transferrine dans une culture de fibroblastes après traitement avec le dynasore (80 μ M)²⁷⁷. De plus, mes données indiquent une inhibition partielle de l'entrée de leptine fluorescente dans les tanocytes après 5 et 15 min d'internalisation en présence de dynasore (figure 21, B). L'utilisation d'une concentration de dynasore de 80 μ M, semblable à celle utilisée dans l'étude citée précédemment permettrait peut-être une meilleure inhibition de l'endocytose de la leptine. C'est ce que montre Hong et collaborateurs dans leurs travaux sur des cellules HEK293. En effet, l'utilisation du dynasore conduit à une réduction de l'internalisation d'une leptine radiomarquée dépendante du récepteur Ob-Ra et cette inhibition est dose-dépendante²⁰⁸.

L'utilisation du dynasore m'a permis de seulement de suggérer l'implication des dynamines dans le processus d'endocytose de la leptine dans les tanocytes. Les données obtenues avec un inhibiteur chimique tels que le dynasore sont à prendre avec précaution d'autant que des effets non spécifiques aux dynamines ont été rapportés notamment au niveau du cholestérol, des radeaux lipidiques et de l'organisation de l'actine²⁷⁸. Afin de valider le rôle fonctionnel d'une dynamine dans l'endocytose de la leptine par les tanocytes, il sera nécessaire d'utiliser d'autres outils. Par exemple, je pourrais évaluer l'impact sur l'endocytose de leptine de l'expression du mutant dominant négatif K44A des différentes dynamines, mutant connu pour empêcher la formation des vésicules d'endocytose^{279,280}. Ou bien tout simplement réduire spécifiquement l'expression de chacune des isoformes de dynamines par ARNs interférents.

II. SIGNALISATION DE LA LEPTINE ET TRAFIC INTRACELLULAIRE

J'ai pu montrer au cours de ma thèse qu'une forme mutée de la leptine (LAN) qui a la capacité de se fixer sur le récepteur OB-R sans en activer les voies de signalisation était tout aussi efficacement internalisée par les tanocytes que la leptine sauvage (figure 27). En accord avec les travaux de l'équipe d'Yves Rouillé²⁰⁵, ces résultats indiquent clairement que l'internalisation du récepteur est constitutive et indépendante de son activation par la leptine. Cependant, une fois la leptine internalisée, son transport intracellulaire semble être en partie contrôlé par les voies de signalisations induites par l'activation du récepteur puisque la leptine LAN reste bloquée dans les endosomes précoces.

Un tel lien entre transport vésiculaire et signalisation n'est pas nouveau. Par exemple, dans l'endocytose dépendante de la clathrine, la β -arrestine qui intervient comme adaptateur entre la clathrine, le complexe AP-2 et les RCPG, interagit avec certains composants de la voie des MAPK (Raf, ERK) et Src. Elle participe ainsi à la régulation de cette voie de transduction en permettant la formation et l'organisation de complexes protéiques de signalisation dans les différents compartiments intracellulaires²⁸¹. Des études ont également montré le rôle prépondérant que joue la dynamine dans l'établissement des voies de signalisation. En effet cette protéine interagit, via son domaine de liaison SH3 avec des protéines de la voie de signalisation des MAPK comme GRB2 et SOS modulant leur activité^{282,283}.

Ainsi, il faut imaginer que certaines protéines de l'endocytose et du trafic intracellulaire en général puissent faire le lien entre l'activation des récepteurs membranaires et certains composants des voies de signalisation, et que les différents compartiments nécessaires à l'endocytose constituent parfois de véritable plateforme de signalisation.

II.1 – IMPLICATION DE LA VOIE DES MAPK DANS LE TRAFIC INTRACELLULAIRE

Les données *in vivo* et *in vitro* publiées par nos collaborateurs ont montré que le transport de la leptine nécessite l'activation de la voie ERK dans les tanocytes et que cette signalisation est altérée chez les souris rendues obèses par un régime riche en gras (*Diet-induced obesity, DIO*)⁷². Mes travaux montrent que l'inhibition de la voie ERK conduit au blocage de la leptine dans les endosomes précoces (figure 30, A et B). Ceci met en exergue le lien existant entre la signalisation de la voie MEK/ERK et le trafic intracellulaire dans les tanocytes. Néanmoins, comment cette voie intervient dans le transport intracellulaire reste une question posée.

La majeure partie de ERK1/2 et les autres composants de la cascade ERK vont rejoindre le noyau cellulaire, et seule une petite partie va se retrouver au niveau des différents compartiments intracellulaires²⁸⁴. La protéine MEK1/2 ciblée par l'inhibiteur U0126 est une MAPKKs spécifique de la cascade de signalisation qui se localise dans le cytoplasme et au niveau nucléaire afin de réguler la transcription de ERK qui va relayer son signal. Plusieurs études montrent que MEK1/2 et ERK1/2 sont localisées dans les endosomes précoces, dans lesquels ils sont recrutés par la β -arrestine²⁸⁵. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus lors de l'utilisation du LAN ou de l'inhibiteur U0126 dans les tanocytes. On pourrait de la même façon imaginer que les protéines MEK1/2 et ERK1/2 dans les tanocytes sont recrutées au niveau des endosomes précoces par le même processus, et il serait intéressant de tester cette hypothèse.

Le trafic intracellulaire jouerait également un rôle majeur dans la transduction du signal principalement par la fixation du ligand sur le récepteur entraînant l'endocytose. Dans le cas de l'EGFR, Teis et collaborateurs montrent que c'est à l'étape de transit dans les endosomes tardifs qui contiennent la protéine MP1 (MEK1-partners), que la voie ERK pourrait avoir une activité de régulation du trafic intracellulaire. En effet, cette protéine MP1 en association avec p14 est capable de lier MEK1, ERK1 et ERK2 et de recruter ERK à la proximité du récepteur EGFR actif dans ces endosomes²⁸⁶. Ainsi, le sort du récepteur EGFR peut dépendre de la signalisation au niveau des endosomes, comme suggéré pour le complexe leptine/Ob-R. Or contrairement à l'EGF, la leptine va ressortir de la cellule, et donc emprunter une voie de sortie qui pourrait faire intervenir les kinésines/dynéines, qui sont des cibles potentielles de ERK²⁸⁷.

II.2 – QUEL LIEN ENTRE LA VOIE DE L'EGFR ET DE LA LEPTINE ?

J'ai pu démontrer que la signalisation du récepteur à la leptine Ob-R et l'EGFR jouent un rôle crucial dans le processus de transcytose par lequel la leptine est transportée jusqu'à l'hypothalamus. En effet, l'activation de la voie ERK est nécessaire au transport de la leptine par les tanocytes et son inactivation (U0126 ou LAN) entraîne un blocage du transport de la leptine, qui est ensuite restauré en présence d'EGF (figure 30). A l'instar de la leptine, l'utilisation de l'EGF dans les tanocytes active également la voie ERK. Ceci corrèle avec les données publiées par Balland et collaborateurs *in vivo* montrant qu'un traitement à l'EGF permet de restaurer la sensibilité des souris DIO à la leptine périphérique, et d'inverser l'état de résistance centrale à la leptine chez ces animaux⁷².

Notre étude permet aujourd'hui d'aller plus loin dans la compréhension du lien qui existe entre la voie de Ob-R induite par la leptine et la voie de l'EGFR. L'activation de Ob-R dépendante de la leptine entraîne une activation précoce de l'EGFR dans les tanocytes, suggérant une connexion entre ces deux voies de signalisation (figure 2 de l'article). De plus, les données obtenues par Julie Dam sur les cellules HEK293 co-transfectées, indiquent une interaction physique directe entre l'EGFR et l'Ob-R suggérant une possible collaboration entre les deux récepteurs impliqués dans l'activation de la voie de signalisation de ERK.

Afin d'observer s'il existe dans les tanocytes *in vitro*, une telle collaboration entre les deux voies Ob-R et EGFR, j'ai réalisé en fin de thèse une expérience préliminaire dans laquelle j'ai co-incubé les tanocytes avec de la leptine fluorescente (2 µg/ml) et de l'EGF TRITC (10 ng/ml) pendant 15 min à 37°C. J'ai pu observer que les tanocytes sont capables d'internaliser la leptine et également l'EGF (figure 39). Néanmoins, il est difficile de déterminer la part de leptine qui colocalise avec l'EGF fluorescente car son niveau de détection est faible et proche du bruit de fond. La concentration utilisée d'EGF-TRITC pourrait être augmentée en prenant en compte le fait que sa voie d'endocytose est dépendante de sa concentration et qu'elle pourrait emprunter une autre voie de transport comme la voie de la dégradation par exemple.

J'ai ensuite tenté de déterminer l'importance de la signalisation de l'EGFR dans le transport de la leptine dans les tanocytes grâce à l'utilisation d'un inhibiteur de la signalisation de l'EGFR. L'utilisation de Erlotinib dans les tanocytes n'a pas conduit à un blocage du transport dans les cellules, mais m'a permis de montrer un ralentissement de la sécrétion de la leptine par les tanocytes *in vitro*. En effet, l'inhibition de EGFR ne semble pas empêcher la leptine de se fixer sur son récepteur Ob-R et d'activer la voie ERK sous-jacente. Ces données suggèrent qu'il existe une interaction entre les voies activées par les deux récepteurs impliqués soulignant l'importance de la signalisation dans le transport de la leptine par les tanocytes. Il reste à déterminer comment l'activation de l'EGFR par l'EGF va moduler l'effet de la leptine sur les voies du récepteur à la leptine Ob-R incluant l'activation de ERK ou le relargage de la leptine.

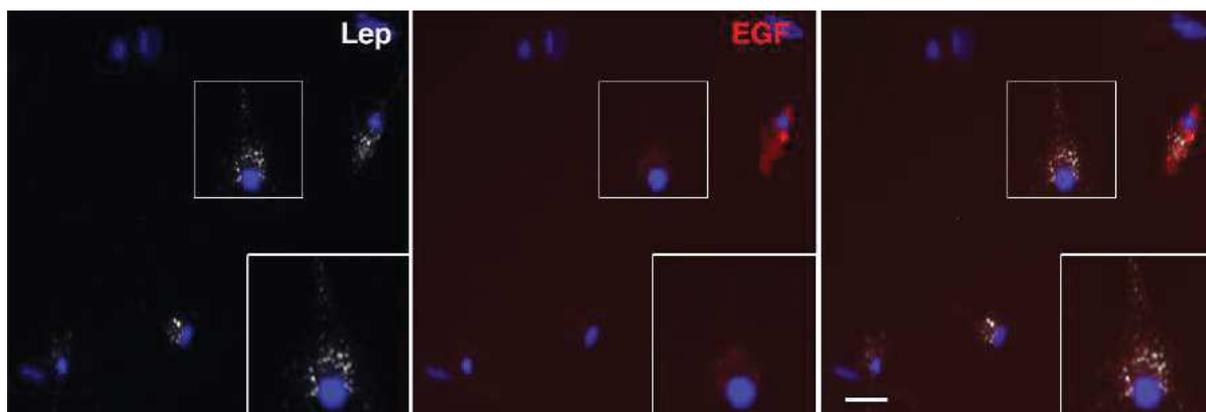


Figure 39 : Internalisation de la leptine et de l'EGF fluorescent par les tanycytes *in vitro*. A) Images de microscopie confocale à grand champs montrant les tanycytes incubées en présence de leptine fluorescente (blanc, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et de l'EGF-TRITC (rouge, 10 ng/ml) pendant 15 min. Les cellules sont fixées au PFA 4% pendant 10 min, lavées puis les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Les carrés blancs représentent des zooms pour des cellules positives à la fois pour la leptine et pour l'EGF. Barre d'échelle 20 μm .

III. LES VOIES DE TRANSPORT INTRACELLULAIRES

III.1- UNE SEULE VOIE POUR LE TRAFIC DE LA LEPTINE ?

Mes travaux ont commencé à défricher les mécanismes qui assurent le transport de leptine dans les tanycytes. J'ai pu ainsi caractériser les compartiments empruntés par la leptine dans les tanycytes après son internalisation. La leptine est d'abord localisée dans les endosomes précoces, premier compartiment que rejoint un ligand et son récepteur dans les différentes voies d'endocytose. Ces résultats sont en accord avec l'étude de l'internalisation de la leptine radio-marquée (125I-leptin) dans des cellules HEK293 surexprimant le récepteur Ob-R qui montre un passage de la leptine par les endosomes précoces, positifs pour Rab5, atteignant un pic après 10 minutes d'internalisation²⁴⁸. J'ai montré également que dans les tanycytes, une partie de la leptine transite dans les endosomes de recyclage positifs pour Rab11 et dans les lysosomes grâce à l'utilisation du LysoTracker. Cependant, il est important de noter que bien que le LysoTracker ait une forte affinité pour les compartiments très acides, ce n'est pas l'outil optimal pour démontrer spécifiquement l'intervention de la voie des lysosomes. La protéine LAMP-1 est communément utilisée comme marqueur des lysosomes²⁸⁸. Lors

d'une expérience préliminaire, j'ai pu observer un marquage punctiforme de LAMP-1 qui colocalise partiellement avec la leptine après 15 minutes d'internalisation dans les tanocytes. Résultat qui est également en accord avec l'étude de Wilcke et Walum ²⁴⁸ montrant que de la 125I leptine colocalise avec les endosomes tardifs et la protéines LAMP-1, compartiments où s'accumule également l'EGF.

Ces données soulèvent de nombreuses questions quant au devenir de la leptine et de son récepteur. En effet, la leptine et son récepteur emprunte-t-ils plusieurs voies d'internalisation ? Le récepteur accompagne-t-il la leptine tout au long de son transport ?

Un complexe ligand/récepteur peut prendre différentes voies au cours de son transport. Dans une cellule polarisée, le complexe peut se dissocier ; le ligand suivre la transcytose, au cours de laquelle il est transporté vers le pôle opposé de la cellule pour être ensuite sécrété et le récepteur peut alors suivre deux voies, la voie de recyclage assurant un retour à la membrane plasmique, ou la voie de dégradation par les lysosomes. Nous pouvons avancer l'hypothèse que le complexe leptine/Ob-R se dissocierait dans les endosomes précoces, donnant lieu au recyclage du récepteur Ob-R à la membrane. En effet, après son internalisation, le complexe leptine/Ob-R entre premièrement dans les endosomes précoces, compartiment dans lequel beaucoup de ligands se dissocient de leurs récepteurs pour être ensuite acheminés vers les endosomes tardifs ou les lysosomes. De plus, il a été montré que le recyclage d'un récepteur directement à la membrane peut se faire directement *via* les endosomes précoces (65%) ou les endosomes de recyclage (35%) ^{197,289}. Cette hypothèse restant à être vérifiée, il serait intéressant de réaliser des co-marquages à la fois du récepteur Ob-R (XPA) à la leptine et des différents compartiments empruntés tel que Rab11, ou LAMP1 à différents temps d'internalisation. Ceci permettrait de mieux comprendre l'évolution de l'interaction entre la leptine et son récepteur au cours du trafic intracellulaire. Il est également important de considérer le manque de polarité cellulaire dans notre culture, nécessaire pour permettre le bon acheminement des molécules comme les récepteurs dans les différents compartiments et éviter un transport hasardeux dans la cellule non organisée. Où et quand pourrait avoir lieu la dissociation du complexe leptine/Ob-R dans les tanocytes reste une question posée.

Mes données obtenues avec le lysotracker et la bafilomycine montrent que la leptine s'accumule dans des compartiments acides tels que les lysosomes. L'altération du transport de la leptine lors du traitement à la bafilomycine pourrait être expliqué par le fait que l'acidification des vésicules et donc le pH régule le trafic intracellulaire. En effet, on peut penser qu'un blocage de l'acidification conduit à l'inhibition de la fusion des endosomes entre eux mais également la fusion à la membrane plasmique, empêchant ainsi le transit de la leptine dans les tanocytes. De façon intéressante, outre leur rôle dans la dégradation, les lysosomes peuvent également jouer le rôle

d'organelles sécrétoires²⁹⁰. Dans le cas de l'étude de la transcytose, la leptine pourrait être transportée dans les différents compartiments puis directement sécrétée au pôle cellulaire opposé par une sécrétion lysosomale, soulevant ainsi la question de sa régulation. Les lysosomes constituent-ils le compartiment réalisant l'exocytose de la leptine dans les tanocytes ?

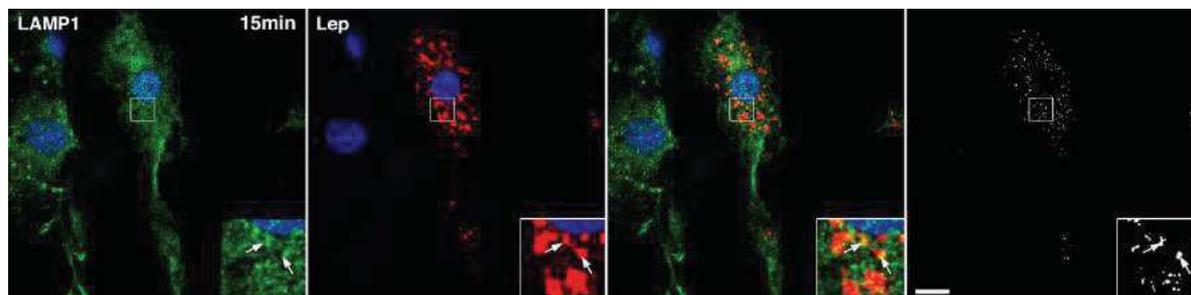


Figure 40 : La leptine colocalise avec LAMP-1. Images de microscopie confocale montrant les tanocytes incubés avec la leptine fluorescente (2 µg/ml, rouge) pendant 15 minutes et marqués avec un anticorps dirigé contre la protéine LAMP-1 (vert). Les cellules sont révélées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 et les noyaux marqués au Hoechst (bleu). En blanc, le masque de colocalisation obtenu avec le logiciel ICY. Les carrés représentent les zooms et les flèches blanches indiquent des exemples de pixels colocalisés. Barre d'échelle 10 µm.

III.2. QUELS COMPARTIMENTS POUR LA SECRETION DE LA LEPTINE ?

Une fois internalisée par les tanocytes, la leptine est transportée dans les différents compartiments qui assurent le transport intracellulaire, puis sécrétée dans le LCR. Le compartiment intracellulaire « final » qui assure la sécrétion de leptine n'a pas été identifié à ce jour. Les différentes étapes du trafic membranaire intracellulaire sont assurées grâce aux processus successifs de fusion entre les membranes des différents compartiments cellulaires. La fusion membranaire est contrôlée par la formation de complexes SNARE qui assurent le rapprochement des membranes à fusionner. Chaque compartiment ne possède pas les mêmes protéines SNAREs et chaque fusion fait intervenir spécifiquement un complexe SNARE donné²⁹¹. Connaître les protéines SNAREs responsables de la sécrétion de leptine m'aiderait donc à identifier le compartiment cellulaire impliqué.

Les données que j'ai obtenues avec la toxine botulique C, qui clive spécifiquement la syntaxine 1A, 2 et 3 et SNAP25 chez le rat, suggèrent une implication d'une de ces protéines dans la sécrétion de la leptine par les tanocytes. De manière intéressante, une étude réalisée par Rexford et collaborateurs en 1999, montre que dans le cerveau de souris *ob/ob* et *db/db* les protéines Syntaxine-1, SNAP-25, et synaptobrevine (VAMP2) sont moins exprimées que chez les contrôles²⁹². Or, un traitement des

animaux avec des injections de leptine permet de normaliser les niveaux de la Syntaxine-1 et de SNAP-25 dans les souris *ob/ob*. De la même façon dans les tanocytes, la syntaxine 1A et SNAP-25 pourraient donc être impliquées dans la sécrétion de la leptine. Mais quand est-il de l'implication des protéines VAMP dans cette sécrétion ?

L'équipe de Vincent Prévot a utilisé un modèle de souris *iBot* (*induced botulin toxin*), pour étudier les effets métaboliques induits par l'expression de la toxine botulique de type B (BoNT/B) dans les tanocytes *in vivo*. Ce modèle de souris transgénique a été créé par l'équipe de Franck Pfrieger²⁵⁰ dans notre institut. Elles expriment de façon inductible (système recombinaise Cre/loxP) la chaîne légère de la BoNT/B qui clive spécifiquement les protéines synaptobrévines VAMP-1, 2 et 3. Pour exprimer spécifiquement la toxine dans les tanocytes, l'injection de la tat-Cre recombinante se fait directement dans le 3^e ventricule. Le suivi des animaux dans les cages métaboliques a permis d'observer une augmentation de la prise alimentaire chez les souris exprimant la BoNT/B, associée à une prise de poids en comparaison aux contrôles. De plus, 12 semaines après l'injection de tat-Cre, les animaux deviennent intolérants au glucose. Ces données sont intéressantes car elles suggèrent le rôle d'au moins, une de ces 3 VAMP, dans la régulation du métabolisme énergétique (M. Duquenne et V. Prévot, résultats non publiés). De plus, des données préliminaires de l'équipe de Vincent Prévot montrent également un enrichissement des protéines VAMP-2 et 3 dans les tanocytes.

C'est dans ce contexte que je me suis intéressée à l'implication des protéines VAMP au cours de la sécrétion de la leptine dans les tanocytes *in vitro*. J'ai tout d'abord vérifié par western blot que les tanocytes de rat en culture primaire exprimaient bien les protéines VAMP1, VAMP2 et VAMP3 (figure 4, A). D'un point de vue fonctionnel, j'ai souhaité me focaliser tout d'abord sur la protéine VAMP2, la plus enrichie dans les tanocytes. En fin de thèse j'ai pu réaliser une expérience de suivi de leptine au cours du temps dans des tanocytes infectés par un lentivirus exprimant un ARN interférent (sh-RNA) dirigé contre -VAMP2. De façon intéressante, la diminution de l'expression de VAMP2 semble inhiber la sécrétion de leptine par les tanocytes (figure 41), suggérant son implication dans le processus d'exocytose de la leptine par les tanocytes *in vitro*. Néanmoins, ce résultat reste à analyser et à confirmer en augmentant le nombre d'expériences.

Les différentes protéines SNARE citées précédemment, soit VAMP1, 2 et 3 ainsi que SNAP25 et la syntaxine 1A, 2 ou 3, pourraient donc jouer un rôle dans la sécrétion de la leptine par les tanocytes. Leur localisation est variable dans les différentes organelles de la cellule. En effet, on peut trouver les protéines VAMP2 et 3 dans les endosomes précoces ou les endosomes de recyclage²⁹³. Le complexe Syntaxine1-SNAP25-VAMP2 est également spécifique des vésicules de sécrétion principalement dans les neurones et les cellules neuroendocrines. Afin de confirmer l'implication des VAMP 1, 2 ou 3, il serait

intéressant de suivre le transport de leptine et de doser la sécrétion de leptine (test Elisa) dans le milieu d'une culture primaire de tanocytes de souris *iBot*, préalablement incubée avec la tat-Cre recombinase. De plus, afin de cibler une seule protéine, il sera nécessaire d'étendre l'utilisation des shRNA aux autres protéines VAMP, soit VAMP1 et VAMP3 dans la culture primaire de tanocytes de rat.

Bien que je n'en observe pas dans ma culture primaire, la présence de granules de sécrétion et d'exosomes a été récemment observée dans les tanocytes⁶⁶. L'observation d'exosomes avait été également faite par Horiguchi et collaborateurs²⁹⁴ dans les pieds tanocytaires marqué pour CD9. Ces compartiments intermédiaires situés entre les endosomes de tri et les endosomes de dégradation pourraient être impliqués dans le relargage de la leptine. Par l'utilisation des différentes neurotoxines dans notre étude, nous n'avons pas ciblé la protéine SNARE VAMP7. En effet, cette protéine Ti-VAMP (toxin insensitive – VAMP) est résistante aux différentes neurotoxine tétanique et botulique et n'est donc pas clivée²⁹⁵. Or, elle fait également partie des protéines SNARE enrichie dans les tanocytes (données de Vincent Prévot) et intervient dans la fusion des exosomes avec les lysosomes²⁹⁶, ainsi qu'avec la membrane plasmique²⁴⁰. Verderio et collaborateurs ont montré, que Ti-vamp est exprimée dans les astrocytes dans lesquelles elle régule la sécrétion lysosomale.

Il serait donc intéressant de tester l'implication éventuelle de cette protéine dans le mécanisme de fusion entre les MVB ou les lysosomes et la membrane plasmique. Ce processus étant régulé par le Ca²⁺ intracellulaire qui entraîne la sécrétion des exosomes, la proposition d'utilisation un chélateur de Ca²⁺ intracellulaire comme le BAPTA-AM est séduisante. Il permettrait d'observer son rôle dans la régulation de la sécrétion de la leptine par les tanocytes.

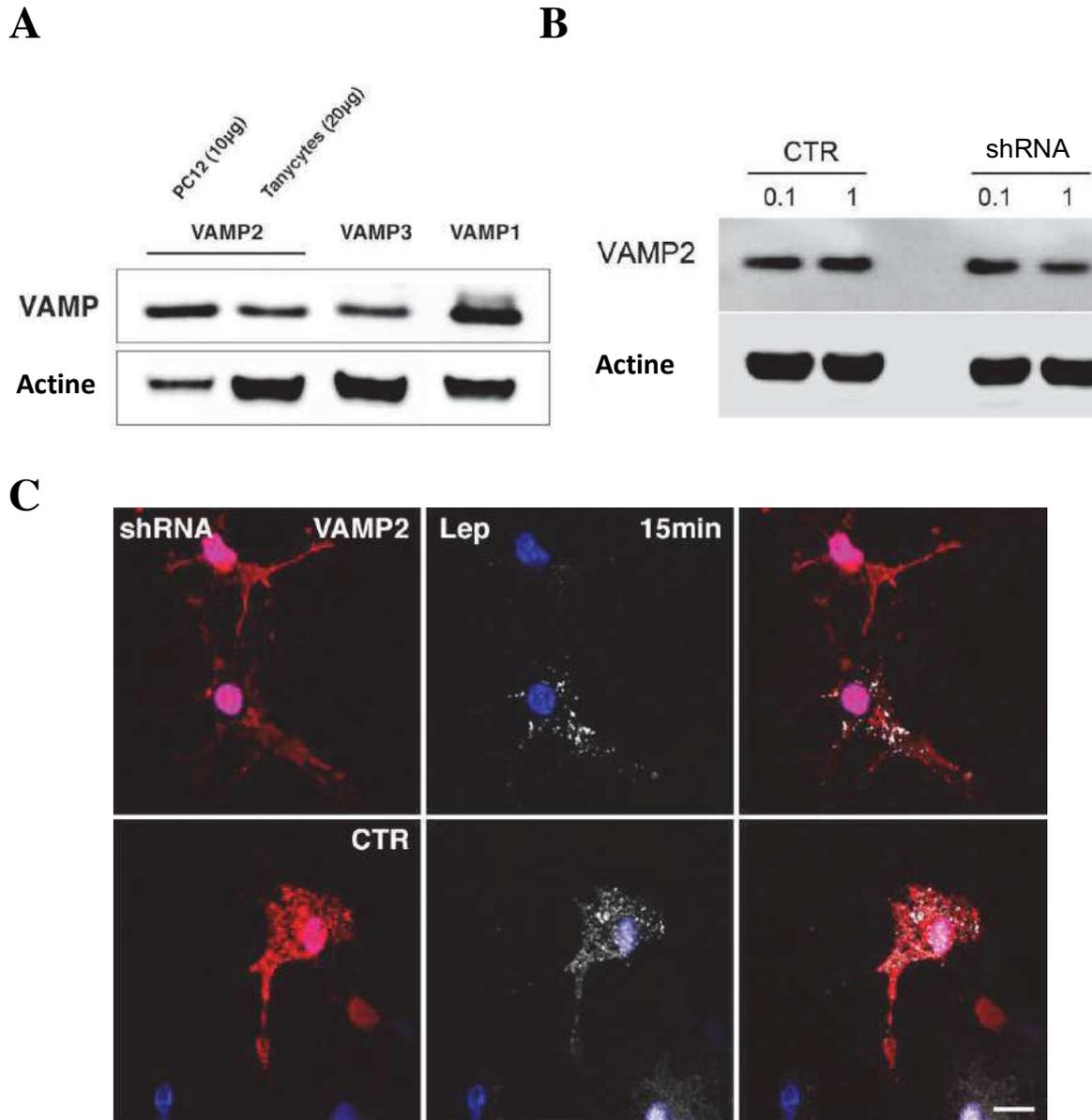


Figure 41 : Expression des protéines VAMP et inhibition de la protéine VAMP-2 dans les tanocytes *in vitro*. **A)** Détection des protéines VAMP 1, 2 et 3 dans les tanocytes *in vitro* par technique de Western blot. Les cellules PC12 sont utilisées comme contrôle positif de VAMP2 et l'actine est utilisée comme contrôle de charge. **B)** Détection de la protéine VAMP 2 dans les tanocytes après infection par des lentivirus shRNA-VAMP2 (95) ou shRNA-CTR. Les tanocytes sont infectés pendant 72h avec le ShRNA-VAMP2 ou CTR avec des concentrations de 0,1 ou 1 µl de virus par boîte. **C)** Images de microscopie confocale montrant des tanocytes infectés par le shRNA-VAMP2 ou shRNA-CTR et incubés avec la leptine fluorescente (2 µg/ml) pendant 15min, lavés puis incubés avec du milieu frais pendant 15min pour observer sa sécrétion. Échelle 10 µm.

II.3 – NECESSITE D'UN SYSTEME CELLULAIRE POLARISE ?

J'ai pu montrer au cours de ma thèse que le modèle de culture primaire de tanocytes de rats permettait de suivre l'internalisation et la sécrétion de la leptine par les cellules. Néanmoins, l'organisation des cellules en culture est différente de leur organisation au sein de l'éminence médiane. En effet, les tanocytes sont localisés autour du 3^e ventricule et forment une barrière protégeant l'hypothalamus. Leur corps cellulaire contacte le LCR et leur prolongement est au contact de vaisseaux fenêtrés dans l'EM. La présence de jonctions serrées autour de leurs corps cellulaires assure l'étanchéité entre la circulation sanguine et le LCR et leur permet de contrôler les molécules transportées de la périphérie vers le système central^{49,51}. Cette polarité caractéristique des tanocytes est associée à leur capacité de transport et la reproduire *in vitro* constituerait un modèle de choix pour étudier les mécanismes moléculaires de la transcytose de la leptine par les tanocytes. C'est pourquoi, j'ai tenté de développer un système de culture simplifié basé sur l'organisation cellulaire tridimensionnelle des tanocytes de l'EM (système de culture 3D).

La barrière hémato-encéphalique s'entoure d'une lame basale continue qui est riche en protéines telles que la laminine, la fibronectine, l'élastine ou le collagène de type IV²¹⁹. Les composants de cette matrice construite par les cellules endothéliales notamment, permettent aux cellules de maintenir les propriétés physiques nécessaires au rôle de barrière qu'elle doit jouer en permettant aux cellules de former des jonctions cellulaires. En effet, des travaux ont montré que le collagène de type IV, et la laminine guideraient la différenciation des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique et la formation des jonctions serrées caractéristiques à celle-ci⁴⁸. C'est pourquoi, j'ai choisi le gel d'extrait de membrane basale (MB) riche en collagène IV et en laminine pour mimer l'environnement *in vivo*. Sur cette matrice, les tanocytes forment de longs prolongements qui se projettent dans une seule direction suggérant que la MB contient un facteur déterminant pour leur polarité. La formation des jonctions serrées observées entre les corps cellulaires des tanocytes soulève l'hypothèse que les tanocytes s'organisent et miment la barrière qu'ils forment *in vivo*. Néanmoins, la question de l'étanchéité du système et de la « barrière » se pose. Des tests permettant de déterminer la diffusion des molécules entre le compartiment inférieur et supérieur sont nécessaires. Il serait notamment intéressant d'utiliser une molécule fluorescente telle que le bleu Evans, pour voir si la « barrière » tanocytaire est étanche sur la membrane.

De plus, la mise en place de jonctions serrées au niveau des prolongements tanycytaires insérés dans l'extrait de MB soutient également l'hypothèse d'une organisation des tanycytes entre eux. En effet, cette observation a été faite *in vivo* par Rodriguez et collaborateurs démontrant que les prolongements des tanycytes isolent le NA de l'EM via la formation de jonctions serrées à ce niveau⁶³. On peut également penser que d'autres types de jonctions telles que les jonctions gap peuvent être présentes au niveau des prolongements des tanycytes qui s'organisent en réseau dans le gel de MB. Ces jonctions, *in vivo*, sont marquées par la connexine-43²⁹⁷ et permettent la communication et la synchronisation de tout le réseau de tanycytes en réponse aux variations environnantes. L'idée de vérifier l'expression de ces jonctions dans notre système est séduisante et pourrait nous donner une information sur la communication des tanycytes cultivés dans la MB.

L'optimisation de notre système est nécessaire et pour influencer favorablement la mise en place de ces jonctions, il est possible de moduler différents paramètres, dont notamment la densité cellulaire. En effet, plusieurs couches se forment sur la membrane de l'insert, or *in vivo*, les corps cellulaires des tanycytes forment une monocouche de cellules tout autour du 3e ventricule. Diminuer le nombre de cellules pourrait permettre une meilleure organisation des corps cellulaires. Cependant, il faudra également vérifier à maintenir un nombre suffisant de prolongements formés à travers la membrane. Pour cela, différents facteurs de croissance peuvent être utilisés comme le VEGF, la Sema7A tous deux connus pour influencer l'organisation des tanycytes *in vivo*^{70,271}. D'autres paramètres peuvent être testés pour déterminer la polarité cellulaire, comme l'organisation des compartiments intracellulaires au niveau des deux pôles des tanycytes. En effet, l'expression des protéines des jonctions serrées par les tanycytes n'empêche pas seulement la diffusion des molécules de l'EM vers le LCR⁵¹ mais régule également la polarité cellulaire et le trafic intracellulaire²²⁵. En effet, on peut imaginer que les endomes soit peu nombreux dans les prolongements cellulaires par rapport à la zone périnucléaire. Il serait donc intéressant de caractériser plus précisément dans ce système l'organisation des différents compartiments tels que les endosomes précoces marqués par EEA1, les endosomes de recyclage (Rab11) ou encore les lysosomes (LAMP1) tout au long de la cellule polarisée et de suivre le transit de la leptine fluorescente dans chacun de ces compartiments.

Le second modèle que nous avons choisi permet de nous affranchir de la difficulté à imager les cellules cultivées sur la membrane et dans le gel et permet le contrôle des fluides dans la puce d'un compartiment à un autre. L'utilisation de la puce microfluidique permet de séparer physiquement les corps cellulaires des prolongements tanycytaires traversant les pores pour aller au contact du compartiment opposé. Ce système est très utile pour suivre l'internalisation de la leptine qui est rapidement captée par les prolongements des tanycytes puis transportée vers les corps cellulaires via

un transit par les endosomes précoces. Il serait intéressant de poursuivre les identifications des compartiments intracellulaires empruntés par la leptine grâce à des immunomarquages sur cellules fixées ou en temps réel et de favoriser la formation des prolongements des tanocytes à travers les canaux en utilisant des facteurs de croissance tel que le VEGF sécrété par les tanocytes⁷⁰. De plus, le but étant d'étudier le transport de la leptine, l'utilisation dans ce système de nos outils, tel que le LAN ou l'inhibiteur de la voie ERK (U0126), permettrait d'altérer la transcytose de la leptine et de voir où elle se situe au sein de la cellule, au niveau des corps cellulaires ? dans les pieds tanocytaires ?

L'utilisation de ce type de modèle en culture 3D *in vitro* pour les tanocytes est à ma connaissance le premier développé. Néanmoins, les résultats obtenus sur ces deux systèmes sont pour le moment préliminaires et nécessitent d'être poursuivis. Les possibilités d'utilisation sont multiples, sur cellules vivantes ou fixées et au-delà de la caractérisation intracellulaire, l'étude des interactions des tanocytes avec les cellules endothéliales constitue une idée intéressante. L'expression des gènes et la sécrétion de facteurs de régulation divers par des tanocytes peut varier au contact des cellules environnantes^{62,64} et il serait intéressant de réaliser une co-culture de tanocytes avec des cellules endothéliales ou neuronales.

CONCLUSION GENERALE

L'obésité et ses conséquences métaboliques constituent aujourd'hui l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans les pays développés. Il est clairement admis aujourd'hui que l'un des mécanismes impliqués dans la régulation centrale de la prise alimentaire est le transport des signaux d'adiposité telle que la leptine de la périphérie jusqu'au cerveau. Cette hormone anorexigène, sécrétée par le tissu adipeux, circule en quantité proportionnelle à la masse grasse corporelle, et agit via son récepteur présent sur les neurones sensoriels du noyau arqué de l'hypothalamus afin d'induire la satiété. Il a été démontré que les tanocytes, au contact des vaisseaux fenêtrés de l'éminence médiane, agissent comme "porte d'entrée" pour les molécules circulantes jusqu'à l'hypothalamus. En effet, la leptine est transportée par les tanocytes des pieds vers le corps cellulaire apical où elle est sécrétée vers le liquide céphalo-rachidien afin d'atteindre ces cibles neuronales⁷². Cependant, à ce jour les mécanismes de transport de la leptine dans les tanocytes restent inexplorés. Or, une meilleure compréhension de ces mécanismes est cruciale puisqu'il a été montré que le phénomène de résistance à l'action de la leptine, observé chez des animaux rendus obèses, pourrait être la conséquence d'un transport défectueux de la leptine dans le cerveau²⁹⁸.

Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence les mécanismes par lesquels la leptine est transportée par les tanocytes *in vitro*. En effet, nos données ont montré que la leptine est internalisée avec son récepteur Ob-R par la voie d'endocytose dépendante la clathrine. Cette voie d'endocytose fait intervenir d'autres acteurs importants tels que la dynamine et l'epsine 15 dans la régulation du processus d'internalisation de ce complexe leptine/Ob-R. Après l'entrée dans la cellule, la leptine va rejoindre différents compartiments dont les endosomes précoces, les endosomes de recyclage et les lysosomes. J'ai pu montrer que ce trafic intracellulaire est dépendant de l'activation des voies de signalisation sous-jacentes à l'activité du récepteur Ob-R dont les multiples acteurs sont recrutés dans les différentes étapes. Enfin, j'ai également montré que la sécrétion de la leptine est régulée par les protéines SNAREs. Les perspectives sont nombreuses. En effet, il serait judicieux d'aller plus loin et de caractériser le compartiment de sécrétion de la leptine en utilisant par exemple le modèle de souris iBot. A plus long terme, il serait intéressant de réaliser les expériences fonctionnelles de cette étude en utilisant une autre hormone métabolique, la ghréline, également transportée par les tanocytes afin de découvrir les mécanismes impliqués dans son transport jusqu'à l'hypothalamus.

Notre second objectif nous a conduit à l'utilisation de systèmes *in vitro* innovants comme les puces microfluidiques et les cultures sur extraits de membrane extracellulaire qui ont permis d'observer un transport de la leptine par les pieds tanycytaires isolés vers les corps cellulaires et donc de reproduire artificiellement l'organisation de l'éminence médiane. Pour la première fois, il est possible d'utiliser des tanocytes polarisés en culture adoptant une organisation de barrière grâce à la formation de jonctions serrées. De nombreuses mises au point sont encore nécessaires pour améliorer notre modèle comme l'augmentation du nombre de prolongements tanycytaires par utilisation de facteurs de croissance ou la réalisation de co-cultures avec des cellules endothéliales ou encore neuronales.

En termes de perspectives, il serait judicieux dans cette partie du projet de vérifier l'ensemble des résultats fonctionnels obtenus sur le transport de la leptine dans ce système, sur des tanocytes polarisés, et dont l'organisation se rapproche un peu plus de l'environnement trouvé chez l'animal. En plus des connaissances fondamentales nouvelles, la compréhension des mécanismes qui régulent le mode de transport de la leptine de la périphérie vers le système nerveux central par les tanocytes est extrêmement importante afin d'ouvrir à terme de nouvelles perspectives de recherche pharmaceutiques et clinique pour améliorer la condition de vie des personnes touchées par l'obésité. L'étude du transport de la leptine dans son ensemble est essentielle pour permettre de restaurer une sensibilité à la leptine chez les personnes obèses. Une évaluation clinique menée à Lille et démarrée en 2019 tente d'améliorer la condition de résistance à la leptine chez des sujets obèses. Pour cela, ils sont traités avec de la Metformine, une drogue déjà utilisée pour traiter les patients atteints de diabète et qui permet d'améliorer le transport de la leptine vers le LCR. Cette étude tente d'évaluer son impact sur le transport de la leptine dans le LCR, et l'amélioration de la sensibilité à la leptine dans le cerveau. Cet essai clinique met en avant la nécessité de comprendre la mise en place de la résistance à la leptine qui constitue actuellement un enjeu majeur de la recherche sur l'obésité et plus globalement de santé publique.

MATERIELS ET METHODES

I. CULTURE CELLULAIRE

I.1. PROTOCOLE DE CULTURE PRIMAIRE DE TANYCYTES DE RAT

La culture de tanycytes se prépare à partir de rats au 10^{ème} jour de vie post-natale. Pour obtenir une culture confluente dans une flasque T75 en approximativement 10 jours, il faut 12 animaux (1 portée). Les tanycytes sont mis en culture conformément au protocole de Prévot et al., 2003.

Immédiatement après le sacrifice de l'animal, le cerveau est délicatement délogé de la boîte crânienne et les deux nerfs optiques sectionnés afin de préserver l'hypothalamus. On effectue ensuite des lavages dans 3 bains successifs de HBSS posés sur la glace. La microdissection de l'éminence médiane est réalisée sous la loupe binoculaire, et le cerveau est maintenu humide. Premièrement, deux incisions parallèles au 3^e ventricule sont effectuées puis une troisième incision perpendiculaire au 3^e ventricule est réalisée devant le chiasma optique. On dégage ensuite l'éminence médiane avec la pince courbe qu'on dépose dans du HBSS maintenu à 4°C sur la glace. Après récupération des éminences médianes à l'aide d'une pipette 1000, elles sont dissociées par filtration sur un tamis de 45 µm. Après 10 min de centrifugation à 800 rpm à température ambiante, le culot est resuspendu dans le milieu de culture DMEM high glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco #41965) complété avec 10% de sérum de bovin (DBS, Invitrogen #16030), 2% pénicilline-streptomycine (Gibco #15140) et 1% de L-glutamine (200 mM, ThermoFisher #25030). Les cellules sont ensuiteensemencées dans une flasque T75 ou dans des boîtes de pétri de 10 cm et placées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂ et saturé en vapeur d'eau. Les cellules sont utilisées après 10 jours de culture. Pour le suivi de la leptine, les cellules sont placées en milieu de restriction (DMEM-F12 (#11039, ThermoFisher) sans rouge de phénol, 1% de pénicilline-streptomycine (#15140, ThermoFisher), 1% de L-glutamine (200 mM, ThermoFisher #25030), insuline (5 µg/ml, #15500, Sigma), putrescine (100 µM, #P5780, Sigma) pendant 24 à 48h. Pour les expériences suivies d'une immunofluorescence, les cellules sontensemencées sur les lamelles de verre préalablement recouvertes de poly-L-lysine (10 µg/ml) pendant 10 minutes à 37°C.

I.2. CINÉTIQUE D'INTERNALISATION DE LA LEPTINE FLUORESCENTE

Pour la cinétique d'internalisation de la leptine les tanycytes sont incubées dans du milieu de restriction (DMEM/F-12 ; #11039, ThermoFisher). Après 24h, les cellules sont incubées avec la leptine fluorescente (couplée au fluorophore D2) ou une leptine mutée LAN fluorescente (2 µg/ml, Cisbio

Bioassays, mutations (L39A D40A F41A) ou l'anticorps XPA 80.037 dirigé contre le récepteur Ob-R, et agoniste de la leptine sur la voie de signalisation Ob-R (5 mg/ml, Xoma Laboratories) et/ou l'EGF-TRITC (10 ng/ml, Molecular probes) dilués dans le milieu de restriction pendant 5-10-15 et 30 minutes. L'analyse de la fluorescence de la leptine a été réalisée après la fixation des cellules avec une solution de paraformaldéhyde 4%, pendant 10 min. Le XPA n'étant pas fluorescent, il est révélé par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à un fluorophore lors de l'immunofluorescence.

Différents pré-traitements ont été réalisés sur les tanocytes avant l'incubation avec la leptine fluorescente afin de comprendre le rôle de certaines protéines ou voies de signalisation dans le transport de la leptine (Tableau 2).

Liste des molécules fluorescentes utilisées :

Nom	Émission (nm)	Concentration	Fournisseur	Référence
Leptine-D2	647	2 µg/ml	Cisbio Bioassays	#3238
LAN-D2	647	2 µg/ml	Cisbio Bioassays	#ab21679
EGF-TRITC	580	10 ng/ml	Molecular probes	#3481
LysoTracker	590	100 nM	ThermoFisher	#L7528

Tableau 1 : Liste des molécules fluorescentes utilisées sur les tanocytes en culture.

La liste des inhibiteurs chimiques utilisés est détaillée dans le tableau ci-dessous :

Nom	Cible	Concentration	Temps	Fournisseur	Référence
UO126	MAPK (MEKK1/2)	10 mM	30 min	Cell signaling	#9903
Bafilomycine A1	Pompes V-ATPase	1 µM	30 min	Sigma	#B1793
Erlotinib	Signalisation EGFR	200 nM	30 min	Selleckchem	#S7786
Dynasore	Dynamine 1/2	50 µM	30 min	Sigma	#D7693

Tableau 2 : Inhibiteurs chimiques utilisés sur les tanocytes *in vitro*.

1.3. CINÉTIQUE DE SÉCRETION DE LA LEPTINE

Pour la cinétique de relargage de la leptine les tancytes sont cultivés sur des lamelles de verre 12 mm recouvertes au préalable de poly-L-lysine (10 µg/ml) dans du milieu de restriction (DMEM/F-12 (#11039, ThermoFisher) pendant 24h. Pour comprendre le rôle de la voie de signalisation MAPK, les tancytes sont pré-traités ou non (DMSO) avec l'inhibiteur de MAPK, UO126 (10 µM, #9903, Cell signaling) pendant 30 minutes puis incubés avec la leptine fluorescente (2 µg/ml, Cisbio Bioassays) pendant 15 minutes. Les cellules sont ensuite incubées pendant différents temps (5-15-30-60 min) dans du milieu frais toujours en présence de l'inhibiteur pour suivre la sécrétion de la leptine.

1.4. TECHNIQUES DE TRANSFECTION ET D'INFECTION VIRALE

La transfection des cellules est effectuée le jour du passage des cellules (après 10 jours de culture) par l'utilisation de deux techniques différentes : le système d'électroporation Neon® (Transfection System, Life technologies) et la lipofectamine 3000 (Invitrogen).

1.4. A- Méthode d'électroporation Neon®

Pour la technique d'électroporation, des culots de $2 \cdot 10^6$ cellules sont repris dans 200 µl (1.106 cellules/ml dans 100 µl) de solution R auxquels sont ajoutés 2 µg du plasmide d'intérêt (mutant dominant négatif de l'Epsine 15 ; Eps15 DIII). Les cellules sont électroporées à l'aide du protocole MCC (30 min, 1400V) du système Neon® (ThermoFischer). 500 µl de milieu DMEM sont ajoutés aux cellules, et les cellules transfectées sont déposées sur des lamelles de verre traitées préalablement à la poly-lysine (10 µg/ml). Après 4 à 5 heures d'incubation à 37°C, le milieu est remplacé par du milieu DMEM high glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ThermoFisher, #41965) complémenté avec 10% de sérum de bovin (DBS, Invitrogen, #16030), 1% de L-glutamine (200 mM, ThermoFisher, #25030) et sans antibiotiques. Les cellules sont maintenues pendant 48 heures dans l'étuve à 37°C avant leur utilisation.

I.4. B- Méthode de transfection par Lipofectamine 3000

Les tancytes sont ensemencés le jour précédent la transfection dans du milieu DMEM high glucose (Dulbecco's Modified Eagle Medium, ThermoFisher #41965) complémenté avec 10% de sérum de bovin (DBS, Invitrogen #16030), 1% de L-glutamine (200 mM, ThermoFisher, #25030) mais sans la présence d'antibiotiques sur des lamelles de verre dans des boîtes 4 puits. Le plasmide est transfecté dans les tancytes en le complexant à la lipofectamine 3000 (Invitrogen). Pour un puit, le plasmide (1 µg/puit) est dilué dans 50 µl d'Opti-MEM. En parallèle, 1 µl de Lipofectamine 3000 sont dilués dans 50 µl d'Opti-MEM. Les deux solutions sont mélangées pendant 5 minutes à température ambiante avant de déposer les 100 µl de mélange sur les cellules et par puit pendant 4 à 5 heures à 37°C. Le milieu de culture est ensuite remplacé et les cellules incubées dans du milieu de restriction DMEM-F12 pendant 24h.

Les plasmides utilisés sont :

- Expression du dominant négatif de l'epsine-15 (Eps15 DIII) ²⁴⁶
- Expression de la chaîne légère de la toxine Botulique BoNT (Botulinum neurotoxin)

I.4. C- Méthode d'infection par Lentivirus

Une fois à confluence, les tancytes sont ensemencés sur des lamelles de verre placées dans des boîtes de 35 mm pendant 24h à 48h avant l'infection avec les virus. Les tancytes sont ensuite incubés en présence de 0,1 µl et 1 µl de virus ($3,5 \cdot 10^7$ U/ml) dilués dans du milieu de culture sans antibiotiques et en présence de polybrène 1 µg/ml à 37°C. Après 5 à 6 heures d'incubation, le milieu de culture est remplacé par du milieu frais sans antibiotiques pendant 24h. Le lendemain, les cellules sont placées soit, dans du milieu frais pour 48h d'incubation avant d'être lysées, soit préparées pour une cinétique d'endocytose avec la leptine fluorescente.

Séquences des shRNA lentivirus utilisés :

- Lentivirus shRNA contrôle (turbo-RFP ; Dharmacon-cloneID : VSC11714) - Pas de cible
- Lentivirus shRNA dirigé contre la protéine VAMP-2

Rn VAMP2 ShRNA 1C-02 (turbo-RFP ; Dharmacon-cloneID : V3SVRN07_21411635)

Séquence : CTTGGGAGTGATTTGCGCC

- Lentivirus shRNA dirigé contre la chaîne lourde de la clathrine

Rn sh Clathrin heavy chain (G-10) (V3SVRN07_19978115) - Séquence : CGCGATTGCTTGAGATGAA

Rn sh Clathrin heavy chain (H-01) (V3SVRN07_20344745) - Séquence : CCAGATCATCAATTACCGT

II. TECHNIQUES BIOCHIMIQUES

II.1. TEST ELISA

Pour quantifier le relargage de la leptine, les tanocytes cultivés sur des boîtes de 10 cm sont placés en milieu restriction DMEM-F12. Après 24h, les cellules sont pré-traitées avec l'inhibiteur de MAPK, UO126 (10 µM, #9903, Cell signaling) ou le DMSO pendant 30 min puis incubées avec la leptine recombinante (1 µg/ml, Protein Rehovot Laboratory) diluée dans le milieu de restriction pendant 15 minutes à 37°C. Après un rapide lavage, les cellules sont placées dans du milieu de restriction DMEM-F12 frais et le surnageant est récupéré à 15, 30 et 45 min. La sécrétion de la leptine est quantifiée grâce à un test Elisa (#MOB00 ; R&D systems). Dans une plaque 96 puits, 50 µl d'échantillons (standard du kit, contrôles ou des échantillons traités au UO126) sont ajoutés à 50 µl de diluant pendant 2h à température ambiante. Après 5 lavages, 100 µl de conjugué sont ajoutés pendant 2h à température ambiante. La révélation s'effectue après 5 lavages en ajoutant 100 µl de solution de substrat pendant 30 min à température ambiante en la protégeant de la lumière. La réaction est arrêtée avec 100 µl de solution Stop. L'absorbance est lue à 450 nm à l'aide du fluorimètre (Mithras, Berthold).

II.2. WESTERN BLOT

II.2. A- Extraction protéique

Les tanocytes sont lavés 2 fois au HBSS, puis lysés dans 120 µl de tampon (Cell extraction buffer, #FNN0011, Invitrogen) supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Protease Inhibitor Cocktail - P8340, 1/500, Sigma). Les cellules sont grattées, récupérées et lysées pendant 15 minutes sur la glace (vortexées à plusieurs reprises). Ces extraits sont ensuite centrifugés à 20000 g pendant 10 min à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. La quantité de protéine est dosée par la technique de Bradford (Réactif Bio-rad protein assay).

II.2. B- Électrophorèse et électrotransfert (Western blot)

Pour les expériences de Western blot, les anticorps primaires utilisés sont recensés dans ce tableau :

Antigène	Espèce	Type	Dilution	Fournisseur	Référence
Actine	Souris	monoclonal	1/1000	Sigma	#A5441
Clathrine	Lapin	polyclonal	1/1000	Abcam	#ab21679
ERK 1/2	Lapin	polyclonal	1/1000	Santa Cruz	#sc-16982
p-ERK	Lapin	polyclonal	1/1000	Cell signaling	#9101
Ob-R	Humain	monoclonal	1/1000	Xoma Lab	XPA 80.037
VAMP 2	Souris	monoclonal	1/1000	Synaptic system	#104211
VAMP 1	Lapin	polyclonal	1/1000	Synaptic system	#104002
VAMP 3	Lapin	polyclonal	1/1000	Synaptic system	#104003

Tableau 3 : Anticorps primaires utilisées pour la technique de Western-blot.

Les anticorps secondaires HRP utilisés sont dirigés contre la souris, le lapin et l'humain (1/50 000, ThermoFisher). Les échantillons sont préparés en ajoutant du tampon Laemmli (Tris HCl 10 mM pH 7.0, EDTA 1mM, DTT 20 mM, SDS 3% (m/v), glycérol 10% (v/v), bromophénol 0,01% (m/v)), puis dénaturés à 98°C pendant 5 min, séparés sur gel de gradient continu de 4-12% Bis-Tris par le système XCell Surelock Mini-Cell (Invitrogen). La migration se fait à 180 V pendant 45 min dans le tampon de migration (MES SDS Running Buffer, Invitrogen®). Le transfert semi-sec des protéines sur membrane de nitrocellulose est réalisé en utilisant le système TransBlot Turbo Bio-rad (7 min à 25 V). L'efficacité du transfert est vérifiée en colorant la membrane dans une solution de rouge ponceau. La membrane est ensuite lavée dans du TBS-T (TBS ,0,1% Tween-20) puis incubée pendant 1 heure à température ambiante, sous agitation dans une solution de blocage (TBS, 0,1% de Tween-20, 3% de sérum bovin (BSA)). L'anticorps primaire est dilué dans la solution de blocage et incubé pendant la nuit à 4°C, sous agitation. Après 5 lavages de 5 min dans le TBS-T, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase diluée dans la solution de blocage pendant une heure sous agitation et à température ambiante. Après 5 lavages de 5 min, l'activité de la peroxydase est révélée par chimiluminescence (ECL™ Prime Western Blotting System) et le signal acquis grâce à la caméra Amersham Imager 680 (GE healthcare Life Sciences).

III. TECHNIQUES D'IMMUNOFLUORESCENCE

PROTOCOLE D'IMMUNOCYTOCHIMIE

Après une incubation des cellules avec la leptine fluorescente à 37°C suivant différentes cinétiques d'internalisation, un lavage rapide est effectué avant de fixer les cellules avec une solution de paraformaldéhyde (Sigma, #1.00496) à 4% pendant 10 min à température ambiante. Après 3 lavages au PBS 1X, les cellules sont perméabilisées 5 min à température ambiante (PBS contenant 0,1% de TritonX-100). Les cellules sont ensuite incubées pendant 2 heures à température ambiante en présence des anticorps primaires dilués dans une solution de saturation (PBS 1X, 3% de BSA). Après 3 lavages au PBS, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'Alexa pendant 45 min et les noyaux marqués avec une solution de Hoechst (1/1000) pendant 30 min.

Anticorps primaires et secondaires utilisés sont listés dans les tableaux ci-dessous :

Antigène	Espèce	Type	Dilution	Fournisseur	Référence
Cavéoline 1	Lapin	polyclonal	1/400	Cell signaling	#3238
Clathrine HC	Lapin	polyclonal	1/500	Abcam	#ab21679
EEA1	Chèvre	polyclonal	1/200	Santa Cruz	#I1212
GFAP	Souris	monoclonal	1/500	Millipore	#MAB360
Ob-R XPA	Humain	monoclonal	1/1000	Xoma Lab	XPA 80.037
VAMP 2	Souris	monoclonal	1/500	Synaptic system	#104211
Vimentine	Poulet	polyclonal	1/1000	Millipore	#ab5733
ZO-1	Lapin	polyclonal	1/1000	ThermoFisher	#61-7300
FGF-10	Lapin	polyclonal	1/200	Millipore	#abn44
DARPP-32	Lapin	monoclonal	1/100	Abcam	#ab40801
Rab11	Lapin	polyclonal	1/500	Abcam	# ab3612
LAMP-1	Souris	monoclonal	1/50	Abcam	# ab24170
GFP	Souris	monoclonal	1/100	Invitrogen	# MA5-15256

Tableau 4 : Anticorps primaires utilisés lors de l'immunofluorescence sur les tanocytes.

Espèce	Cible	Couplage	Dilution	Fournisseur	Référence
Chèvre	Souris	Alexa-488	1/1000	Invitrogen	#A11001
Chèvre	Lapin	Alexa-488	1/1000	Invitrogen	# A11008
Chèvre	Lapin	Alexa-555	1/1000	Invitrogen	#A21428
Âne	Chèvre	Alexa-488	1/1000	Invitrogen	#11055
Âne	Chèvre	Alexa-555	1/1000	Invitrogen	#A21432
Chèvre	Poulet	Alexa-555	1/1000	Invitrogen	#A32932
Âne	Humain	Alexa-488	1/1000	Invitrogen	#A11013

Tableau 5 : Anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence.

IV. CULTURE CELLULAIRE SUR INSERT ET PUCE MICROFLUIDIQUE

IV.1. PUCE MICROFLUIDIQUE

La puce microfluidique (#XC150, Xona) est divisée en 2 compartiments communicants par des micro-canaux d'une longueur de 150 μm (hauteur 5 μm ; largeur 10 μm). Après un prétraitement avec une solution de pré-coating (kit), de la Poly-D-lysine (0,5 mg/ml) est déposée dans le puit en haut à droite (figure 42). Après 5 min (le temps de la diffusion vers le puit inférieur), 150 μl sont déposés dans le puit inférieur droit. Après 1 minute d'incubation, la même procédure est appliquée pour les puits du côté gauche. La puce est ensuite placée dans l'incubateur à 37°C sur la nuit. Deux lavages sont ensuite effectués avec de l'HBSS stérile, selon les mêmes précautions (haut gauche – bas gauche / haut droit – bas droit). Le milieu de culture DMEM est ensuite déposé dans la puce.

En absence de bulles, 100 μl du milieu de culture des puits supérieur et inférieur gauche sont retirés pour ensemercer 20 μl de tanocytes (issus d'une boîte de 10cm à confluence) et permettre la diffusion des cellules dans le canal principal vers les canaux). L'homogénéité de l'ensemencement est assurée par le dépôt de 20 μl de tanocytes dans le puits gauche inférieur, 5 minutes après le dépôt dans le puits supérieur gauche. Après quelques minutes les deux puits sont complétés avec 100 μl de milieu de culture. La distribution des cellules et l'absence de bulle d'air sont vérifiées sous microscope. Les cellules sont placées dans l'incubateur à 37°C pendant 24 heures avant de changer le milieu de culture et un jour sur deux du milieu de culture frais est placé dans les puits de gauche. Après 6 jours en culture, les cellules sont fixées avec une solution de PFA à 4% pendant 30 minutes à température ambiante puis lavées avec du PBS avant de réaliser une immunofluorescence.

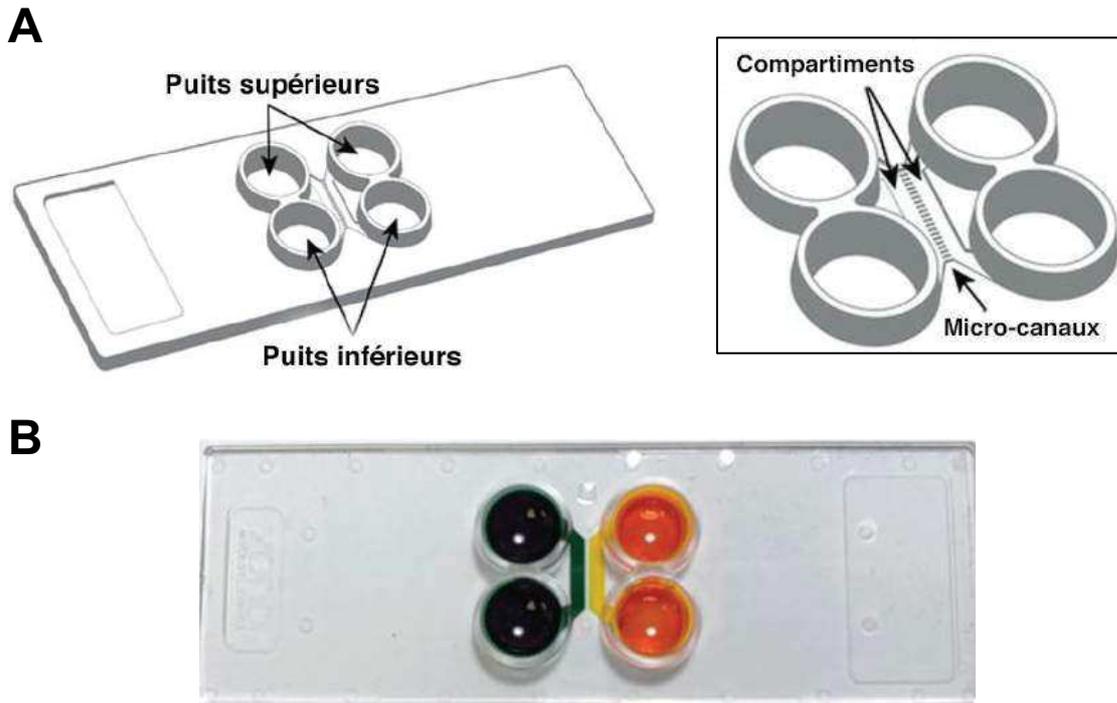


Figure 42 : Description de l'organisation d'une puce microfluidique Xona. A) Représentation schématique de la puce microfluidique composée de deux compartiments (droite et gauche) rejoins par les micro-canaux. L'ensemble est disposé sur une lame. L'image de droite représente un zoom de la puce et indique les micro-canaux qui permettent la communication entre ces deux compartiments. B) Photographie illustrant la communication entre les compartiments dans la puce microfluidique Xona. Les images sont adaptées du site internet Xona microfluidics.

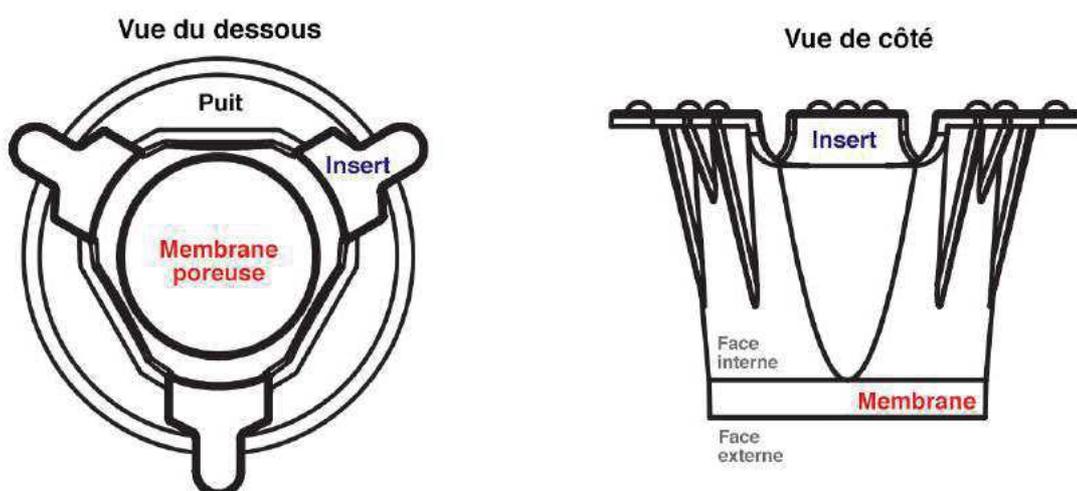


Figure 43 : Organisation de l'insert de culture 3D Millicell. Représentation schématique d'une vue du dessus (gauche) ou d'une vue de côté (droite) de l'insert de culture cellulaire avec la membrane poreuse. Les tancytes sont ensemencés sur la membrane poreuse de PET (polyéthylène téréphtalate). L'image est adaptée du guide d'utilisation de l'insert Millicell®.

IV.2. CULTURE SUR INSERT ET EXTRAIT DE MEMBRANE BASALE

Pour réaliser la culture cellulaire en 3D, des inserts suspendus pour plaque 24 puits (Millicell, Millipore) ont été utilisés. Collée à l'insert, on retrouve une membrane de polyéthylène téréphtalate (PET) poreuse (pores de 1 μm ou 3 μm de diamètre). Avant d'ensemencer les cellules, un gel de membrane basale (MB, Cultrex[®], Trevigen, 12 mg/mL) est formé sur la face externe de la membrane exposée au puit (figure 43). Pour ce faire, l'insert est retourné dans une boîte de 10 cm et une goutte de 60 μl de gel de MB est déposée. Après 35 minutes dans l'incubateur à 37°C, le gel est polymérisé, l'insert retourné et placé dans un puit d'une plaque 24 puits contenant 800 μl de milieu de culture complet. Les tancyctes sont ensuite ensemencés sur la membrane poreuse (face interne) dans 200 μl de milieu complet. Chaque jour, les cellules sont observées au microscope à contraste de phase, et le milieu changé un jour sur deux. Après 6 jours de culture sur l'insert, les cellules sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% diluée dans du Phosphate Buffer Saline (PBS) (NaCl, Na₂HPO₄, KCl, H₂KO₄Pi) à température ambiante pendant 20 minutes. Après 2 lavages au PBS, la membrane est délicatement décollée de l'insert et placée au fond d'un puit afin de réaliser l'immunomarquage.

IV. MICROSCOPIE ET ANALYSE D'IMAGE

V.1. MICROSCOPIE

V.1. A- Microscopie confocale

Les cellules sont observées sous un microscope confocal TCS SP5 (Leica microsystems) équipé d'une diode laser 405 nm et des lasers Argon : 488nm ; Hélium/Néon : 555nm ; Hélium/Néon : 633 nm. Les images sont prises avec l'objectif 63x (1.4 NA) avec de l'huile à immersion (zoom x3 ; résolution 90 nm).

V.1. B- Microscope confocal à disques rotatifs

Les cellules vivantes cultivées sur des puits de 1 cm² (ibidis 8 puits) à fond de verre sont placées dans une chambre thermostatée du microscope à 37°C afin de les maintenir dans des conditions optimales. La leptine fluorescente est incubée dans le milieu de culture DMEM et ajoutée au milieu

juste avant de démarrer l'enregistrement vidéo. L'acquisition des images se fait grâce à une caméra sCMOS Orca Flash4.0 (Hamamatsu) pendant 3 minutes et la fréquence d'acquisition des images est de 10 ms. La caméra est reliée au microscope Yokogawa CSU X1, Zeiss Axio Observer Z1, qui est contrôlé par le logiciel Metamorph (Molecular devices).

V.1. C- Microscopie électronique

Les cultures sur membrane sont fixées pour la microscopie électronique par 2% de glutaraldéhyde dans un tampon phosphate 0,1M (PB) pendant 1h à température ambiante (comme les étapes suivantes). Elles sont ensuite lavées avec du PB puis post-fixées dans 0,5% de tétroxyde d'osmium et 0,8% de ferrocyanure de potassium dans du PB pendant 30min. Les membranes sont alors séparées de leur support et les cultures sont deshydratées par des bains croissants d'éthanol de 10min : 50%, 70%, 95%, 2 fois 100%, puis 2 bains d'oxyde de propylène. Elles sont ensuite imprégnées par un mélange à volume égal d'oxyde de propylène et d'Araldite M (Sigma-Aldrich) pendant la nuit puis par l'Araldite pure 2x 3 heures. La polymérisation se fait pendant 48h à 60°C. Des coupes ultrafines de 80 nm sont effectuées dans un plan transversal par rapport à la membrane sur un ultra-microtome Leica. Elles sont récupérées sur des grilles à barreaux de 300 Mesh puis contrastées au citrate de plomb 3% selon Reynolds (Delta-Microscopies). Les échantillons sont ensuite observés sur un microscope électronique par transmission Hitachi H7500 muni d'une caméra numérique AMT Hamamatsu.

V.1. D- Nanozoomer

Les tancytes sontensemencés sur des lamelles de verre puis après fixation au PFA 4% et 3 lavages, les cellules sont fixées sur des lames avec le mowiol pour les observer. Afin d'éviter de scanner l'ensemble de la lamelle, plusieurs zones sont définies au préalable. Les lamelles sont ensuite scannées par le Nanozoomer S60 Hamamatsu (Digital scanner ; Hamamatsu – Japon) avec un zoom x40 (0.23 $\mu\text{m}/\text{pixel}$). Pour l'analyse sur ICY des images obtenues (représentant des champs très larges et dense en cellules), celles-ci sont divisées à l'aide d'Image J.

V.2. TRAITEMENT ET ANALYSE D'IMAGES

V.2. A- Analyse d'image avec le logiciel Icy

Les images sont analysées en utilisant le logiciel open source Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org/>). Les contours des cellules ont été délimités manuellement en utilisant l'image de contraste de phase et les objets (correspondant aux vésicules) segmentés en utilisant un plugin (spot detector) basé sur un algorithme de transformation par ondelettes. Les objets ont été considérés comme colocalisés si la distance entre leur centroïde est inférieure ou égale à 3 pixels. Les régions d'intérêt correspondantes à la segmentation des marquages EEA1, Rab11, Lamp1, ou Lysotracker ont été utilisées pour mesurer la quantité de fluorescence de la leptine retrouvée dans ces compartiments à un temps donné. Le pourcentage de leptine dans ces compartiments a ensuite été déterminé en normalisant la quantité de signal dans le compartiment d'intérêt sur la totalité du signal retrouvé dans la cellule.

La reproduction en 3D de l'organisation des tanycytes sur le système de membrane est réalisée avec un module de reconstruction sur ICY. Les différentes coupes sont superposées avec le plug-in "Z projection", permettant la projection des images selon l'axe Z et la visualisation 3D se fait par le plug-in "3D-VTK".

V.2. B- Traitement des données et mise en page des figures

L'ensemble des graphiques est réalisé avec le logiciel GraphPad Prism version 8.3.0 (GraphPad, San Diego, CA) et les planches photos sont ensuite montées sur Adobe Photoshop CC 2018.

BIBLIOGRAPHIE

1. Hypothalamus as an Endocrine Organ - Clarke - - Major Reference Works - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cphy.c140019>.
2. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat - Hetherington - 1940 - The Anatomical Record - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.1090780203>.
3. Anand, B. K. & Brobeck, J. R. Hypothalamic Control of Food Intake in Rats and Cats. *Yale J. Biol. Med.* **24**, 123–140 (1951).
4. Kennedy, G. C. The hypothalamic control of food intake in rats. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **137**, 535–549 (1950).
5. Williams, K. W. & Elmquist, J. K. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nat. Neurosci.* **15**, 1350–1355 (2012).
6. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J. & Baskin, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661–671 (2000).
7. Williams, G. *et al.* The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. *Physiol. Behav.* **74**, 683–701 (2001).
8. Pearson, C. A. & Placzek, M. Development of the medial hypothalamus: forming a functional hypothalamic-neurohypophyseal interface. *Curr. Top. Dev. Biol.* **106**, 49–88 (2013).
9. Berthoud, H.-R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **26**, 393–428 (2002).
10. Harrold, J. A., Dovey, T. M., Blundell, J. E. & Halford, J. C. G. CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology* **63**, 3–17 (2012).
11. Faouzi, M. *et al.* Differential accessibility of circulating leptin to individual hypothalamic sites. *Endocrinology* **148**, 5414–5423 (2007).
12. Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L. & Guerra, M. The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides* **31**, 757–776 (2010).
13. Huang, X. F., Koutcherov, I., Lin, S., Wang, H. Q. & Storlien, L. Localization of leptin receptor mRNA expression in mouse brain. *Neuroreport* **7**, 2635–2638 (1996).
14. Zigman, J. M., Jones, J. E., Lee, C. E., Saper, C. B. & Elmquist, J. K. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **494**, 528–548 (2006).
15. Marks, J. L., Porte, D., Stahl, W. L. & Baskin, D. G. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* **127**, 3234–3236 (1990).

16. Kristensen, P. *et al.* Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* **393**, 72–76 (1998).
17. Cone, R. D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat. Neurosci.* **8**, 571–578 (2005).
18. Sam, A. H., Troke, R. C., Tan, T. M. & Bewick, G. A. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology* **63**, 46–56 (2012).
19. Rossi, M. *et al.* A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* **139**, 4428–4431 (1998).
20. Ollmann, M. M. *et al.* Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* **278**, 135–138 (1997).
21. Fu, L.-Y. & van den Pol, A. N. Agouti-related peptide and MC3/4 receptor agonists both inhibit excitatory hypothalamic ventromedial nucleus neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **28**, 5433–5449 (2008).
22. Shimizu, N., Oomura, Y., Plata-Salamán, C. R. & Morimoto, M. Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus. *Brain Res.* **416**, 153–156 (1987).
23. Li, Y. Z. & Davidowa, H. Food deprivation decreases responsiveness of ventromedial hypothalamic neurons to melanocortins. *J. Neurosci. Res.* **77**, 596–602 (2004).
24. Meguid, M. M. *et al.* Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **16**, 843–857 (2000).
25. Routh, V. H. Glucose sensing neurons in the ventromedial hypothalamus. *Sensors* **10**, 9002–9025 (2010).
26. Fioramonti, X., Song, Z., Vazirani, R. P., Beuve, A. & Routh, V. H. Hypothalamic nitric oxide in hypoglycemia detection and counterregulation: a two-edged sword. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 505–517 (2011).
27. Campfield, L. A. & Smith, F. J. Functional coupling between transient declines in blood glucose and feeding behavior: temporal relationships. *Brain Res. Bull.* **17**, 427–433 (1986).
28. Pelleymounter, M. A., Cullen, M. J. & Wellman, C. L. Characteristics of BDNF-induced weight loss. *Exp. Neurol.* **131**, 229–238 (1995).
29. Xu, B. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat. Neurosci.* **6**, 736–742 (2003).
30. Laque, A. *et al.* Leptin receptor neurons in the mouse hypothalamus are colocalized with the neuropeptide galanin and mediate anorexigenic leptin action. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **304**, E999–1011 (2013).
31. Bernardis, L. L. Sex and age differences in hyperthermia response to ether anesthesia in weanling rats with ventro-medial hypothalamic lesions. *Experientia* **26**, 1322–1324 (1970).

32. Bellinger, L. L. & Bernardis, L. L. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: lessons learned from lesioning studies. *Physiol. Behav.* **76**, 431–442 (2002).
33. Elmquist, J. K., Bjørbaek, C., Ahima, R. S., Flier, J. S. & Saper, C. B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **395**, 535–547 (1998).
34. Leibowitz, S. F., Hammer, N. J. & Chang, K. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiol. Behav.* **27**, 1031–1040 (1981).
35. Taylor, K., Lester, E., Hudson, B. & Ritter, S. Hypothalamic and hindbrain NPY, AGRP and NE increase consummatory feeding responses. *Physiol. Behav.* **90**, 744–750 (2007).
36. Tao, Y.-X. Mutations in the melanocortin-3 receptor (MC3R) gene: Impact on human obesity or adiposity. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* **2000** **11**, 1092–1096 (2010).
37. Krashes, M. J., Lowell, B. B. & Garfield, A. S. Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis. *Nat. Neurosci.* **19**, 206–219 (2016).
38. Huszar, D. *et al.* Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* **88**, 131–141 (1997).
39. Lu, X.-Y., Barsh, G. S., Akil, H. & Watson, S. J. Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 7863–7872 (2003).
40. Kim, M. S. *et al.* The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J. Clin. Invest.* **105**, 1005–1011 (2000).
41. Nicolaidis, S. Lateral hypothalamic control of metabolic factors related to feeding. *Diabetologia* **20 Suppl**, 426–434 (1981).
42. Teitelbaum, P. & Epstein, A. N. The lateral hypothalamic syndrome: recovery of feeding and drinking after lateral hypothalamic lesions. *Psychol. Rev.* **69**, 74–90 (1962).
43. Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J. G. & Hökfelt, T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J. Comp. Neurol.* **402**, 460–474 (1998).
44. Gillard, E. R., Dang, D. Q. & Stanley, B. G. Evidence that neuropeptide Y and dopamine in the perifornical hypothalamus interact antagonistically in the control of food intake. *Brain Res.* **628**, 128–136 (1993).
45. Burdakov, D., Luckman, S. M. & Verkhratsky, A. Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **360**, 2227–2235 (2005).
46. Abbott, N. J., Rönnbäck, L. & Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 41–53 (2006).
47. Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R. & Begley, D. J. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13–25 (2010).

48. Tilling, T., Korte, D., Hoheisel, D. & Galla, H. J. Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J. Neurochem.* **71**, 1151–1157 (1998).
49. Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V. & Dehouck, B. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **518**, 943–962 (2010).
50. Ciofi, P. *et al.* Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* **150**, 5509–5519 (2009).
51. Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V. & Dehouck, B. Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **521**, 3389–3405 (2013).
52. Horstmann, E. [The fiber glia of selacean brain]. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria 1948* **39**, 588–617 (1954).
53. Millhouse, O. E. A Golgi study of third ventricle tanycytes in the adult rodent brain. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria 1948* **121**, 1–13 (1971).
54. Seress, L. Development and structure of the radial glia in the postnatal rat brain. *Anat. Embryol. (Berl.)* **160**, 213–226 (1980).
55. Leonhardt, H. & Lindemann, B. Surface morphology of the subfornical organ in the rabbit's brain. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria 1948* **146**, 243–260 (1973).
56. Hirano, A. & Zimmerman, H. M. Some new cytological observations of the normal rat ependymal cell. *Anat. Rec.* **158**, 293–301 (1967).
57. Lofgren, F. New aspects of the hypothalamic control of the adenohypophysis. *Acta Morphol. Neerl. Scand.* **2**, 220–229 (1959).
58. Akmayev, I. G., Fidelina, O. V., Kabolova, Z. A., Popov, A. P. & Schitkova, T. A. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. IV. Medial basal hypothalamus. An experimental morphological study. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Vienna Austria 1948* **137**, 493–512 (1973).
59. Ig, A. & Ov, F. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VI. The tanycytes: their relation to the sexual differentiation of the hypothalamus. An enzyme-histochemical study. *Cell and tissue research* vol. 173 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/991250/> (1976).
60. Rodríguez, E. M., González, C. B. & Delannoy, L. Cellular organization of the lateral and postinfundibular regions of the median eminence in the rat. *Cell Tissue Res.* **201**, 377–408 (1979).
61. Rodriguez-Boulan, E., Kreitzer, G. & Müsch, A. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 233–247 (2005).
62. Prevot, V. *et al.* The Versatile Tanycyte: A Hypothalamic Integrator of Reproduction and Energy Metabolism. *Endocr. Rev.* **39**, 333–368 (2018).
63. Rodríguez, E., Guerra, M., Peruzzo, B. & Blázquez, J. L. Tanycytes: A rich morphological history to underpin future molecular and physiological investigations. *J. Neuroendocrinol.* **31**, e12690

(2019).

64. Langlet, F. Tanycyte Gene Expression Dynamics in the Regulation of Energy Homeostasis. *Front. Endocrinol.* **10**, 286 (2019).
65. Mirzadeh, Z. *et al.* Bi- and unciliated ependymal cells define continuous floor-plate-derived tanycytic territories. *Nat. Commun.* **8**, 13759 (2017).
66. Pasquettaz, R. *et al.* Peculiar protrusions along tanycyte processes face diverse neural and non-neural cell types in the hypothalamic parenchyma. *J. Comp. Neurol.* (2020) doi:10.1002/cne.24965.
67. Coppola, A. *et al.* A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab.* **5**, 21–33 (2007).
68. Rodríguez, E. M. *et al.* Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int. Rev. Cytol.* **247**, 89–164 (2005).
69. Brightman, M. W. & Reese, T. S. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* **40**, 648–677 (1969).
70. Langlet, F. *et al.* Tanycytic VEGF-A boosts blood-hypothalamus barrier plasticity and access of metabolic signals to the arcuate nucleus in response to fasting. *Cell Metab.* **17**, 607–617 (2013).
71. Miyata, S. New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. *Front. Neurosci.* **9**, 390 (2015).
72. Balland, E. *et al.* Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *Cell Metab.* **19**, 293–301 (2014).
73. Collden, G. *et al.* Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol. Metab.* **4**, 15–24 (2015).
74. Langub, M. C. & Watson, R. E. Estrogen receptor-immunoreactive glia, endothelia, and ependyma in guinea pig preoptic area and median eminence: electron microscopy. *Endocrinology* **130**, 364–372 (1992).
75. Ojeda, S. R., Lomniczi, A. & Sandau, U. S. Glial-gonadotrophin hormone (GnRH) neurone interactions in the median eminence and the control of GnRH secretion. *J. Neuroendocrinol.* **20**, 732–742 (2008).
76. Prevot, V., Cornea, A., Mungenast, A., Smiley, G. & Ojeda, S. R. Activation of erbB-1 Signaling in Tanycytes of the Median Eminence Stimulates Transforming Growth Factor α 1 Release via Prostaglandin E2 Production and Induces Cell Plasticity. 11.
77. Elizondo-Vega, R. J., Recabal, A. & Oyarce, K. Nutrient Sensing by Hypothalamic Tanycytes. *Front. Endocrinol.* **10**, (2019).
78. Bolborea, M. & Dale, N. Hypothalamic tanycytes: potential roles in the control of feeding and energy balance. *Trends Neurosci.* **36**, 91–100 (2013).
79. Peruzzo, B. *et al.* A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Exp. Brain*

Res. **132**, 10–26 (2000).

80. Lazutkaite, G., Soldà, A., Lossow, K., Meyerhof, W. & Dale, N. Amino acid sensing in hypothalamic tanycytes via umami taste receptors. *Mol. Metab.* **6**, 1480–1492 (2017).
81. Geller, S. *et al.* Tanycytes Regulate Lipid Homeostasis by Sensing Free Fatty Acids and Signaling to Key Hypothalamic Neuronal Populations via FGF21 Secretion. *Cell Metab.* **30**, 833–844.e7 (2019).
82. Shimogori, T. *et al.* A genomic atlas of mouse hypothalamic development. *Nat. Neurosci.* **13**, 767–775 (2010).
83. Xu, A. W. *et al.* Effects of hypothalamic neurodegeneration on energy balance. *PLoS Biol.* **3**, e415 (2005).
84. Kokoeva, M. V., Yin, H. & Flier, J. S. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* **310**, 679–683 (2005).
85. Haan, N. *et al.* Fgf10-expressing tanycytes add new neurons to the appetite/energy-balance regulating centers of the postnatal and adult hypothalamus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 6170–6180 (2013).
86. Robins, S. C. *et al.* α -Tanycytes of the adult hypothalamic third ventricle include distinct populations of FGF-responsive neural progenitors. *Nat. Commun.* **4**, 2049 (2013).
87. Chaker, Z. *et al.* Hypothalamic neurogenesis persists in the aging brain and is controlled by energy-sensing IGF-I pathway. *Neurobiol. Aging* **41**, 64–72 (2016).
88. Woods, S. C., Lotter, E. C., McKay, L. D. & Porte, D. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* **282**, 503–505 (1979).
89. McGowan, M. K., Andrews, K. M., Kelly, J. & Grossman, S. P. Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat. *Behav. Neurosci.* **104**, 373–385 (1990).
90. Air, E. L. *et al.* Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nat. Med.* **8**, 179–183 (2002).
91. Strubbe, J. H. & Mein, C. G. Increased feeding in response to bilateral injection of insulin antibodies in the VMH. *Physiol. Behav.* **19**, 309–313 (1977).
92. Obici, S., Feng, Z., Karkanas, G., Baskin, D. G. & Rossetti, L. Decreasing hypothalamic insulin receptors causes hyperphagia and insulin resistance in rats. *Nat. Neurosci.* **5**, 566–572 (2002).
93. Qiu, J. *et al.* Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell Metab.* **19**, 682–693 (2014).
94. Schwartz, M. W., Figlewicz, D. P., Baskin, D. G., Woods, S. C. & Porte, D. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr. Rev.* **13**, 387–414 (1992).
95. Sato, I. *et al.* Insulin inhibits neuropeptide Y gene expression in the arcuate nucleus through GABAergic systems. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **25**, 8657–8664 (2005).

96. Klöckener, T. *et al.* High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. *Nat. Neurosci.* **14**, 911–918 (2011).
97. Niswender, K. D. *et al.* Immunocytochemical detection of phosphatidylinositol 3-kinase activation by insulin and leptin. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **51**, 275–283 (2003).
98. Tschöp, M., Smiley, D. L. & Heiman, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* **407**, 908–913 (2000).
99. Kohno, D., Gao, H.-Z., Muroya, S., Kikuyama, S. & Yada, T. Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca²⁺ signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes* **52**, 948–956 (2003).
100. Kojima, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656–660 (1999).
101. Szentirmai, E., Kapás, L., Sun, Y., Smith, R. G. & Krueger, J. M. Spontaneous sleep and homeostatic sleep regulation in ghrelin knockout mice. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **293**, R510-517 (2007).
102. Cowley, M. A. *et al.* The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* **37**, 649–661 (2003).
103. Oomura, Y. *et al.* RECIPROCAL ACTIVITIES OF THE VENTROMEDIAL AND LATERAL HYPOTHALAMIC AREAS OF CATS. *Science* **143**, 484–485 (1964).
104. Kang, L. *et al.* Prior hypoglycemia enhances glucose responsiveness in some ventromedial hypothalamic glucosensing neurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **294**, R784-792 (2008).
105. Jordan, S. D., Könnner, A. C. & Brüning, J. C. Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 3255–3273 (2010).
106. Ichimura, A., Hara, T. & Hirasawa, A. Regulation of Energy Homeostasis via GPR120. *Front. Endocrinol.* **5**, 111 (2014).
107. Cota, D. *et al.* Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* **312**, 927–930 (2006).
108. Morrison, C. D. & Berthoud, H.-R. Neurobiology of nutrition and obesity. *Nutr. Rev.* **65**, 517–534 (2007).
109. Adeva, M. M., Calviño, J., Souto, G. & Donapetry, C. Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans. *Amino Acids* **43**, 171–181 (2012).
110. Wang, T. J. *et al.* Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat. Med.* **17**, 448–453 (2011).
111. Würtz, P. *et al.* Lipoprotein subclass profiling reveals pleiotropy in the genetic variants of lipid risk factors for coronary heart disease: a note on Mendelian randomization studies. *J. Am. Coll.*

Cardiol. **62**, 1906–1908 (2013).

112. Mayer, J. & Barnett, R. J. Obesity following unilateral hypothalamic lesions in rats. *Science* **121**, 599–600 (1955).

113. Hervey, G. R. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J. Physiol.* **145**, 336–352 (1959).

114. Ingalls, A. M., Dickie, M. M. & Snell, G. D. Obese, a new mutation in the house mouse. *J. Hered.* **41**, 317–318 (1950).

115. Baetens, D. *et al.* Alteration of islet cell populations in spontaneously diabetic mice. *Diabetes* **27**, 1–7 (1978).

116. Zhang, Y. *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425–432 (1994).

117. Halaas, J. L. *et al.* Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**, 543–546 (1995).

118. Friedman, J. M. & Halaas, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763–770 (1998).

119. Tartaglia, L. A. *et al.* Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* **83**, 1263–1271 (1995).

120. Li, C., Ioffe, E., Fidahusein, N., Connolly, E. & Friedman, J. M. Absence of soluble leptin receptor in plasma from dbPas/dbPas and other db/db mice. *J. Biol. Chem.* **273**, 10078–10082 (1998).

121. Kishimoto, T., Taga, T. & Akira, S. Cytokine signal transduction. *Cell* **76**, 253–262 (1994).

122. Ahima, R. S. & Flier, J. S. Leptin. *Annu. Rev. Physiol.* **62**, 413–437 (2000).

123. Peelman, F. *et al.* Mapping of binding site III in the leptin receptor and modeling of a hexameric leptin-leptin receptor complex. *J. Biol. Chem.* **281**, 15496–15504 (2006).

124. Hileman, S. M., Tornøe, J., Flier, J. S. & Bjørbaek, C. Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Endocrinology* **141**, 1955–1961 (2000).

125. van Dielen, F. M. H., van 't Veer, C., Buurman, W. A. & Greve, J. W. M. Leptin and soluble leptin receptor levels in obese and weight-losing individuals. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 1708–1716 (2002).

126. Scott, M. M. *et al.* Leptin targets in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* **514**, 518–532 (2009).

127. Friedman, J. M. Obesity in the new millennium. *Nature* **404**, 632–634 (2000).

128. Li, J. Y. *et al.* Agouti-related protein-like immunoreactivity: characterization of release from hypothalamic tissue and presence in serum. *Endocrinology* **141**, 1942–1950 (2000).

129. Baskin, D. G., Breininger, J. F. & Schwartz, M. W. Leptin receptor mRNA identifies a subpopulation of neuropeptide Y neurons activated by fasting in rat hypothalamus. *Diabetes* **48**, 828–

833 (1999).

130. Lin, S. & Huang, X. F. Fasting increases leptin receptor mRNA expression in lean but not obese (ob/ob) mouse brain. *Neuroreport* **8**, 3625–3629 (1997).
131. Mercer, J. G. *et al.* Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Lett.* **387**, 113–116 (1996).
132. Satoh, N. *et al.* The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci. Lett.* **224**, 149–152 (1997).
133. Coppari, R. *et al.* The hypothalamic arcuate nucleus: a key site for mediating leptin's effects on glucose homeostasis and locomotor activity. *Cell Metab.* **1**, 63–72 (2005).
134. Levy, D. E. & Darnell, J. E. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 651–662 (2002).
135. Bjørbaek, C. *et al.* Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 4747–4755 (2001).
136. Cui, Y. *et al.* Essential role of STAT3 in body weight and glucose homeostasis. *Mol. Cell Biol.* **24**, 258–269 (2004).
137. Gao, Y., Tschöp, M. H. & Luquet, S. Hypothalamic tanycytes: gatekeepers to metabolic control. *Cell Metab.* **19**, 173–175 (2014).
138. Li, C. & Friedman, J. M. Leptin receptor activation of SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase 2 modulates Ob receptor signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9677–9682 (1999).
139. Banks, W. A., Niehoff, M. L., Martin, D. & Farrell, C. L. Leptin transport across the blood–brain barrier of the Koletsky rat is not mediated by a product of the leptin receptor gene. *Brain Res.* **950**, 130–136 (2002).
140. Rahmouni, K., Sigmund, C. D., Haynes, W. G. & Mark, A. L. Hypothalamic ERK mediates the anorectic and thermogenic sympathetic effects of leptin. *Diabetes* **58**, 536–542 (2009).
141. Zhang, E. E., Chapeau, E., Hagihara, K. & Feng, G.-S. Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 16064–16069 (2004).
142. Niswender, K. D. & Schwartz, M. W. Insulin and leptin revisited: adiposity signals with overlapping physiological and intracellular signaling capabilities. *Front. Neuroendocrinol.* **24**, 1–10 (2003).
143. Sun, X. J. *et al.* Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* **377**, 173–177 (1995).
144. Cao, X. *et al.* Thymus-expressed chemokine promotes survival of PC12 cells via PI3K pathway. *Neurochem. Int.* **60**, 163–169 (2012).
145. Ma, W. *et al.* FoxO1 negatively regulates leptin-induced POMC transcription through its direct interaction with STAT3. *Biochem. J.* **466**, 291–298 (2015).

146. Ren, H. *et al.* FoxO1 target Gpr17 activates AgRP neurons to regulate food intake. *Cell* **149**, 1314–1326 (2012).
147. Friedman, J. M. & Mantzoros, C. S. 20 years of leptin: From the discovery of the leptin gene to leptin in our therapeutic armamentarium. *Metab. - Clin. Exp.* **64**, 1–4 (2015).
148. Morris, A. Mechanisms of leptin resistance revealed. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 628 (2018).
149. Bjørbaek, C., El-Haschimi, K., Frantz, J. D. & Flier, J. S. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *J. Biol. Chem.* **274**, 30059–30065 (1999).
150. Münzberg, H., Flier, J. S. & Bjørbaek, C. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology* **145**, 4880–4889 (2004).
151. Howard, J. K. *et al.* Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat. Med.* **10**, 734–738 (2004).
152. White, C. L. *et al.* HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**, E291–299 (2009).
153. Mazor, R. *et al.* Cleavage of the leptin receptor by matrix metalloproteinase-2 promotes leptin resistance and obesity in mice. *Sci. Transl. Med.* **10**, (2018).
154. Magni, P. *et al.* Free and bound plasma leptin in normal weight and obese men and women: relationship with body composition, resting energy expenditure, insulin-sensitivity, lipid profile and macronutrient preference. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* **62**, 189–196 (2005).
155. Schwartz, M. W., Peskind, E., Raskind, M., Boyko, E. J. & Porte, D. Cerebrospinal fluid leptin levels: Relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat. Med.* **2**, 589–593 (1996).
156. Morgan, D. A., Thedens, D. R., Weiss, R. & Rahmouni, K. Mechanisms mediating renal sympathetic activation to leptin in obesity. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **295**, R1730–1736 (2008).
157. Izquierdo, A. G., Crujeiras, A. B., Casanueva, F. F. & Carreira, M. C. Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later? *Nutrients* **11**, (2019).
158. Kleinert, M. *et al.* Time-resolved hypothalamic open flow micro-perfusion reveals normal leptin transport across the blood-brain barrier in leptin resistant mice. *Mol. Metab.* **13**, 77–82 (2018).
159. Harrison, L. *et al.* Fluorescent blood–brain barrier tracing shows intact leptin transport in obese mice. *Int. J. Obes. 2005* **43**, 1305–1318 (2019).
160. Schaeffer, M. *et al.* Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1512–1517 (2013).
161. Yoo, S., Cha, D., Kim, D. W., Hoang, T. V. & Blackshaw, S. Tanycyte-Independent Control of Hypothalamic Leptin Signaling. *Front. Neurosci.* **13**, (2019).
162. McMahon, H. T. & Boucrot, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 517–533 (2011).

163. Doherty, G. J. & McMahon, H. T. Mechanisms of endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 857–902 (2009).
164. Mayor, S., Parton, R. G. & Donaldson, J. G. Clathrin-independent pathways of endocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, (2014).
165. Pearse, B. M. & Bretscher, M. S. Membrane recycling by coated vesicles. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 85–101 (1981).
166. Pearse, B. M. Clathrin: a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**, 1255–1259 (1976).
167. Ungewickell, E. & Branton, D. Assembly units of clathrin coats. *Nature* **289**, 420–422 (1981).
168. Kirchhausen, T. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 705–732 (1999).
169. Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R. & Owen, D. J. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* **109**, 523–535 (2002).
170. Benmerah, A., Bégue, B., Dautry-Varsat, A. & Cerf-Bensussan, N. The ear of alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15 protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 12111–12116 (1996).
171. Benmerah, A. *et al.* The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor AP-2. *J. Cell Biol.* **131**, 1831–1838 (1995).
172. Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N. & Dautry-Varsat, A. Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J. Cell Sci.* **112 (Pt 9)**, 1303–1311 (1999).
173. Shpetner, H. S. & Vallee, R. B. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* **59**, 421–432 (1989).
174. Ferguson, S. M. *et al.* A selective activity-dependent requirement for dynamin 1 in synaptic vesicle endocytosis. *Science* **316**, 570–574 (2007).
175. Warnock, D. E., Baba, T. & Schmid, S. L. Ubiquitously expressed dynamin-II has a higher intrinsic GTPase activity and a greater propensity for self-assembly than neuronal dynamin-I. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2553–2562 (1997).
176. Vaid, K. S. *et al.* The role of dynamin 3 in the testis. *J. Cell. Physiol.* **210**, 644–654 (2007).
177. Hinshaw, J. E. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**, 483–519 (2000).
178. Gaidarov, I. & Keen, J. H. Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* **146**, 755–764 (1999).
179. Reider, A. *et al.* Syp1 is a conserved endocytic adaptor that contains domains involved in cargo selection and membrane tubulation. *EMBO J.* **28**, 3103–3116 (2009).
180. Braell, W. A., Schlossman, D. M., Schmid, S. L. & Rothman, J. E. Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: role of an uncoating ATPase. *J. Cell Biol.* **99**, 734–741

(1984).

181. Rothnie, A., Clarke, A. R., Kuzmic, P., Cameron, A. & Smith, C. J. A sequential mechanism for clathrin cage disassembly by 70-kDa heat-shock cognate protein (Hsc70) and auxilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 6927–6932 (2011).
182. Andreone, B. J. *et al.* Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. *Neuron* **94**, 581-594.e5 (2017).
183. Parton, R. G. & Richards, A. A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic Cph. Den.* **4**, 724–738 (2003).
184. Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J. & Caplan, S. The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol. Histopathol.* **25**, 99–112 (2010).
185. Geuze, H. J., Slot, J. W. & Schwartz, A. L. Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution. *J. Cell Biol.* **104**, 1715–1723 (1987).
186. Dunn, K. W., McGraw, T. E. & Maxfield, F. R. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J. Cell Biol.* **109**, 3303–3314 (1989).
187. Ciechanover, A., Schwartz, A. L. & Lodish, H. F. Sorting and recycling of cell surface receptors and endocytosed ligands: the asialoglycoprotein and transferrin receptors. *J. Cell. Biochem.* **23**, 107–130 (1983).
188. Green, M. R., Basketter, D. A., Couchman, J. R. & Rees, D. A. Distribution and number of epidermal growth factor receptors in skin is related to epithelial cell growth. *Dev. Biol.* **100**, 506–512 (1983).
189. Dunn, K. W. & Maxfield, F. R. Delivery of ligands from sorting endosomes to late endosomes occurs by maturation of sorting endosomes. *J. Cell Biol.* **117**, 301–310 (1992).
190. Seabra, M. C. & Coudrier, E. Rab GTPases and myosin motors in organelle motility. *Traffic Cph. Den.* **5**, 393–399 (2004).
191. Murray, J. T., Panaretou, C., Stenmark, H., Miaczynska, M. & Backer, J. M. Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic Cph. Den.* **3**, 416–427 (2002).
192. Nielsen, E., Severin, F., Backer, J. M., Hyman, A. A. & Zerial, M. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat. Cell Biol.* **1**, 376–382 (1999).
193. Mills, I. G., Jones, A. T. & Clague, M. J. Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Curr. Biol. CB* **8**, 881–884 (1998).
194. Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y. & Zerial, M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **122**, 735–749 (2005).
195. Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M. & Spang, A. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* **141**, 497–508 (2010).
196. Knight, A., Hughson, E., Hopkins, C. R. & Cutler, D. F. Membrane protein trafficking through the common apical endosome compartment of polarized Caco-2 cells. *Mol. Biol. Cell* **6**, 597–610 (1995).

197. Thompson, A. *et al.* Recycling Endosomes of Polarized Epithelial Cells Actively Sort Apical and Basolateral Cargos into Separate Subdomains. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2687–2697 (2007).
198. Ullrich, O., Reinsch, S., Urbé, S., Zerial, M. & Parton, R. G. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* **135**, 913–924 (1996).
199. Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G. & Gruenberg, J. Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J. Cell Biol.* **123**, 1373–1387 (1993).
200. Sleat, D. E., Della Valle, M. C., Zheng, H., Moore, D. F. & Lobel, P. The mannose 6-phosphate glycoprotein proteome. *J. Proteome Res.* **7**, 3010–3021 (2008).
201. Kanki, T. & Okamoto, K. Assays for autophagy II: Mitochondrial autophagy. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1163**, 165–173 (2014).
202. Sachse, M., van Kerkhof, P., Strous, G. J. & Klumperman, J. The ubiquitin-dependent endocytosis motif is required for efficient incorporation of growth hormone receptor in clathrin-coated pits, but not clathrin-coated lattices. *J. Cell Sci.* **114**, 3943–3952 (2001).
203. Sauvonnet, N., Dujeancourt, A. & Dautry-Varsat, A. Cortactin and dynamin are required for the clathrin-independent endocytosis of gammac cytokine receptor. *J. Cell Biol.* **168**, 155–163 (2005).
204. Barr, V. A., Lane, K. & Taylor, S. I. Subcellular localization and internalization of the four human leptin receptor isoforms. *J. Biol. Chem.* **274**, 21416–21424 (1999).
205. Belouzard, S., Delcroix, D. & Rouillé, Y. Low levels of expression of leptin receptor at the cell surface result from constitutive endocytosis and intracellular retention in the biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 28499–28508 (2004).
206. Belouzard, S. & Rouillé, Y. Ubiquitylation of leptin receptor OB-Ra regulates its clathrin-mediated endocytosis. *EMBO J.* **25**, 932–942 (2006).
207. Bonifacino, J. S. & Traub, L. M. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 395–447 (2003).
208. Tu, H., Hsueh, H., Kastin, A. J., Wu, X. & Pan, W. Unique leptin trafficking by a tailless receptor. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 2281–2291 (2010).
209. Cammisotto, P. G. *et al.* Receptor-Mediated Transcytosis of Leptin through Human Intestinal Cells In Vitro. *Int. J. Cell Biol.* **2010**, (2010).
210. Abulrob, A. *et al.* Protection by cholesterol-extracting cyclodextrins: a role for N-methyl-D-aspartate receptor redistribution. *J. Neurochem.* **92**, 1477–1486 (2005).
211. Uotani, S., Bjørbaek, C., Tornøe, J. & Flier, J. S. Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes* **48**, 279–286 (1999).
212. De Ceuninck, L., Wauman, J., Masschaele, D., Peelman, F. & Tavernier, J. Reciprocal cross-regulation between RNF41 and USP8 controls cytokine receptor sorting and processing. *J. Cell Sci.* **126**, 3770–3781 (2013).
213. Byun, K. *et al.* Clusterin/ApoJ enhances central leptin signaling through Lrp2-mediated

endocytosis. *EMBO Rep.* **15**, 801–808 (2014).

214. Couturier, C. *et al.* Silencing of OB-RGRP in mouse hypothalamic arcuate nucleus increases leptin receptor signaling and prevents diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19476–19481 (2007).

215. Vauthier, V. *et al.* Endospalin 1 silencing in the hypothalamic arcuate nucleus contributes to sustained weight loss of high fat diet obese mice. *Gene Ther.* **21**, 638–644 (2014).

216. Haft, C. R., de la Luz Sierra, M., Barr, V. A., Haft, D. H. & Taylor, S. I. Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7278–7287 (1998).

217. Parks, W. T. *et al.* Sorting Nexin 6, a Novel SNX, Interacts with the Transforming Growth Factor- β Family of Receptor Serine-Threonine Kinases. *J. Biol. Chem.* **276**, 19332–19339 (2001).

218. Rodriguez-Boulan, E. & Powell, S. K. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 395–427 (1992).

219. Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K. & Fallier-Becker, P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* **335**, 75–96 (2009).

220. Betz, A. L., Firth, J. A. & Goldstein, G. W. Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* **192**, 17–28 (1980).

221. Lidinsky, W. A. & Drewes, L. R. Characterization of the blood-brain barrier: protein composition of the capillary endothelial cell membrane. *J. Neurochem.* **41**, 1341–1348 (1983).

222. Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A. & Balda, M. S. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 453–458 (2005).

223. Etienne-Manneville, S. In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods Enzymol.* **406**, 565–578 (2006).

224. Yamanaka, T. & Ohno, S. Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **13**, 6693–6707 (2008).

225. Shin, K., Fogg, V. C. & Margolis, B. Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 207–235 (2006).

226. Torkko, J. M., Manninen, A., Schuck, S. & Simons, K. Depletion of apical transport proteins perturbs epithelial cyst formation and ciliogenesis. *J. Cell Sci.* **121**, 1193–1203 (2008).

227. Söllner, T. *et al.* SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318–324 (1993).

228. Lafont, F. *et al.* Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3734–3738 (1999).

229. Low, S. H. *et al.* The SNARE machinery is involved in apical plasma membrane trafficking in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **141**, 1503–1513 (1998).

230. Steegmaier, M., Lee, K. C., Prekeris, R. & Scheller, R. H. SNARE protein trafficking in polarized MDCK cells. *Traffic Cph. Den.* **1**, 553–560 (2000).
231. Schiavo, G., Stenbeck, G., Rothman, J. E. & Söllner, T. H. Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 997–1001 (1997).
232. Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H. & Rothman, J. E. A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409–418 (1993).
233. Grosshans, B. L., Ortiz, D. & Novick, P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11821–11827 (2006).
234. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107–117 (2001).
235. Galli, T. *et al.* Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs exocytosis of transferrin receptor-containing vesicles in CHO cells. *J. Cell Biol.* **125**, 1015–1024 (1994).
236. Prekeris, R., Klumperman, J., Chen, Y. A. & Scheller, R. H. Syntaxin 13 mediates cycling of plasma membrane proteins via tubulovesicular recycling endosomes. *J. Cell Biol.* **143**, 957–971 (1998).
237. McBride, H. M. *et al.* Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* **98**, 377–386 (1999).
238. Proux-Gillardeaux, V., Rudge, R. & Galli, T. The tetanus neurotoxin-sensitive and insensitive routes to and from the plasma membrane: fast and slow pathways? *Traffic Cph. Den.* **6**, 366–373 (2005).
239. Rao, S. K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T. & Andrews, N. W. Identification of SNAREs Involved in Synaptotagmin VII-regulated Lysosomal Exocytosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 20471–20479 (2004).
240. Verderio, C. *et al.* TI-VAMP/VAMP7 is the SNARE of secretory lysosomes contributing to ATP secretion from astrocytes. *Biol. Cell* **104**, 213–228 (2012).
241. Riento, K., Kauppi, M., Keranen, S. & Olkkonen, V. M. Munc18-2, a functional partner of syntaxin 3, controls apical membrane trafficking in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 13476–13483 (2000).
242. Fernández-Chacón, R. *et al.* Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* **410**, 41–49 (2001).
243. Holroyd, C., Kistner, U., Annaert, W. & Jahn, R. Fusion of endosomes involved in synaptic vesicle recycling. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3035–3044 (1999).
244. Calloway, N., Gouzer, G., Xue, M. & Ryan, T. A. The active-zone protein Munc13 controls the use-dependence of presynaptic voltage-gated calcium channels. *eLife* **4**, (2015).
245. Bhaskar, V. *et al.* An allosteric antibody to the leptin receptor reduces body weight and

- reverses the diabetic phenotype in the Lep(ob) /Lep(ob) mouse. *Obes. Silver Spring Md* **24**, 1687–1694 (2016).
246. Benmerah, A. *et al.* AP-2/Eps15 Interaction Is Required for Receptor-mediated Endocytosis. *J. Cell Biol.* **140**, 1055–1062 (1998).
247. Ramachandran, R. & Schmid, S. L. The dynamin superfamily. *Curr. Biol. CB* **28**, R411–R416 (2018).
248. Wilcke, M. & Walum, E. Characterization of leptin intracellular trafficking. *Eur. J. Histochem. EJH* **44**, 325–334 (2000).
249. Foran, P., Lawrence, G. W., Shone, C. C., Foster, K. A. & Dolly, J. O. Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release. *Biochemistry* **35**, 2630–2636 (1996).
250. Sultan, S. *et al.* Synaptic Integration of Adult-Born Hippocampal Neurons Is Locally Controlled by Astrocytes. *Neuron* **88**, 957–972 (2015).
251. Niv-Spector, L. *et al.* Identification of the hydrophobic strand in the A-B loop of leptin as major binding site III: implications for large-scale preparation of potent recombinant human and ovine leptin antagonists. *Biochem. J.* **391**, 221–230 (2005).
252. Peruzzo, B., Pastor, F. E., Blázquez, J. L., Amat, P. & Rodríguez, E. M. Polarized endocytosis and transcytosis in the hypothalamic tanycytes of the rat. *Cell Tissue Res.* **317**, 147–164 (2004).
253. Goodman, T. & Hajihosseini, M. K. Hypothalamic tanycytes—masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Front. Neurosci.* **9**, (2015).
254. Mandarino, L. J., Sundarraj, N., Finlayson, J. & Hassell, H. R. Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp. Eye Res.* **57**, 609–621 (1993).
255. Taylor, A. M. *et al.* A microfluidic culture platform for CNS axonal injury, regeneration and transport. *Nat. Methods* **2**, 599–605 (2005).
256. Akmayev, I. G. & Fidelina, O. V. Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VI. The tanycytes: their relation to the sexual differentiation of the hypothalamus. An enzyme-histochemical study. *Cell Tissue Res.* **173**, 407–416 (1976).
257. Chen, R., Wu, X., Jiang, L. & Zhang, Y. Single-Cell RNA-Seq Reveals Hypothalamic Cell Diversity. *Cell Rep.* **18**, 3227–3241 (2017).
258. Campbell, J. N. *et al.* A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types. *Nat. Neurosci.* **20**, 484–496 (2017).
259. Wauman, J., Zabeau, L. & Tavernier, J. The Leptin Receptor Complex: Heavier Than Expected? *Front. Endocrinol.* **8**, 30 (2017).
260. Bailleul, B., Akerblom, I. & Strosberg, A. D. The leptin receptor promoter controls expression of a second distinct protein. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2752–2758 (1997).
261. Séron, K. *et al.* Endospansins regulate a postinternalization step of the leptin receptor

- endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **286**, 17968–17981 (2011).
262. Vauthier, V. *et al.* Endospanin1 affects oppositely body weight regulation and glucose homeostasis by differentially regulating central leptin signaling. *Mol. Metab.* **6**, 159–172 (2016).
263. Klink, B. U. *et al.* A recombinant BBSome core complex and how it interacts with ciliary cargo. *eLife* **6**,.
264. Forsythe, E. & Beales, P. L. Bardet-Biedl syndrome. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **21**, 8–13 (2013).
265. Seo, S. *et al.* Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 1323–1331 (2009).
266. Guo, D.-F. *et al.* The BBSome Controls Energy Homeostasis by Mediating the Transport of the Leptin Receptor to the Plasma Membrane. *PLoS Genet.* **12**, e1005890 (2016).
267. Balthasar, N. *et al.* Leptin receptor signaling in POMC neurons is required for normal body weight homeostasis. *Neuron* **42**, 983–991 (2004).
268. van de Wall, E. *et al.* Collective and individual functions of leptin receptor modulated neurons controlling metabolism and ingestion. *Endocrinology* **149**, 1773–1785 (2008).
269. Pak, T. *et al.* Rax-CreERT2 knock-in mice: a tool for selective and conditional gene deletion in progenitor cells and radial glia of the retina and hypothalamus. *PLoS One* **9**, e90381 (2014).
270. Liu, Z. *et al.* Short-term tamoxifen treatment has long-term effects on metabolism in high-fat diet-fed mice with involvement of Nmnat2 in POMC neurons. *FEBS Lett.* **592**, 3305–3316 (2018).
271. Parkash, J. *et al.* Semaphorin7A regulates neuroglial plasticity in the adult hypothalamic median eminence. *Nat. Commun.* **6**, 6385 (2015).
272. Langlet, F. Targeting tanycytes: balance between efficiency and specificity. *Neuroendocrinology* (2020) doi:10.1159/000505549.
273. Takaya, K. *et al.* Nonsense mutation of leptin receptor in the obese spontaneously hypertensive Koletsky rat. *Nat. Genet.* **14**, 130–131 (1996).
274. Xu, B., Kalra, P. S., Farmerie, W. G. & Kalra, S. P. Daily changes in hypothalamic gene expression of neuropeptide Y, galanin, proopiomelanocortin, and adipocyte leptin gene expression and secretion: effects of food restriction. *Endocrinology* **140**, 2868–2875 (1999).
275. Ferguson, S. M. & De Camilli, P. Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 75–88 (2012).
276. Macia, E. *et al.* Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell* **10**, 839–850 (2006).
277. Park, R. J. *et al.* Dynamin triple knockout cells reveal off target effects of commonly used dynamin inhibitors. *J. Cell Sci.* **126**, 5305–5312 (2013).
278. Preta, G., Cronin, J. G. & Sheldon, I. M. Dynasore - not just a dynamin inhibitor. *Cell Commun. Signal. CCS* **13**, (2015).

279. Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E. & Schmid, S. L. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* **127**, 915–934 (1994).
280. Kranenburg, O., Verlaan, I. & Moolenaar, W. H. Dynamin is required for the activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase by MAP kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 35301–35304 (1999).
281. Imamura, T. *et al.* beta -Arrestin-mediated recruitment of the Src family kinase Yes mediates endothelin-1-stimulated glucose transport. *J. Biol. Chem.* **276**, 43663–43667 (2001).
282. Gout, I. *et al.* The GTPase dynamin binds to and is activated by a subset of SH3 domains. *Cell* **75**, 25–36 (1993).
283. Baron, V., Alengrin, F. & Van Obberghen, E. Dynamin associates with Src-Homology Collagen (Shc) and becomes tyrosine phosphorylated in response to insulin. *Endocrinology* **139**, 3034–3037 (1998).
284. Yao, Z. & Seger, R. The ERK signaling cascade—Views from different subcellular compartments. *BioFactors* **35**, 407–416 (2009).
285. Luttrell, L. M. *et al.* Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 2449–2454 (2001).
286. Teis, D. *et al.* p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. *J. Cell Biol.* **175**, 861–868 (2006).
287. Liang, C. *et al.* Hypericin maintains PDX1 expression via the Erk pathway and protects islet β -cells against glucotoxicity and lipotoxicity. *Int. J. Biol. Sci.* **15**, 1472–1487 (2019).
288. Baba, K. *et al.* Different localization of lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) in mammalian cultured cell lines. *Histochem. Cell Biol.* **153**, 199–213 (2020).
289. Preston, J. E., Joan Abbott, N. & Begley, D. J. Transcytosis of macromolecules at the blood-brain barrier. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* **71**, 147–163 (2014).
290. Li, D., Ropert, N., Koulakoff, A., Giaume, C. & Oheim, M. Lysosomes Are the Major Vesicular Compartment Undergoing Ca^{2+} -Regulated Exocytosis from Cortical Astrocytes. *J. Neurosci.* **28**, 7648–7658 (2008).
291. Wang, T., Li, L. & Hong, W. SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic Cph. Den.* **18**, 767–775 (2017).
292. Ahima, R. S., Prabakaran, D. & Flier, J. S. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J. Clin. Invest.* **101**, 1020–1027 (1998).
293. Ropert, N., Jalil, A. & Li, D. Expression and cellular function of vSNARE proteins in brain astrocytes. *Neuroscience* **323**, 76–83 (2016).
294. Horiguchi, K. *et al.* Isolation and characterization of cluster of differentiation 9-positive ependymal cells as potential adult neural stem/progenitor cells in the third ventricle of adult rats. *Cell Tissue Res.* **379**, 497–509 (2020).

295. Galli, T. *et al.* A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle-associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* **9**, 1437–1448 (1998).
296. Arantes, R. M. E. & Andrews, N. W. A role for synaptotagmin VII-regulated exocytosis of lysosomes in neurite outgrowth from primary sympathetic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**, 4630–4637 (2006).
297. Recabal, A. *et al.* Connexin-43 Gap Junctions Are Responsible for the Hypothalamic Tanycyte-Coupled Network. *Front. Cell. Neurosci.* **12**, 406 (2018).
298. El-Haschimi, K., Pierroz, D. D., Hileman, S. M., Bjørbæk, C. & Flier, J. S. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *J. Clin. Invest.* **105**, 1827–1832 (2000).



MARION MILLET



Mécanismes moléculaires du transport de la leptine par les tanocytes hypothalamiques

Résumé

La leptine est une hormone anorexigène sécrétée par le tissu adipeux qui est acheminée vers l'hypothalamus pour induire la satiété. Elle est transportée du sang vers le liquide céphalo-rachidien en traversant les tanocytes de l'éminence médiane, des cellules épendymaires spécialisées qui bordent le 3^e ventricule. Or, une des hypothèse mise en avant est que l'altération de ce transport participerait à la mise en place d'une résistance centrale à la leptine, un phénomène que l'on retrouve chez les patients atteints d'obésité. Il est donc primordial de mieux comprendre les mécanismes de transport des hormones métaboliques vers l'hypothalamus, un processus jusqu'alors inexploré au niveau cellulaire. Au cours de ma thèse, j'ai principalement étudié les mécanismes moléculaires qui régissent le transport tanocytaire de la leptine, de son internalisation jusqu'à sa sécrétion.

Mots clés : obésité, hypothalamus, leptine, tanocytes, trafic vésiculaire

Summary

Leptin is a hormone secreted by adipose tissue that acts in the central nervous system to regulate appetite. The dialogue between the periphery and the brain is essential to maintain energy homeostasis and involves tanocytes, specialized ependymal cells forming the wall of the 3rd ventricle. One of the hypotheses put forward is that alteration of this transport would contribute to the development of central leptin resistance, a phenomenon found in obese patients. It is therefore essential to better understand the mechanisms of transport of metabolic hormones to the hypothalamus, a process that has been unexplored until now at the cellular level. During my thesis, I mainly studied the molecular mechanisms governing the tanocytic transport of leptin, from its internalization to its secretion. Altogether, these data constitute a promising start toward the understanding of the leptin journey in tanocytes.

Key words: obesity, hypothalamus, leptin, tanocytes, vesicle trafficking