

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**INVESTIGATION DE LA PLASTICITÉ HYPOTHALAMIQUE EN SITUATION D'OBÉSITÉ**

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ  
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA  
MAÎTRISE EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE**

**PAR  
ALYSSA BRETON MORIN**

**OCTOBRE 2025**

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire, de cette thèse ou de cet essai a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire, de sa thèse ou de son essai.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire, cette thèse ou cet essai. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire, de cette thèse et de son essai requiert son autorisation.

## Remerciements

Il serait difficile de dresser une liste complète de toutes les personnes que je souhaite remercier, tant elles sont nombreuses. Exprimer ma gratitude en quelques mots s'avère donc un exercice délicat. Je tiens d'abord à remercier sincèrement tous celles et ceux qui, de près ou de loin, m'ont soutenue au cours de ces deux années de maîtrise. Même si je ne peux tous vous nommer ici, sachez que je ne vous oublie pas. J'aimerais maintenant adresser des remerciements plus personnels à certaines personnes en particulier.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche Alexandre Fisette qui a accepté de me prendre dans son laboratoire en 2020. Le Dr Fisette a toujours eu confiance en mes capacités et m'a permis de développer une éthique de travail que je n'aurai pas pu obtenir ailleurs. En plus de me supporter et de me motiver dans les moments difficiles de la recherche, il m'a permis de travailler dans de nombreux projets centraux du laboratoire et de développer des habiletés uniques.

Je tiens également à remercier les nombreux collègues de laboratoire avec qui j'ai eu la chance de travailler au cours de ma maîtrise, en particulier Ambica Bora et Savanah Descôteaux, avec qui j'ai eu la chance de partager des projets de recherches, mais aussi de développer une belle amitié. Merci pour votre soutien extraordinaire, les belles discussions et les fous rires inoubliables.

J'aimerais faire une mention spéciale à Carl Marchand, qui a fait ses débuts comme stagiaire dans le laboratoire et qui a été d'une grande d'aide pour le projet portant sur la neurodifférenciation hypothalamique.

Finalement, je veux remercier mon copain Marc-Antoine Simoneau, pour son soutien immense face à tous les hauts et les bas rencontrés au cours de ces deux dernières années. Merci pour tout le temps que tu as pris à m'écouter et à me conseiller durant cette période marquante de ma vie.

## Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	2
<b>Liste des figures</b> :.....	5
<b>Liste des tableaux</b> : .....	6
<b>Liste des abréviations</b> : .....	7
<b>Introduction générale</b> .....	11
<b>I. Problématique : pourquoi la perte de poids chez l'humain est-elle incurable ?</b> .....	<b>11</b>
Qu'est-ce que l'obésité ? .....	11
Qu'en est-il de la perte de poids sur le long terme ? .....	12
Où se situe le problème de l'obésité ? .....	13
Régions du cerveau qui participe à la balance énergétique. ....	14
L'hypothalamus et le système de la mélanocortine : intégration des différents signaux métaboliques périphériques pour réguler les dépenses énergétiques. ....	20
Les neurones non-Agrp/Npy et non-Pomc de l'ARC : .....	22
Effets combinés des neurones Pomc et Agrp sur le PVN : .....	23
<b>II. L'obésité et les neurones Pomc</b> .....	<b>25</b>
Accent sur les neurones Pomc : .....	25
Effets du stress métabolique sur les neurones Pomc : .....	31
Résultats contradictoires : apoptose des neurones Pomc en situation de stress métabolique vs vrai suivi de lignée cellulaire Pomc : .....	33
<b>III. Plasticité dans le cerveau</b> .....	<b>35</b>
Formes de neuroplasticité connues : les changements de connexion synaptique, la création de nouvelles synapses .....	35
<b>IV. Respécification</b> .....	<b>36</b>
Qu'est-ce que la respécification ? .....	36
Mécanismes de la respécification neuronale .....	40
<b>V. Neurogenèse</b> .....	<b>42</b>
Qu'est-ce que la neurogenèse ?.....	42
<b>Hypothèses</b> .....	<b>46</b>
<b>I : Respécification dans l'hypothalamus</b> .....	<b>46</b>
<b>II : Neurogenèse dans l'hypothalamus</b> .....	<b>47</b>

<b>Chapitre 1 : Respécification des neurones Pomc.....</b>	<b>50</b>
<b>I. Méthodes.....</b>	<b>50</b>
<b>II. Résultats : suractivation in vitro et in vivo .....</b>	<b>56</b>
Respécification <i>in vitro</i> .....	56
Respécification <i>in vivo</i> .....	64
<b>IV.Ouverture.....</b>	<b>73</b>
<b>Chapitre 2 : La neurogenèse .....</b>	<b>77</b>
<b>I. Explication du modèle &amp; méthodes .....</b>	<b>77</b>
<b>II.Objectifs .....</b>	<b>81</b>
<b>III. Résultats &amp; discussion.....</b>	<b>81</b>
<b>IV. Ouverture.....</b>	<b>85</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>89</b>
<b>I.Étude de la respécification in vitro et in vivo .....</b>	<b>89</b>
<b>II.Étude de la neurogenèse dans l’hypothalamus mature .....</b>	<b>91</b>
<b>III. Ouverture .....</b>	<b>92</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>93</b>

## Liste des figures :

<b>Figure 1:</b> Vue d'ensemble sur les différents noyaux hypothalamiques et leur rôle dans l'homéostasie du métabolisme.....	17
<b>Figure 2 :</b> Schématisation du système de la mélanocortine chez la souris.....	18
<b>Figure 3 :</b> Simplifications des séquences de clivage du neuropeptide Pomc.....	25
<b>Figure 4:</b> Expression des différents marqueurs de différenciation hypothalamiques des neurones Pomc selon les différents stades du développement neuronal, chez la souris. ..	29
<b>Figure 5:</b> Suivi de lignée cellulaire Pomc in vivo.....	34
<b>Figure 6 :</b> Description des évènements engendrant la respécification d'un neurone. ....	36
<b>Figure 7 :</b> Résumé de la respécification induite par la prolactine sur les neurones TiDa hypothalamique de la souris. ....	37
<b>Figure 8 :</b> Résumé de la respécification induite par le changement de cycle lumineux sur les neurones hypothalamiques du PVN.....	39
<b>Figure 9 :</b> Schématisation de l'hypothèse qu'un stress métabolique cause la respécification des neurones Pomc hypothalamique.....	46
<b>Figure 10:</b> Conséquence de la suractivation de neurones Pomc en culture immortalisée. ....	58
<b>Figure 11:</b> Expression qualitative et quantitative de neurones Pomc <sup>+</sup> en culture primaire hypothalamique.....	61
<b>Figure 12 :</b> Visualisation de la fluorescence eGFP des tissus hypothalamiques en culture organotypique.....	63
<b>Figure 13 :</b> Validation du site d'injection viral par chirurgie stéréotaxique chez des souris Pomc-Cre;Sun1-sfGFP.....	66
<b>Figure 14 :</b> suivi hebdomadaire des phénotypes post-chirurgie stéréotaxique avec infection de AAV-NaChBac ou CTRL des souris Pomc-Cre;Sun1-sfGFP. ....	68
<b>Figure 15 :</b> Expression de la protéine Pomc in vivo après 14 semaines HFHS chez les souris Pomc-Cre; Sun1-sfGFP mâles ayant reçu soit le virus AAV-NaChBac ou le virus AAV-CTRL.....	70
<b>Figure 16 :</b> Expression de la protéine c-Fos in vivo après 14 semaines HFHS chez les souris Pomc-Cre; Sun1-sfGFP mâles ayant reçu soit le virus AAV-NaChBac ou le virus AAV-CTRL.....	72
<b>Figure 17 :</b> Schématisation du fonctionnement de la technologie chimiogénétique DREADD.....	75
<b>Figure 18 :</b> Représentation du modèle murin pour suivi de lignée cellulaire multipotente Sox2 <sup>+</sup> .....	78
<b>Figure 19:</b> expression de la recombinase Cre chez les souris Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP avec le véhicule ou tamoxifène.....	82
<b>Figure 20:</b> Suivi hebdomadaire du poids et de la consommation alimentaire des souris Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP.....	83
<b>Figure 21:</b> Évaluation de la neurogenèse dans l'hypothalamus de souris Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP mâle sous HFHS ou CTRL.....	85

## Liste des tableaux :

<b>Tableau 1 :</b> Sommaire des peptides dérivés du clivage de Pomc selon les tissus et de leurs fonctions. ....	27
<b>Tableau 2:</b> liste des amorces utilisées pour l'analyse quantitative des gènes exprimés dans les CLU501. ....	52
<b>Tableau 3:</b> liste des amorces utilisées pour l'analyse quantitative des gènes exprimés dans les cultures hypothalamiques primaires Pomc <sup>eGFP</sup> . ....	54

## Liste des abréviations :

AAV : associated adeno-virus

Acs11 : Achaete-scute homologue 1

ACTH : adrénocorticotrophine

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

Agrp : Agouti-related protein

Agrp-Tfam: Agouti-related protein et facteur de transcription mitochondrial A

Ant : antérieur

AP: antérieur-postérieur

AraC : Cytarabine

ARC : noyau arqué

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BrdU : bromodeoxyuridine

Ca<sup>2+</sup>: calcium

cAMP: monophosphate adénosine cyclique

Cart: cocaïne et amphetamine related transcript

CNO: clozapine-N-oxide

CNTF: facteur neurotrophique ciliaire

CT: cycle threshold

CTRL: contrôle

DA : Dopamine

Dapi: 4',6-diamidino-2-phénylindole

DIO: diet induced obesity

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMH: noyau dorsomédian de l'hypothalamus

DNase : désoxyribonucléase

DREADD : Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs

DV : dorso-ventrale

EDTA : éthylènediaminetétraacétique

eGFP : enhance green fluorescence protein

Enk : enképhalique

ERT2 : Estrogen Receptor T2

FBS : fetal bovine serum

GABA : acide gamma-aminobutyrique

Gfap : glial fibrillary acidic protein

Gfp : green fluorescence protein

Glu: glutamine

HDL : high-density lipoprotein

HFHS : high fat high sucrose

Hprt : Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase

HS : horse serum

HVZ : zone ventriculaire de l'hypothalamus

Hyp : hypothalamus

IL-6 : Interleukine 6

IMC : indice de masse corporelle

Irx3/5: Iroquois homeobox protein 3/Iroquois homeobox protein 5

Isl1 : Insulin gene enhancer protein ISL-1

KCl: chlorure de potassium

Kiss1 : KiSS-1 metastasis-suppressor

KO : Knock-out

LDH: lactate déshydrogénase

LDL : low-density lipoprotein

LepR: récepteur de la leptine  
LH: hypothalamus latéral  
Lhx2 : LIM homeobox protein 2  
LoxP : locus of crossover (x) in P1  
Mash1: Mouse achaete-scute homolog 1  
Med : medial(e)  
Mc4R: récepteur de la mélanocortine-4  
ML : médiolatéral  
Mllt1 : Mixed-Lineage Leukemia Translocated To 1  
Ms : milliseconde  
NAC : noyau accumbens  
NaChBac :  
Neun : Neuronal Nuclei  
Ngn2/3 : neurogenine 2/ neurogenine 3  
Nhlh2 : Nescient Helix-Loop-Helix 2  
Npy: neuropeptide Y  
PC1/2: prohormones convertases 1 et 2  
PCNA: antigène nucléaire des cellules en prolifération  
PCR: polymerase chain reaction  
PFA: paraformaldehyde  
POA : noyau préoptique de l'hypothalamus  
Pomc : Proopiomélanocortine  
pSTAT3 : phosphorylated Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
PVN : noyau paraventriculaire de l'hypothalamus  
RT-qPCR : real time quantitative polymerase chain reaction  
sfGFP : superfolded green fluorescence protein  
Sox2 : SRY-box 2  
STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3

Tbx3 : T-BOX3

TiDa : neurones dopaminergiques Tubéro infundibulaires

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha

TNF- $\beta$  : Tumor Necrosis Factor beta

UQTR : Université du Québec à Trois-Rivières

vGat : transporteur vésiculaire du Gaba

VMH : noyau ventromédian de l'hypothalamus

VTA : aire tegmentale ventrale

YFP : yellow fluorescent protein

3V: 3e ventricule

5-HT : sérotonine

$\Delta\Delta\text{Ct}$  : double delta cycle threshold

$\alpha$ -Msh: alpha melanocyte-stimulating hormone

$\beta$ -Msh: beta melanocyte-stimulating hormone

$\gamma$ -Msh: gamma melanocyte-stimulating hormone

$\beta$ -Lph: beta lipotropic hormone

$\gamma$ -Lph: gamma lipotropic hormone

## Introduction générale

Mon projet de maîtrise se divise en deux projets distincts portant sur la plasticité hypothalamique en situation d'obésité. Le premier projet porte sur la respécification des neurones Pomc et le deuxième sur la neurogenèse dans l'hypothalamus. Ces deux sujets seront respectivement abordés dans les **sections IV** et **V** de l'introduction tandis que les sections d'introduction générale servent à mettre la table pour les deux projets.

### I. Problématique : pourquoi l'obésité est-elle si difficile à traiter ?

#### Qu'est-ce que l'obésité ?

L'obésité se caractérise par une accumulation de masse grasseuse abdominale nuisant gravement à la santé et à la qualité de vie des personnes atteintes [1]. Il s'agit d'une maladie chronique progressive au même titre que le diabète de type II [1]. Une personne peut être considérée comme obèse si son indice de masse corporelle (IMC) est supérieur à 30 [2]. Depuis les années 1990, l'obésité mondiale est en ascendance, ayant quadruplé chez les enfants entre 5 à 19 ans, passant de 2% à 8%, alors que pour les adultes de 19 ans et plus, l'obésité est passée de 7 à 16% [2]. En 2018 au Canada, 26,8% des adultes ont été déclarés obèses alors que 36,3% des adultes ont été déclarés comme étant en surpoids [3]. Le coût économique en 2021 pour l'obésité a été estimé à 9 milliards de dollars pour le système de la santé canadienne [1].

L'importante accumulation de masse grasseuse au niveau de l'abdomen, cause de l'obésité, est associée à une hausse des graisses dans la circulation sanguine pouvant avoir plusieurs répercussions négatives, notamment la résistance à l'insuline, une hausse de LDL (lipoprotéine de basse densité), le mauvais cholestérol, accompagnée d'une baisse du HDL (lipoprotéine de haute densité), le bon cholestérol, en plus d'augmenter les risques de maladies cardiovasculaires, les problèmes de fertilité, certains cancers, les risques de diabète de grossesse et de type II [1, 4].

Également, les personnes atteintes d'obésité se retrouvent bien souvent marginalisées. En plus d'un impact physiologique, l'obésité a un impact psychologique sur

les individus, pouvant affecter leurs cercles sociaux et économiques. Les préjugés auxquels ces personnes font face peuvent se traduire par des inégalités sociales en matière d'emploi, d'éducation et d'accès aux soins de santé [5]. Ils sont souvent alimentés par des stéréotypes répandus selon lesquels les personnes en surpoids seraient perçues comme paresseuses, peu motivées ou dépourvues de discipline sur leur hygiène de vie [1].

### Qu'en est-il de la perte de poids sur le long terme ?

Devant ces chiffres, on visualise mieux l'importance et le poids économique de l'obésité. On comprend également l'urgence de faire face à ce problème et de trouver des solutions accessibles et fonctionnelles sur le long terme. Malheureusement, il n'existe pas de remède miracle à l'obésité et peut nécessiter différentes interventions tout au long de la vie des personnes atteintes.

À ce jour, peu de choix de traitement s'offrent aux personnes atteintes d'obésité. Voici une liste de ces traitements classés en ordre de gravité de l'obésité (moins grave au plus grave) :

- En premier lieu, on retrouve en général les changements des habitudes de vie : amélioration du régime alimentaire et l'incorporation d'activité physique régulière. Bien que ces techniques soient prometteuses et entraînent des pertes de poids satisfaisantes, des données montrent que 80% des personnes qui perdent 5% de leur poids le reprennent d'ici 5 ans [1, 6].
- En second lieu, des interventions pharmaceutiques comme l'utilisation de médication favorisant la perte de poids peuvent être envisagées. Cependant, ces solutions peuvent être coûteuses et les risques liés à la prise de médicaments pour la perte de poids sont considérables (comme : risque de tumeur thyroïdienne, complication rénale et pancréatite) [7]. L'ensemble des traitements connus, incluant les célèbres sémaglutides (tel l'Ozempic), les tirzepadites et les liraglutides ne parviennent pas à éliminer la sensibilité au regain de poids chez les individus ayant souffert d'obésité. Comme le montre une étude portant sur les changements corporels et cardiovasculaires après l'arrêt de l'Ozempic, les patients reprennent les deux tiers du poids perdu lors de l'intervention pharmaceutique dans les 52 semaines suivantes [8].

- En dernier recours, la chirurgie bariatrique peut s'offrir à certains candidats admissibles. Malheureusement, la chirurgie bariatrique est coûteuse pour l'état et il n'est pas envisageable d'offrir cette intervention aux 7,3 millions de Canadiens atteints.

Tous ensemble, ces traitements ne sont pas suffisants pour éliminer définitivement l'obésité et ne garantissent pas le maintien d'un poids corporel sain, ce qui prouve l'impact important de l'obésité et justifie la poursuite de la recherche sur de nouvelles voies de traitements améliorant le poids et la santé globale.

### Où se situe le problème de l'obésité ?

L'obésité semble à première vue être un désordre périphérique qui pourrait être causé par des facteurs (autres que le mode de vie et la surconsommation alimentaire) comme la pollution [9], l'inflammation et la dysbiose du microbiote [10]. Pourtant, les preuves recueillies au cours des dernières décennies montrent de manière convaincante que l'obésité est avant tout une maladie du système nerveux central [11-16]. Ainsi, l'hypothalamus, responsable de nombreux processus homéostatiques inconscients, dont la régulation de la prise alimentaire est vite devenue la cible de nombreuses études portant sur la balance énergétique [13, 17-19]. C'est dans la région hypothalamique du Noyau Arqué, où se trouve le système de la mélanocortine, que la majorité des études se consacrent. Le système de la mélanocortine agit en tant que centre d'intégration des statuts énergétique de la périphérie [13-15, 17, 19]. Ce système est impliqué dans le contrôle de la consommation et de la dépense énergétique (homéostasie énergétique) ainsi que de l'homéostasie du glucose [13, 17]. Il s'agit donc du processus par lequel notre organisme est en mesure d'ajuster la prise alimentaire et la dépense énergétique afin de réguler le poids corporel de manière stable [15]. Un dysfonctionnement de cette fonction du système de la mélanocortine est connu pour causer l'obésité et entraîner des troubles de régulation du métabolisme comme l'hypertension et le diabète de type II [13, 17].

Sachant ceci, il devient pertinent de se pencher sur cette région du système nerveux afin de trouver des réponses aux questions soulevées concernant la prise de poids. Également, alors que la crise d'obésité ne parvient pas à être neutralisée, une meilleure

compréhension des changements moléculaires et physiologiques du « cerveau obèse » doit être atteinte.

Dans les prochaines sections, le rôle de l'hypothalamus dans l'intégration des signaux métaboliques et l'implication de ses populations neuronales seront abordés, en plus de détailler les conséquences de la malnutrition et/ou d'un stress métabolique sur ceux-ci.

### Régions du cerveau qui participe à la balance énergétique.

Biologiquement, l'appétit sert à assouvir un déficit calorique afin d'assurer la survie, mais la réalité de cet état motivationnel est plus complexe. Il est important de mettre la table en expliquant que la régulation du comportement alimentaire implique des circuits cérébraux anciens, étant optimisée pour performer dans un contexte de faible disponibilité alimentaire. Parmi ces circuits on retrouve ceux de la récompense et de la motivation [15] qui seront expliqués plus en détail ci-dessous. Cependant, l'évolution de ces circuits favorisant l'ingestion d'aliments riches en énergie dans des environnements où ces derniers étaient rares se retrouvent aujourd'hui sollicitée de façon excessive [15]. Notre cerveau n'est pas optimisé pour répondre à cette abondance nutritionnelle.

Ainsi, de nombreux éléments peuvent susciter l'envie de manger, mais cette envie ne correspond pas toujours à un besoin énergétique réel. Lorsqu'elle est motivée par le plaisir anticipé ou les propriétés gratifiantes de l'aliment, on parle alors d'appétit hédonique [15, 20].

### **L'appétit**

Traditionnellement, on distingue deux grands axes de l'appétit :

1. L'angle homéostasique, décrit un peu plus tôt, vise à maintenir un équilibre entre la dépense énergétique et les apports caloriques. Ce système est principalement régulé par l'hypothalamus et son système de la mélanocortine, qui intègrent des signaux périphériques pour ajuster la prise alimentaire [13, 16, 17].
2. L'angle hédonique, quant à lui, apprend à notre organisme à identifier les sources alimentaires les plus gratifiantes grâce au système de récompense [15, 20]. Ce système, implique notamment l'aire tegmentale ventrale (VTA) [15, 16], le noyau

accumbens (NAc) [15, 16] et l'hippocampe [21], et module le désir de manger en fonction du plaisir anticipé [15, 16, 20].

Ainsi, l'appétit hédonique ne repose pas sur un besoin énergétique. Sa régulation est bien plus complexe et prend en compte des aspects de « désir » et d'« appréciation » nutritionnelle, deux aspects qui sont fortement renforcés par la récompense.

La consommation d'aliments savoureux, souvent riche en graisse et en sucre, permet la relâche de neurotransmetteurs clés dans le système de la récompense. Dans la liste ci-dessous nous en citons les plus connus et les plus importants :

- la dopamine (DA) : favorise la récompense dite conditionnée face à des signaux externes tels que la vue, l'odeur et le goût, elle est centrale pour le « désir » de consommer un aliment [15, 16]. Une fois sécrétée hors des neurones du VTA, la DA est projetée vers le NAc et l'hippocampe [16].
- Les endocannabinoïdes : fortifient l'association entre le plaisir et la nourriture palatable et peuvent augmenter le désir d'en consommer davantage lors de l'ingestion [16]. Ils sont synthétisés à partir de nos réserves lipidiques et peuvent intervenir dans le système de la récompense en influençant l'« appréciation » en provenance de la nourriture palatable [16].
- La sérotonine (5-HT) : influence la durée de la prise alimentaire lors de la disponibilité de nourriture palatable [16]. Sa présence réduit la consommation alimentaire [16], ce qui laisse comprendre que l'humeur est aussi un facteur dans le système de la récompense.

### **La satiété**

La satiété est aussi un facteur important et complexe dans le maintien de la balance énergétique. Il s'agit d'un signal contraire à celui de l'appétit, qui informe l'organisme lorsque le déficit calorique est résolu [20]. La satiété peut également être influencée par différents facteurs autres que la prise alimentaire : le stress, une situation de danger ou bien encore l'anorexie peuvent tous induire à tort la satiété [20]. Cependant ces différents facteurs agissant sur la satiété ne seront pas abordés dans ce mémoire, nous portons une

attention plus particulière aux signaux métaboliques de celle-ci. Ainsi, pour ce mémoire, on distingue deux types de satiétés :

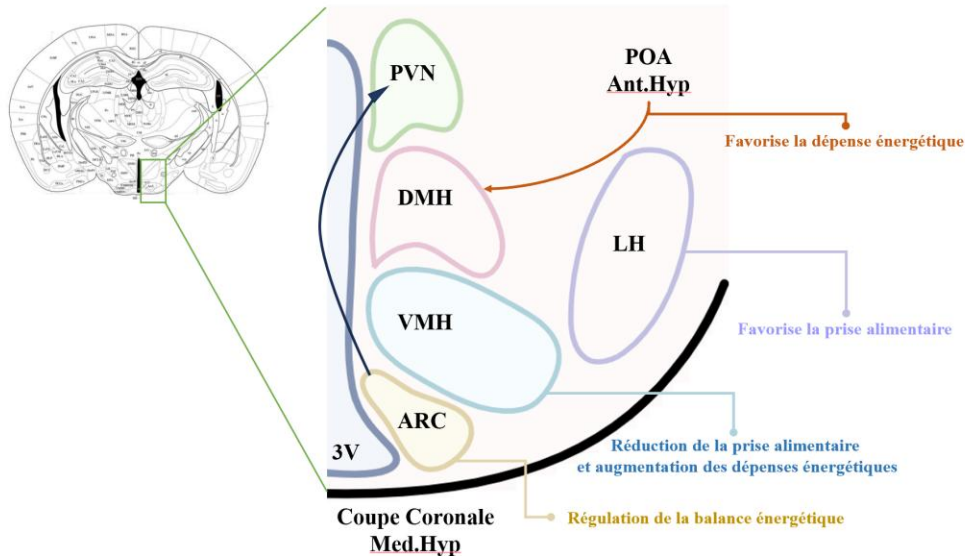
- La satiété rapide se produit lorsque l'estomac est plein à la suite d'ingestion d'aliment. L'information est transmise à partir de l'estomac et l'intestin grêle via les afférences du nerf vague vers le cerveau postérieur [22, 23].
- La satiété lente se produit à la suite de sécrétion hormonale en provenance des réserves de graisse des tissus adipeux vers la région du noyau arqué de l'hypothalamus [24] [20].

Ces deux aspects sont régulés par le cerveau, mais c'est l'hypothalamus qui reçoit principalement les signaux de la satiété lente.

### **L'hypothalamus**

L'hypothalamus est une région complexe du cerveau qui se divise en de nombreux noyaux, abritant des populations neuronales hétérogènes et responsables de diverses fonctions, rendant cette région multifonctionnelle. En effet, l'hypothalamus est connu pour réguler plusieurs fonctions homéostatiques inconscientes, telles que la régulation de la température corporelle, la reproduction, la réponse au stress, l'éveil, la soif et l'appétit, en plus de participer à plusieurs fonctions endocriniennes en collaboration avec l'hypophyse [13, 25].

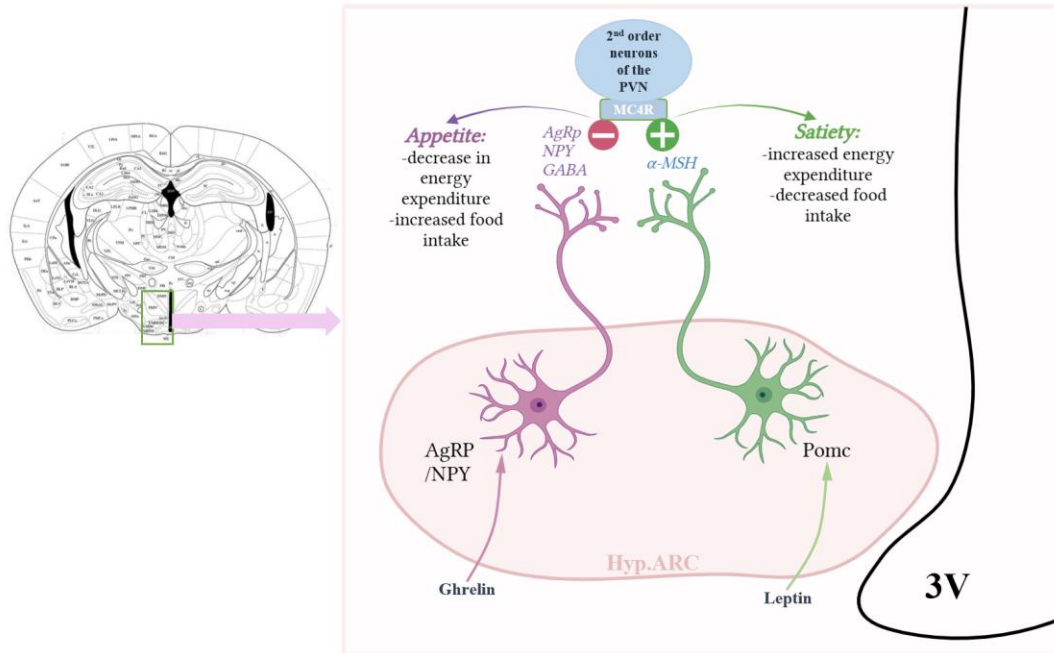
Bien que notre recherche s'intéresse en particulier à la région du Noyau Arqué, ce dernier ne travaille pas seul. D'autres régions hypothalamiques travaillent de concert avec le Noyau Arqué afin de réguler la balance énergétique (voir **figure 1**). Nous verrons dans la section suivante un aperçu des différents noyaux hypothalamiques, leur rôle dans la prise alimentaire et la dépense énergétique et s'il y a lieu, leur relation avec le Noyau Arqué.



**Figure 1:** Vue d'ensemble sur les différents noyaux hypothalamiques et leur rôle dans l'homéostasie du métabolisme.

Légende : adaptation de la revue de *Tran, L.T et al. 2022[26]*, afin de simplifier la compréhension au sujet de ce mémoire. Définitions des abréviations : 3V, troisième ventricule; ARC, noyau arqué de l'hypothalamus; VMH, noyau ventromédian de l'hypothalamus; DMH, noyau dorsomédian de l'hypothalamus; PVN, noyau paraventriculaire de l'hypothalamus; LH, noyau latéral de l'hypothalamus; POA, noyau préoptique de l'hypothalamus, ce dernier se trouve au niveau antérieur de l'hypothalamus (Ant.Hyp) et n'est donc pas un noyau médial de l'hypothalamus (Med.Hyp). Les flèches représentent les connexions entre certains noyaux impliqués afin dans la réponse sur la balance énergétique.

La région du Noyau Arqué hypothalamique (ARC) : région médiobasale de l'hypothalamus qui abrite une population de neurones hétérogènes responsables de la balance énergétique et de la régulation du poids corporel. Parmi ces neurones, on retrouve les neurones Proopiomélanocortine (Pomc), responsables d'induire la satiété [15, 27, 28], ainsi que les neurones Agouti-related protein et les neurones exprimant le neuropeptide Y (Agrp/Npy), responsables de l'augmentation de l'appétit [11, 12, 15, 28, 29] . Ensemble, ce réseau de neurones forme ce que l'on nomme le système de la mélanocortine [15] . Ce système tient son nom des récepteurs à la mélanocortine, situé dans le PVN de l'hypothalamus et qui sont la cible de population neuronale du noyau arqué. Ce système sera abordé plus en détail lorsque nous présenterons les effets combinés des neurones Pomc et Agrp sur le PVN.



**Figure 2** : Schématisation du système de la mélanocortine chez la souris.

Légende : représentation simplifiée des neurones de la faim AgRP/NPY et de la satiété Pomc et de leur effet sur les neurones de 2<sup>e</sup> ordre au niveau du PVN, lorsque l'un ou l'autre est activé par son signal respectif.

Le noyau ventro-médian de l'hypothalamus (VMH) : région de l'hypothalamus qui est au centre de plusieurs fonctions endocriniennes, dont la régulation du glucose, la thermogenèse, la régulation du poids corporel ainsi que les comportements sociaux et sexuels [30].

L'importance du VMH dans la régulation homéostatique du poids corporel a été démontré en 1942 par *Hetherington A.W & Ranson S.W* [31], par la réalisation de lésion chirurgicale de plusieurs régions hypothalamiques, dont le VMH chez des rats. Les auteurs sont venus comparer les effets des lésions hypothalamiques sur la prise alimentaire, le poids corporel et le comportement en général. Leurs résultats montrent que les lésions au niveau du VMH induisent un comportement hyperphagique extrême ainsi qu'un gain de poids causant l'obésité comparativement aux autres lésions hypothalamiques [31].

Des études plus récentes menées par *Dhillon, H et al. (2005)* sur des souris K.O. pour le facteur stéroïdogénèse-1 (SF1), un gène important dans le développement du VMH, confirme les premières observations : les souris K.O. qui n'ont pas développé de VMH ont une accumulation d'adipocytes causant l'obésité [32]. Ces résultats soulignent l'importance

du VMH à contrer les effets d'un régime obésogène en réduisant la prise alimentaire et en augmentant la dépense énergétique [30]. Finalement, le VMH interagit avec les neurones Pomc de l'ARC pour agir sur la prise alimentaire. Lors de la consommation d'aliment, les neurones du VMH sécrètent du glutamate vers les neurones Pomc, ce qui les active et favorise l'arrêt de la consommation alimentaire [33].

Le noyau dorsomédian de l'hypothalamus (DMH) et le noyau préoptique de l'hypothalamus (POA) : le DMH joue un rôle crucial dans l'augmentation de la thermogénèse corporelle en réponse à la leptine et à l'apport alimentaire [34]. Il est connu que les neurones du DMH reçoivent des projections du POA, participant à la thermogénèse et favorisant la dépense énergétique par la conversion d'adipocytes blancs en adipocytes bruns [26] [35]. Ces régions de l'hypothalamus sont moins étudiées pour leur rôle sur l'obésité, toutefois, les neurones Gabaergique du DMH inhibent les neurones Pomc de l'ARC en situation de déficit calorique, ce qui favorise la prise alimentaire [36].

Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) : ce site est bien connu dans la littérature pour intégrer les signaux de multiples régions hypothalamiques.

En effet, le PVN est le point culminant de plusieurs projections des noyaux hypothalamiques impliqués dans la balance énergétique, incluant les projections en provenance des neurones de la faim (Agrp/Npy) et de satiété (Pomc) de l'ARC [18, 19]. Lorsque les neurones positifs aux récepteurs Mc4R du PVN (PVN<sup>Mc4R+</sup>) sont activés par les neurones Pomc de l'ARC, les efférences sont le tractus solitaire, le noyau moteur dorsal vague ainsi que le système sympathique de la moelle épinière [18, 19], ce qui engendre une réduction de la consommation alimentaire [18, 19] et une augmentation des dépenses énergétiques [18, 19] en augmentant la thermogénèse et la fréquence cardiaque [19]. À l'inverse, lorsque le PVN reçoit une forte signalisation en provenance des neurones Agrp/Npy de l'ARC, il en résulte d'une baisse des dépenses énergétiques et d'un comportement hyperphagique par l'inhibition des neurones PVN<sup>Mc4R+</sup>.

À première vue, il semble que le PVN ait une action sur le métabolisme en obéissant qu'aux neurones de l'ARC hypothalamique. Cependant, le neuropeptide Ocytocine, sécrété par les neurones du PVN, a aussi une action sur la balance énergétique [37-39]. Il est connu

que l'administration d'ocytocine directement dans le PVN diminue la consommation alimentaire et réduit la prise de poids [39]. De plus, l'ablation spécifique des neurones à ocytocine réduit la dépense énergétique et conduit à une prise de poids marquée sous régime riche en graisses, sans modification de l'apport alimentaire, alors que ces effets ne sont pas observés chez les animaux sous régime standard [37]. Ces observations suggèrent que les neurones à ocytocine du PVN sont cruciaux pour adapter le métabolisme aux excès nutritionnels, en particulier pour contrer les effets délétères d'une diète hyperlipidique [37].

Le noyau latéral de l'hypothalamus (LH) : connu aussi sous le nom du centre de la consommation alimentaire, l'activation neuronale de cette région occasionne, comme son surnom l'indique, la prise alimentaire [18].

On retrouve dans le LH des projections en provenance des neurones Npy de l'ARC. Ces terminaisons stimulent les neurones Orexine-A et B en plus des neurones positifs au récepteur Y5, afin de stimuler l'appétit et la prise alimentaire [15, 18].

L'hypothalamus et le système de la mélanocortine : intégration des différents signaux métaboliques périphériques pour réguler les dépenses énergétiques.

L'hypothalamus est responsable de l'intégration des signaux de la périphérie, que ceux-ci soient hormonaux ou métaboliques, l'informant entre autres sur l'état nutritionnel afin qu'il puisse diriger une réponse adaptée aux statuts énergétiques [40]. Plus particulièrement, l'ARC hypothalamique, qui contient les neurones de la satiété Pomc et de l'appétit Agrp, se trouvant au bord ventromédial du troisième ventricule, est bien situé pour recevoir ces signaux de par sa proximité avec la zone «poreuse» de la barrière hématoencéphalique [41].

Les principaux signaux hormonaux de la périphérie, reçus par les neurones Argp et Pomc, proviennent de l'estomac, par la sécrétion de la ghréline [15, 21], ou bien des adipocytes, par la leptine [15, 42]. Ces hormones traversent la barrière hématoencéphalique pour agir en tant que régulateurs de l'homéostasie du métabolisme au sein du noyau ARC de l'hypothalamus [40].

La ghréline est une hormone gastro-intestinale qui signale un déficit calorique avant un repas et cesse lors de l'ingestion alimentaire [15, 29, 43]. La leptine quant à elle est une hormone peptidique sécrétée par les adipocytes [42] afin de signaler la fin du déficit calorique [43, 44]. Le niveau circulant de leptine est ainsi proportionnel à la masse adipocytaire et sa sécrétion est également associée à une réponse sur le statut nutritionnel, car ses niveaux augmentent graduellement à la suite de la prise alimentaire [42]. Ainsi la leptine est considérée comme étant une hormone responsable de conserver la masse grasseuse à son *statu quo*.

Les neurones Agrp sont activés par le signal de la ghréline [29, 43]. L'activation de ces neurones augmente l'appétit et diminue les dépenses énergétiques [43]. Les neurones Agrp tirent leur nom du peptide qu'ils relâchent au niveau du PVN : la protéine *agouti*. Ce peptide est un antagoniste des récepteurs Mc4R présents dans les neurones du PVN. De plus, les neurones Agrp libèrent aussi d'autres neurotransmetteurs et neuropeptides: le *neuropeptide Y* (Npy), et le *γ-aminobutyric acid* (Gaba), qui ont des effets similaires sur l'augmentation de l'appétit et la diminution des dépenses énergétiques [45]. Les neurones du PVN ciblés par Npy et Gaba sont variés, mais les circuits impliqués sont encore peu définis.

Ainsi la ghréline sécrétée par l'estomac lors du jeûne, hausse l'activité des neurones Agrp pour favoriser une balance énergétique positive en rehaussant l'appétit et en diminuant les dépenses énergétiques [15, 21, 29, 43]. À l'inverse, la leptine sécrétée par le tissu adipeux de manière proportionnelle à sa taille [42] inhibe les neurones Agrp [43, 44].

De façon contraire, les neurones de satiété Pomc sont quant à eux actifs lorsque la leptine agit sur ses récepteurs à sa surface. L'hormone est libérée dans la circulation sanguine après un repas afin de signaler le rétablissement du déficit calorique en induisant la satiété [13, 20, 29], par la libération d'un agoniste pour les récepteurs Mc4R se trouvant dans la région du PVN, l'*α-melanocyte-stimulating hormone* ( $\alpha$ -Msh) [14]. Dans les sections suivantes, nous allons voir plus en détail le fonctionnement des neurones Pomc.

Sommairement, les neurones Pomc et Agrp hypothalamiques ont des projections vers d'autres régions de l'hypothalamus en dehors du noyau ARC, dans le noyau paraventriculaire hypothalamique (PVN), en plus d'avoir des projections vers les neurones des ganglions sympathiques de la moelle épinière [40]. Ce réseau de neurones cible les

neurones positifs pour le récepteur de la mélanocortine-4 (Mc4R) du PVN [28]. Les deux groupes de neurones ont un effet contraire sur cette même cible afin de réguler la dépense énergétique et la prise alimentaire, selon les signaux perçus en provenance de la périphérie (voir **figure 2**).

#### Les neurones non-Agrp/Npy et non-Pomc de l'ARC :

Au-delà des neurones Pomc et Agrp/Npy de l'hypothalamus, l'ARC abrite d'autres populations neuronales jouant un rôle dans l'homéostasie et la balance énergétique.

Parmi ces neurones se retrouvent des neurones Gabaergiques (Gaba) sensibles à la leptine, mais bien distincts des neurones Agrp, des neurones dopaminergiques Tubéro infundibulaires (TiDa) qui contrôlent la sécrétion pituitaire de la prolactine, ainsi que des neurones Kisspeptine (Kiss1), responsables de la régulation de la fertilité [46]. Bien que les TiDa et les Kiss1 soient principalement impliqués dans la fertilité, leur rôle dans la balance énergétique n'est pas à négliger puisque le métabolisme a besoin de s'ajuster afin de permettre la croissance d'un organisme. Les paragraphes suivants vont servir à décrire le rôle de ces neurones hypothalamiques et leur relation avec la balance énergétique :

#### **Les neurones Gabaergiques :**

Les neurones Gabaergiques du noyau arqué (ARC) exercent un rôle complexe dans la régulation de la balance énergétique. Si les neurones Agrp, qui co-expriment avec Gaba, ont un effet clairement orexigène en stimulant la prise alimentaire [45], d'autres neurones Gabaergiques, notamment ceux exprimant vGat (transporteur vésiculaire du Gaba), semblent plutôt exercer un effet anorexigène [47]. Cette diversité fonctionnelle souligne l'importance de distinguer les sous-populations de neurones Gabaergiques au sein de l'ARC.

L'activation des neurones vGat de l'ARC est nécessaire pour freiner l'hyperphagie et la prise de poids. En effet, la délétion des récepteurs à la leptine (LepR) dans cette population mène à une augmentation marquée de la prise alimentaire et du poids corporel [48]. Bien que les neurones Agrp et Pomc soient reconnus comme des cibles de la leptine, leur seule implication ne suffit pas à expliquer l'ensemble des effets métaboliques de cette hormone. En effet, la suppression de LepR uniquement dans ces neurones ne reproduit pas

le phénotype obèse des souris complètement déficientes en leptine [48, 49]. En revanche, les neurones vGat exprimant LepR sont essentiels à cette réponse : ils représentent donc une population de neurones Gabaergiques sensibles à la leptine, agissant comme neurones de premier ordre dans la détection de ce signal anorexigène [48].

### **Les neurones Kiss1 :**

Les neurones Kiss1 de l'ARC sont connus principalement pour leur action sur l'hormone lutéinisante, participant ainsi à la régulation de la fertilité [46]. Cependant, cette population neuronale est également activée par les signaux de la leptine et de l'insuline lors de la prise alimentaire [50]. Une fois activés par ces hormones, les neurones Kiss1 de l'ARC activent les neurones de la satiété Pomc et inhibent les neurones de l'appétit Agrp [50]. De plus, Kiss1 envoie des projections directement au PVN où ils favorisent la satiété, en plus de projections au DMH, où ils participent à l'augmentation des dépenses énergétiques par l'activation de la thermorégulation [50].

### **Les neurones TiDa :**

Les neurones TiDa de l'ARC sont principalement impliqués dans la régulation de la prolactine pour le processus de la lactation [46, 51]. Toutefois, les neurones TiDa sont dopaminergiques et la libération de dopamine est connue pour jouer un rôle dans le système de la récompense, la motivation et les mouvements [46, 51]. Bien qu'indirects, ces neurones ont un rôle dans la régulation de la balance énergétique en renforçant le sentiment de plaisir lié à la consommation de nourriture (l'appétit hédonique) [15, 16].

### Effets combinés des neurones Pomc et Agrp sur le PVN :

De plus en plus d'études se penchent sur le rôle des neurones Pomc et Agrp en tant que groupe de neurones interagissant de manière collaborative.

Jusqu'à maintenant la majorité des études menées sur les circuits hypothalamiques Agrp et Pomc étaient réalisées en isolant soit le circuit de l'appétit Agrp, soit le circuit de la satiété, Pomc. Ainsi, il n'était pas possible de savoir si ce groupe de neurones travaille

individuellement ou de façon simultanée afin d'intégrer et de relayer les signaux de la périphérie.

Une étude menée par *De Solis et al. (2024)* a utilisé un modèle murin exprimant des récepteurs DREADD pour moduler chimiogénétiquement les neurones hypothalamiques *Agrp* et *Pomc* à l'aide du Clozapine-N-oxide (CNO) [52]. L'activation des neurones *Agrp* couplée à l'inhibition simultanée des neurones *Pomc* a induit une prise alimentaire et une prise de poids cohérentes avec le phénotype observé chez des souris nourries avec une diète riche en gras et en sucre [52]. Cette manipulation démontre une interaction réciproque entre ces deux types neuronaux, et met en évidence que le contrôle de la balance énergétique repose sur les effets additifs et opposés de ces deux populations [52]. Par ailleurs, l'étude a aussi révélé un rôle coordonné des neurones *Agrp* et *Pomc* dans la régulation de la production de glucose hépatique en condition de jeûne. L'inhibition isolée des neurones *Pomc* provoque une augmentation rapide du glucose hépatique [52]. Cependant, cet effet est atténué lorsque les neurones *Agrp* sont activés en parallèle, suggérant que ces deux types neuronaux interagissent pour moduler la réponse hépatique de manière non linéaire, différente de l'effet de leur modulation individuelle [52].

Une deuxième étude réalisée par *Zhang SX, et al. (2024)*, s'est intéressé à comment la transmission des neuropeptides de la faim (*Npy*) et de la satiété ( $\alpha$ -*Msh*) s'intègre dans la signalisation cellulaire pour exercer leur contrôle sur la balance énergétique et la consommation alimentaire [53]. Les chercheurs ont montré que la stimulation des neurones *Agrp* de l'ARC vers le PVN provoque la libération de *Npy*, ce qui entraîne des diminutions de cAMP dans les neurones en aval exprimant le récepteur *Mc4R* du PVN, menant à une diminution de leur activité sur la promotion de la satiété [53].

En parallèle, la stimulation des neurones *Pomc* de l'ARC vers le PVN déclenche des augmentations de cAMP dépendantes de l' $\alpha$ -*Msh*, dans les neurones positifs au récepteur *Mc4r*, ce qui encourage la satiété [53].

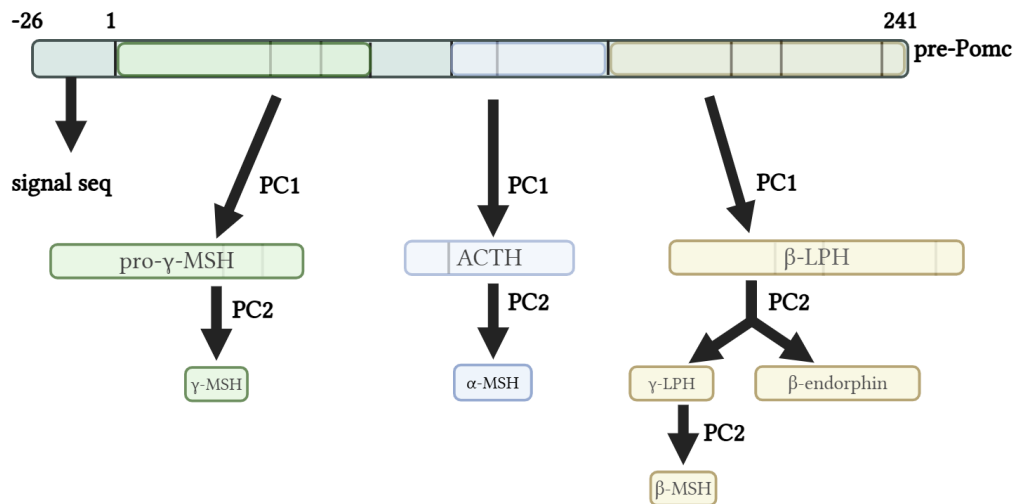
Ainsi, ils ont conclu que *Npy* et  $\alpha$ -*Msh* contrôlent le cAMP des neurones *Mc4R+* de manière compétitive afin de réguler la consommation alimentaire [53].

## II. L'obésité et les neurones Pomc

Un stress métabolique prolongé, tel que l'obésité, peut induire une dysfonction des différents circuits homéostatiques et donc nuire à la régulation du poids corporel par un déséquilibre dans la régulation métabolique. Plus particulièrement, les neurones Pomc hypothalamiques sont très susceptibles d'être affectés par un stress métabolique prolongé [28, 54-56]. Certaines études observent même une disparition de 25% à 50% de ces neurones, et ce, spécifiquement dans des conditions de stress métabolique prolongé [55-57], nous y reviendrons plus en détail dans la section **II : résultats contradictoires**.

Mais avant de plonger dans le cœur du sujet des neurones Pomc et de l'obésité, voyons d'abord les fonctions liées à l'activité de ces neurones en définissant leur expression peptidique ainsi que les lieux d'expression de ceux-ci. Je propose donc de débiter par un survol du tableau fonctionnel des neurones Pomc en passant par leurs développement et maturation puis de terminer par l'effet d'un stress métabolique chronique sur ceux-ci.

Accent sur les neurones Pomc :



**Figure 3** : Simplifications des séquences de clivage du neuropeptide Pomc.

Légende : figure adaptée et simplifiée à partir du schéma offert par *Christine G. Joseph (2004)[58]*, afin de mettre en valeur l'essentiel pour la compréhension de ce mémoire. Définitions des abréviations : MSH, melanocyte stimulation

hormone; ACTH, adrenocortiotropic hormone; Pomc, Pro-opiomelanocortin; LPH, lipotropic hormone; PC, prohormone convertases.

Le neuropeptide Pomc est un long peptide fait de 267 acides aminés [58]. Lorsque le peptide est sécrété hors du neurone, celui-ci est clivé par l'action de 2 enzymes, les prohormones convertases 1 et 2 (PC1 et PC2, voir **figure 3**) [59]. Le clivage du neuropeptide Pomc permet la libération de nombreux peptides plus courts avec des fonctions différentes et la génération de certains de ces peptides dépend des tissus dans lesquels ils sont sécrétés (voir **tableau 1**) [60-62].

Parmi les peptides générés à la suite du clivage de Pomc par PC1 et PC2, on retrouve entre autres : l'adrénocorticotrophine (Acth), l' $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -Msh), la  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\beta$ -Msh), la  $\gamma$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\gamma$ -Msh) et la  $\beta$ -endorphine [63]. Plus particulièrement, au sein de l'hypothalamus, le neuropeptide Pomc est d'abord clivé en Acth par PC1, puis est clivé une seconde fois par PC2 pour produire  $\alpha$ -Msh (voir **figure 3**) [62].

De façon plus intéressante pour ce mémoire, c'est la portion  $\alpha$ -Msh du long peptide Pomc qui est capable de se lier avec les récepteurs Mc4r du noyau paraventriculaire afin d'avoir une action sur la satiété et la dépense énergétique.

Il est donc important de comprendre que la région dans laquelle Pomc est sécrétée influencera sa fonction. En effet, le neuropeptide Pomc n'est pas seulement exprimé dans l'ARC hypothalamique des mammifères, mais aussi dans une variété d'autres tissus, lui conférant un clivage et une fonction différente [64]. Voici une liste des différents endroits où l'on retrouve le neuropeptide Pomc et ses peptides mélanocorticoïdes dérivés en plus d'une brève description de leur fonction [64]:

Peptides dérivés	Tissus	Fonction(s)
------------------	--------	-------------

$\alpha$ -Msh	Estomac-Reins-Intestins-Ovaires- Testicules-Placenta-Glandes surrénales-Pancréas-Peau-Système nerveux central (ARC hypothalamique- Zona incerta hypothalamique- noyau du faisceau solitaire du tronc cérébral)	Signalisation paracrine Pigmentation de la peau Diminution de la prise alimentaire
$\beta$ -Msh	Hypothalamus	Diminution de la prise alimentaire (controversé)
$\gamma$ -Msh	Glandes surrénales- Neurones des intestins- Système nerveux central	Hypertension Réactions immunes
Acth	Hypophyse - Peau-Adipocytes- Lymphocytes	Augmentation de glucocorticoïdes dans le sang Contrôle du rythme circadien Pigmentation de la peau Lipophyse
$\beta$ -endorphine	ARC de l'hypothalamus - Éminence médiane de l'hypothalamus - Bordure ventromédiale du 3 <sup>e</sup> ventricule de l'hypothalamus	Ligand pour les récepteurs opioïdes Analgésique Rôle dans les fonctions reproductrices (inhibition de la gonadotrophine) Production de prolactine Rôle bidirectionnel dans la balance énergétique

**Tableau 1** : Sommaire des peptides dérivés du clivage de Pomc selon les tissus et de leurs fonctions.

Légende : adaptations à partir de la lecture de l'article par *Erika Harno, et al. (2018)*[64].

## **Les neurones Pomc: leur développement et leurs facteurs identitaires principaux**

Le contrôle transcriptionnel du développement et des fonctions des neurones de l'ARC fait l'objet de nombreuses études. Jusqu'à ce jour, plusieurs gènes ont été identifiés dans ce processus. Dans notre projet, nous nous intéressons plus particulièrement aux gènes régulateurs du développement et du maintien des neurones Pomc.

Les progéniteurs neuronaux de l'ARC tirent leur origine de la zone ventriculaire de l'hypothalamus (HVZ) et il est possible d'identifier les neurones Pomc à partir du jour embryonnaire 10,5 [28]. Entre les jours 16.5 à 18 du développement embryonnaire, les progéniteurs neuronaux ont migré et se sont différenciés de façon à former les différents noyaux hypothalamiques [65]. Tout au long de la maturation des neurones Pomc, plusieurs facteurs transcriptionnels seront impliqués dans leur développement adéquat. Nous verrons dans cette section, les rôles principaux de ces différents facteurs.

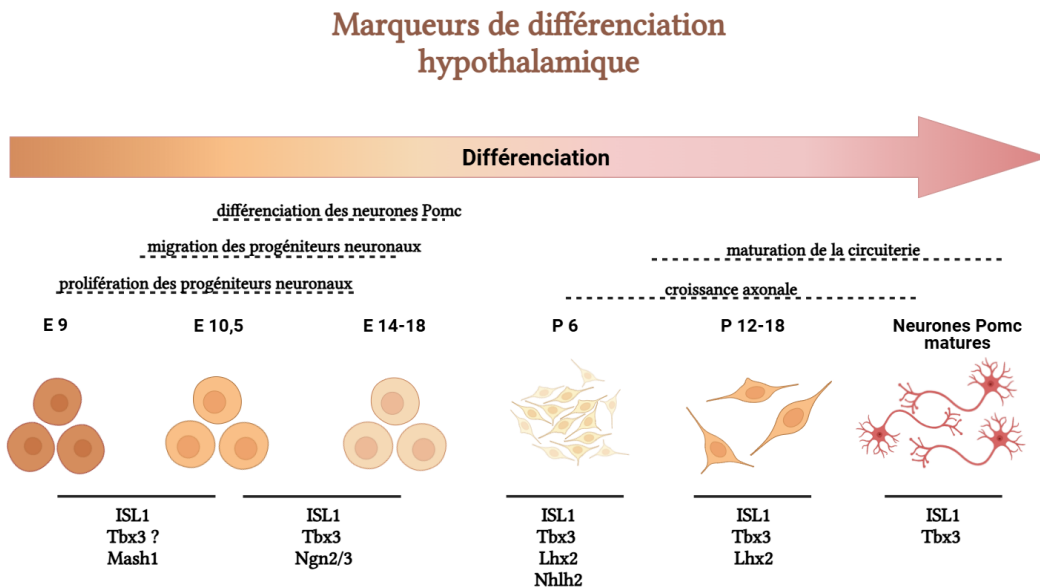
### **- *Tbx3***

Lors de travaux récents réalisés par *Quarta, C., et al. (2019)*, il fut démontré que le facteur transcriptionnel T-BOX3 (*Tbx3*) est particulièrement important pour la maturation finale des neurones hypothalamiques de l'ARC lors du développement, mais également nécessaire pour le maintien de leurs fonctions et l'expression des neuropeptides fonctionnels à l'âge adulte [66]. Chez la souris, les chercheurs ont démontré que la perte de l'expression de *Tbx3* lors du développement entraîne une perte importante du nombre de neurones Pomc, une intolérance au glucose, en plus d'induire l'obésité [66].

Pour comprendre l'origine de cette réduction du nombre de neurones Pomc, ils ont étudié la génération des neurones Pomc chez les souris dépourvues de *Tbx3* au stade embryonnaire. À ce stade, le nombre de neurones positif pour Pomc était comparable à celui des souris sans délétion de *Tbx3* [66]. En revanche, un suivi postnatal a révélé une perte progressive de l'identité Pomc, sans pour autant qu'il y ait une mort cellulaire des neurones [66]. Ces résultats indiquent que l'absence de *Tbx3* induit une reprogrammation identitaire postnatale des neurones Pomc. Afin de déterminer si ce phénomène pouvait également se produire chez l'adulte, les chercheurs ont supprimé l'expression de *Tbx3* dans l'hypothalamus à l'aide d'une approche virale. Ils ont alors observé une perte identitaire similaire des neurones Pomc, accompagnée d'une hyperphagie et du développement de

l'obésité [66]. Ainsi, la disparition des neurones Pomc consécutive à la perte de *Tbx3* ne reflète pas une perte neuronale, mais plutôt une altération de l'identité moléculaire de ces neurones, notamment à travers une dérégulation de l'expression des gènes neuronaux du système de la mélanocortine [66]. Ces résultats suggèrent que *Tbx3* joue un rôle clé non seulement dans la différenciation des neurones de la satiété, mais également dans le maintien de leur identité postmitotique à l'âge adulte [66].

Évidemment, il n'y a pas que *Tbx3* qui est important dans la direction des progéniteurs neuronaux de Pomc. D'autres facteurs transcriptionnels tels que *Ngn2/3*, *Mash1*, *Isl1*, *Nhlh2*, *Lhx2* sont également impliqués à différents moments du développement et du maintien des neurones hypothalamiques. Dans les sections suivantes, nous verrons avec un peu plus de détails le rôle principal de ces facteurs auprès des neurones Pomc. Ensemble, ces facteurs sont tous responsables de l'identité des neurones Pomc hypothalamique à différents stades de sa différenciation/croissance cellulaire (voir figure 4).



**Figure 4:** Expression des différents marqueurs de différenciation hypothalamiques des neurones Pomc selon les différents stades du développement neuronal, chez la souris.

Légende : Schéma inspiré de development of Pomc neurons, Toda C., et al., 2017[28]. Définitions des abréviations : E, jour embryonique; P, postnatal; Isl1, insulin enhancer protein coding gene; tbx3, T-box transcription factor 3; Mash1, pro-neural gene; Ngn2/3, neurogenine 2 et 3; Lhx2, Lim homeobox 2; Nhlh2, Nescient Helix-Loop-Helix 2.

### *Neurogenine 2 et neurogenine 3 (Ngn2/3)*

*Ngn2* est un excellent marqueur de différenciation neuronale, son expression peptidique induit la différenciation de neurones à partir de cellules souches pluripotentes et s'exprime assez tôt dans le développement neuronal (E10,5) [67]. *Ngn3* joue un rôle central dans la différenciation des neurones hypothalamiques Pomc en inhibant la différenciation des neurones Agrp/Npy dans l'ARC, ainsi ce dernier est particulièrement critique pour la direction des neurones Pomc lors de leur maturation [68].

### ***Mash1***

Le gène *Mash1* est exprimé au stade précoce de la différenciation neuronale hypothalamique [69]. L'expression de ce gène n'est pas directement requise pour l'expression du neuropeptide Pomc [69]. Cependant, les souris déficientes pour *Mash1* présentent une diminution marquée du nombre de neurones Pomc matures, suggérant que *Mash1* agit en amont dans la cascade de différenciation neuronale [69].

### ***Isl1***

*Isl1* est un facteur de transcription important pour la différenciation terminale des neurones Pomc [70]. Ce gène est requis pour l'expression Pomc au stade embryonnaire chez la souris en plus d'être requis pour son expression à l'âge adulte [70]. L'équipe de *Nasif S., et al. (2015)* a évalué le rôle fonctionnel d'*Isl1* dans les neurones Pomc. En utilisant un modèle murin avec inactivation conditionnelle d'*Isl1* dans les neurones Pomc, les auteurs ont montré que la suppression d'*Isl1* entraîne une réduction significative de l'expression hypothalamique de Pomc sans affecter l'expression dans l'hypophyse, indiquant un rôle spécifique pour *Isl1* dans les neurones hypothalamiques [70]. Sur le plan physiologique, ces souris développent une hyperphagie et une obésité, soulignant l'importance d'*Isl1* dans le maintien de l'identité et de la fonction des neurones Pomc [70].

### ***Nhlh2***

*Nhlh2* est un facteur de transcription présent spécifiquement dans les neurones Pomc de l'ARC hypothalamique [68] et permet l'expression de PC1, l'enzyme responsable de cliver la protéine Pomc en  $\alpha$ -Msh, son absence affecte ainsi la biodisponibilité [28, 68].

Des études réalisées par *Coyle et al., 2002*, et par *Good et al., 1997* ont montré que les souris déficientes en *Nhlh2* développent de l'obésité à l'âge adulte [71, 72]

### ***Lhx2***

*Lhx2* est un facteur de transcription qui régule la différenciation cellulaire et la croissance axonale dans diverses régions du cerveau, y compris l'hypothalamus [73]. Bien qu'une étude réalisée par *Salvatierra J., et al. (2014)*, montre que *Lhx2* n'est pas directement impliqué dans l'expression de *Pomc*, la perte de celui-ci dans la région hypothalamique cause une altération de sa structure et la région de l'ARC se retrouve comprimée au niveau ventral [74]. Ainsi, *Lhx2* est important pour le développement d'un environnement adéquat à la différenciation neuronale hypothalamique, y compris les neurones *Pomc* [74].

### Effets du stress métabolique sur les neurones *Pomc* :

L'obésité induit un stress métabolique et est souvent associée à de la neuroinflammation, connue dans la littérature pour affecter particulièrement l'hypothalamus [55, 56, 75], en plus d'autres régions telles que l'hippocampe et l'amygdale [76]. Sachant ceci, il est intéressant de se pencher sur les divers métabolites responsables de causer de l'inflammation, en plus de comment ces derniers pourraient affecter les neurones. Différentes cellules du système nerveux central sont capables d'induire de la neuroinflammation lorsqu'elles sont activées : on parle ici des cellules immunitaires du cerveau, telles que les astrocytes [75] et les microglies [56, 75]. De concert avec les microglies, certains organites cellulaires sont aussi capables de causer de l'inflammation tels que les lysosomes et les mitochondries [56].

Lorsque la neuroinflammation résulte d'un stress métabolique, plutôt que d'un agent infectieux, elle provoque un stress mitochondrial chez les neurones de la satiété, ce qui souligne l'importance d'examiner le rôle de ces organites [55, 56].

### **Mitochondries et neuroinflammation**

Il a été reporté qu'une alimentation hypercalorique favorise l'activation microgliale, permettant de relâcher des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  [56]. Chez la souris soumise à une diète obésogène de longue durée, il fut démontré que l'activation microgliale est persistante et l'activité des neurones Pomc est réduite [55]. Il est connu que le facteur pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ , en provenance des microglies, stimule la fusion mitochondriale des neurones Pomc, en plus de la production d'ATP, pouvant pousser le neurone dans un état de demande énergétique trop important [56]. Lors d'une condition de DIO (diète induisant l'obésité), la stimulation de TNF- $\alpha$  devient constante, causant une demande énergétique chronique aux neurones par l'augmentation de l'activité des mitochondries [56].

De façon plus indépendante, les mitochondries de l'ensemble du corps sont également responsables de réactions inflammatoires par la production de réactif d'oxygène (ROS). L'excès de ROS est connu pour favoriser une accumulation de masse adipeuse favorisant l'apparition du diabète de type II [77]. Plus particulièrement, au niveau des neurones Pomc de l'ARC, l'activité des neurones est fortement liée à la dynamique mitochondriale, qui est importante afin de maintenir la balance énergétique et l'homéostasie du glucose sous l'effet de stress métaboliques [78, 79].

Une étude réalisée par *Kang, G.M., et al. (2021)*, portant sur l'impact du stress mitochondrial sur l'efficacité des neurones Pomc, dévoile qu'une mutation homozygote pour *Crif1*, une protéine mitoribosomale qui coordonne l'insertion de protéine mitochondriale dans la chaîne de transport des électrons, induit l'obésité chez la souris en plus d'une dérégulation importante du glucose [77]. La principale cause de cette interruption de l'activité de Pomc serait par la perte de production d'ATP, qui sur le long terme peut mener à la mort cellulaire [77]. Avec cette découverte, les chercheurs ont été en mesure de confirmer qu'un stress mitochondrial est aussi capable d'affecter la productivité des neurones Pomc et de faire apparaître le phénotype obèse. Par la suite, les mêmes chercheurs se sont penchés sur l'expression du neuropeptide Pomc lors de mutation pour *Crif1*. Il est important de se rappeler que le neuropeptide Pomc est un long peptide qui a besoin d'être clivé afin d'être en mesure d'interagir avec ces récepteurs sur ses cellules cibles (**figure 2**). Plus particulièrement, dans le contexte homéostatique, c'est la portion  $\alpha$ -Msh qui transmet le « message » de la satiété aux neurones secondaires. Avec leurs

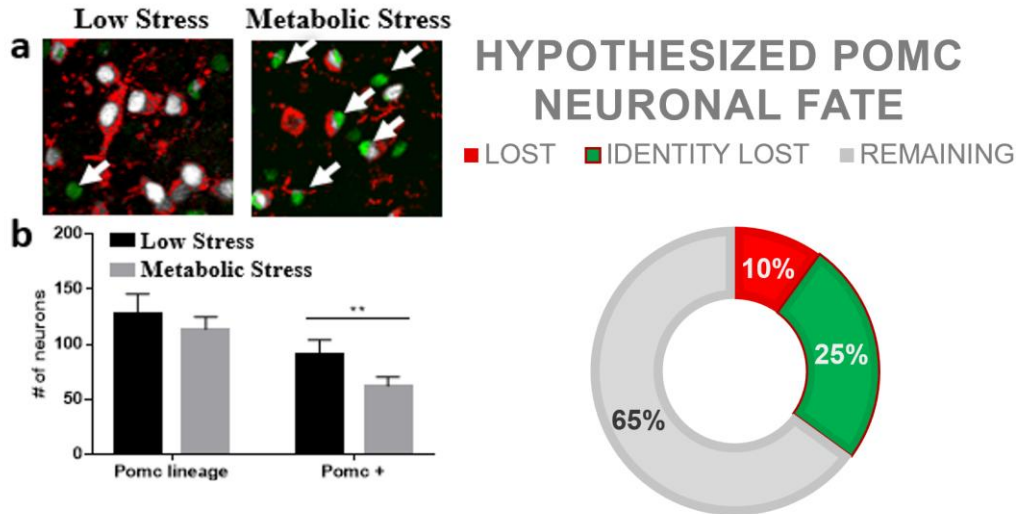
résultats, les chercheurs ont découvert qu'une mutation partielle de *Crif1* augmente les niveaux de  $\beta$ -endorphine (effet orexigène) alors que les niveaux de  $\alpha$ -Msh sont réduits [77].

Ainsi, il semble donc évident qu'un stress mitochondrial des neurones Pomc influence directement la production de la portion anorexigène du neuropeptide et ainsi altère sa fonction dans la régulation de la balance énergétique.

#### Résultats contradictoires : apoptose des neurones Pomc en situation de stress métabolique vs vrai suivi de lignée cellulaire Pomc :

Les changements physiologiques qu'un stress métabolique prolongé peut induire semblent perdurer. Les neurones de la satiété Pomc sont connus pour devenir dysfonctionnels dans une situation d'obésité prolongée, alors que leur nombre chute de 25% à 50% [55, 56]. Cette perte neuronale diminue la capacité de l'organisme à ressentir la satiété et à dépenser de l'énergie, aggravant la situation d'obésité et amoindrissant les chances de succès d'une intervention de perte de poids. Le concept actuellement accepté est que la disparition de 25% à 50% de ces neurones Pomc dans une situation d'obésité prolongée est causée par l'apoptose [55-57].

En utilisant des souris transgéniques, mon laboratoire d'accueil a fait un suivi de lignée neuronale Pomc et en validant la production active du neuropeptide Pomc par immunofluorescence et ils ont obtenu des résultats qui remettent en question ce concept (voir **figure 5**). En effet, leurs expériences préliminaires indiquent plutôt que, dans une situation d'obésité prolongée, une portion importante des neurones Pomc considérés disparus subissent plutôt un changement phénotypique de leur profil de neurotransmetteurs.



Fisette lab, unpublished data

**Figure 5:** Suivi de lignée cellulaire Pomc in vivo.

Légende : les souris ont été placées sur 6 mois de diète HFHS (metabolic stress), ou sur diète contrôle (low stress). **A**, image de microscopie montrant la différence entre l'expression du neuropeptide Pomc (rouge) et la présence des neurones identitaires Pomc (vert) pour les deux groupes de souris, la colocalisation entre le neuropeptide et la lignée cellulaire est illustrée en blanc. **B**, différence entre le nombre de neurones identitaire Pomc et différence entre le nombre de neurones exprimant le neuropeptide Pomc pour les deux groupes de souris, on remarque une diminution de 25% de l'expression du neuropeptide Pomc, mais aucune différence significative entre le nombre de neurones identitaire Pomc.

Ce résultat supporte la théorie de respécification des neurones à l'âge adulte de *Spitzer et al, 2017-2020* [80, 81]. Selon leurs résultats, une stimulation chronique des neurones force certains d'entre eux à modifier leur fonction primaire, probablement afin d'en assurer leur survie.

Le processus, nommé « respécification » est un phénomène biologique dépendant de l'activité qui consiste en un changement des capacités sécrétoire d'un neurone et représente une couche additionnelle de plasticité neuronale [80, 82].

En s'appuyant sur ces résultats préliminaires, mon projet de maîtrise a été élaboré afin d'approfondir la « disparition » des neurones Pomc, nous y reviendrons d'ailleurs dans la section : **Hypothèses**. Avant de s'y rendre, dans les prochaines sections nous discuterons plus en détail de la plasticité neuronale, du phénomène émergent de la respécification en terminant avec la neurogenèse.

### III. Plasticité dans le cerveau

La plasticité neuronale consiste en la capacité du système nerveux à modifier sa structure et son fonctionnement en réponse à certains stimulus de l'environnement. Ce phénomène permet au cerveau d'apprendre et de développer de nouvelles compétences en plus de s'adapter aux changements. Le but de cette section est d'introduire les concepts connus de la plasticité neuronale afin de mettre la table pour la respécification et la neurogenèse.

#### Formes de neuroplasticité connues : les changements de connexion synaptique, la création de nouvelles synapses

Un des aspects fondamentaux de la neuroplasticité est la capacité des synapses à modifier leurs connexions (nombres) ou à moduler leur excitation (force) [83]. Le concept de la plasticité synaptique suggère que le renforcement ou l'affaiblissement des connexions synaptiques existantes, ainsi que la formation de nouvelles synapses sont des mécanismes clés dans l'apprentissage [84]. Lorsque le cerveau est exposé à divers stimuli, la force de transmission synaptique peut être modulée, ce qui conduit à un changement de la dépolarisation neuronale associé à des changements structurels des dendrites et des circuits neuronaux [84].

Un bon exemple de plasticité synaptique est la potentialisation à long terme : l'activation répétée d'une synapse peut mener à l'augmentation de sa force, ce qui rend la communication entre ces neurones plus faciles à l'avenir [85].

Il existe aussi deux autres aspects de neuroplasticité étant cruciaux pour mes études. Un premier est la respécification de l'expression des neurotransmetteurs. Nous verrons dans la section IV : **Respécification**, plus en détail ce qu'est la respécification. Le second est le potentiel de neurogenèse au niveau de l'hypothalamus. Cet aspect sera abordé dans la section V : **Neurogenèse**.

## IV. Respécification

### Qu'est-ce que la respécification ?

La respécification neuronale est un phénomène qui consiste en la reconfiguration d'un neurone, soit par la perte de l'expression de son neurotransmetteur, le gain de l'expression d'un nouveau transmetteur ou la permutation de neurotransmetteurs [80, 81]. Ce phénomène provient d'un stimulus externe (environnement) causant ainsi la perte de fonction initiale et/ou le gain d'une nouvelle fonction pour le neurone en plus de l'adoption d'un nouveau phénotype/comportement différent pour l'individu [80].

Au niveau moléculaire, la respécification est médiée par différents facteurs tels que les cytokines TGF-B et IL-6 [86], des facteurs de croissance [87], des facteurs de transcriptions [87], des microARN [88], en plus de mécanismes épigénétiques [89].



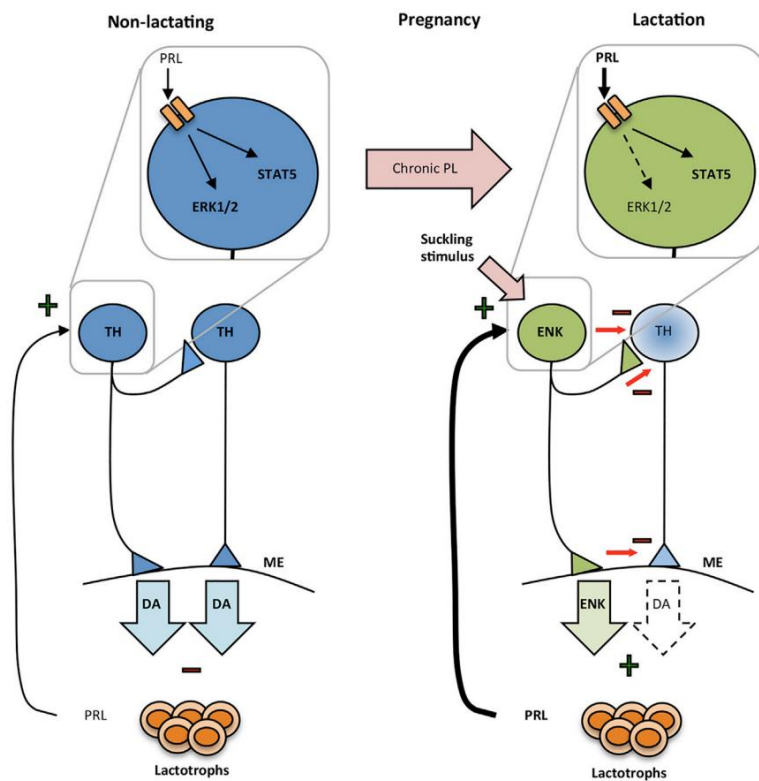
**Figure 6** : Description des évènements engendrant la respécification d'un neurone.

Légende : Les processus biologiques engendrant la respécification des neurones sont les suivants [80] :

- 1) Suractivation chronique du neurone
- 2) Induction de processus biologiques secondaires
- 3) Modification des facteurs génétiques « identitaires » (pouvant entre autres être régulés par des cytokines [86], des facteurs de croissance [90], des facteurs de transcriptions [87], des facteurs épigénétiques [89] ou bien encore par l'intervention de microARN [88])
- 4) Acquisition et consolidation d'un nouveau phénotype de neurotransmetteurs.

Il est d'ailleurs connu que les hormones peuvent influencer la respécification neuronale. Un exemple de ceci est l'effet de la prolactine, l'hormone responsable de la production de lait lors de la lactation, qui est entre autres capable de favoriser sa propre sécrétion en provoquant la permutation des neurotransmetteurs des neurones hypothalamiques sécrétant normalement de la dopamine (TiDa), inhibiteur de la prolactine [91]. En situation non gestationnelle, les neurones TiDa hypothalamiques régulent la

sécrétion de prolactine par la sécrétion de la dopamine afin d'empêcher un état d'hyperprolactinémie qui engendrait la lactation [91]. Lors d'une gestation, dans les derniers mois de la grossesse, les niveaux de prolactine augmentent graduellement, favorisant ainsi un échange de l'expression des neurotransmetteurs des neurones, passant de dopaminergiques à enképhaliques, favorisant l'hyperprolactinémie et permettant ainsi la lactation [91]. Cet état sera maintenu après l'accouchement par l'allaitement et se résorbe graduellement lorsque celui-ci est réduit, provoquant ainsi le retour de l'expression de la dopamine par les neurones [91]. Cet exemple démontre que des facteurs périphériques, tels que la grossesse, peuvent influencer une respécification des neurones hypothalamiques, capable de modifier l'expression de neurotransmetteur en plus de mentionner que la respécification est réversible dans certains cas, et ce possiblement plusieurs fois dans la vie d'un neurone.

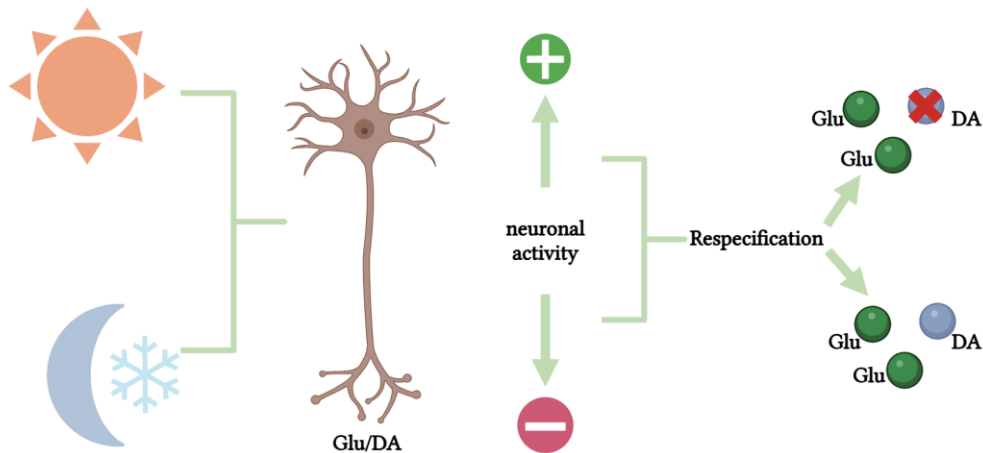


**Figure 7 :** Résumé de la respécification induite par la prolactine sur les neurones TiDa hypothalamique de la souris.

Légende : figure provenant de l'article de Yip, *et al.* (2019) [91]. Lors d'un état non-gestationnel, les neurones TiDa de l'hypothalamus sécrètent de la dopamine, ce qui empêche la sécrétion de prolactine de la part des cellules lactotrophes. Lors du dernier trimestre de la grossesse, la sécrétion importante de prolactine en

provenance du placenta altère le récepteur à la prolactine des neurones TiDa et se voit devenir enképhalique. Ce changement d'expression de neurotransmetteur désormais enképhalique permet le développement des lactotrophes et la lactation.

Les facteurs, tels que l'environnement, peuvent entraîner un changement de comportement et constituent un second exemple connu de la respécification. *Da Meng, et al. (2018)* ont démontré que le changement de la photopériode influence le comportement par l'entremise de respécification neuronale. Chez le rat, des neurones responsables de la réponse au stress se retrouvent dans le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (PVN) et ces neurones sont sensibles aux périodes et intensités lumineuses [92]. Lorsque l'animal est soumis à une photopériode lumineuse de longue durée, celui-ci adopte un comportement anxieux et ce comportement se résorbe lorsque l'animal retrouve une période où l'intensité lumineuse est réduite en durée [92]. Ceci s'explique du fait que les neurones responsables de la réponse au stress dans le PVN expriment deux types de neurotransmetteurs : le glutamate et la dopamine. Lorsque la photopériode lumineuse est prolongée, ces neurones perdent la capacité d'exprimer la dopamine, mais l'expression du glutamate reste le même, ce qui permet l'activation des neurones corticotrope du PVN, induisant la réponse au stress et l'adoption du comportement anxieux de l'animal [92]. Les chercheurs démontrent ainsi que ce phénomène peut se produire plusieurs fois dans le cycle de la vie d'un animal, puisque lorsqu'il y a un retour à une photopériode dite régulière, où l'intensité et la durée lumineuse se résorbent, les neurones du PVN retrouvent leur capacité d'exprimer de la dopamine et la réponse au stress est inhibée [92].



**Figure 8 :** Résumé de la respécification induite par le changement de cycle lumineux sur les neurones hypothalamiques du PVN.

Légende : adaptation simplifiée provenant de *Da Meng, et al. (2018)* [92]. Une exposition prolongée à la lumière entraîne la perte d'expression de DA par les neurones du PVN de l'hypothalamus. Cette perte de DA se traduit par une augmentation du comportement anxieux.

Un dernier exemple de respécification concerne des situations où l'identité des neurotransmetteurs exprimés peut être modifiée de manière irréversible en réponse à l'activité électrique [82, 93]. En étudiant le développement embryonnaire des *Xenopus laevis*, l'équipe de *Borodinsky et al. (2004)*, se sont penchés sur les effets de l'activité électrique et son influence sur l'identité des neurotransmetteurs exprimés par les neurones avant la formation des synapses. En modifiant l'activité des relâches de calcium, soit en la supprimant, soit en l'augmentant, les chercheurs ont constaté que certains neurones changeaient leur phénotype de neurotransmetteur (c'est-à-dire le type de neurotransmetteur produit et libéré) de manière durable. Par exemple, la suppression de l'influx calcique conduit à une augmentation du nombre de neurones exprimant des neurotransmetteurs excitateurs comme le glutamate et l'acétylcholine, tandis que l'augmentation de cette activité favorisait l'expression de neurotransmetteurs inhibiteurs tels que le Gaba et la glycine [93]. Ces changements, une fois établis, sont restés stables même lorsque l'activité neuronale a été modifiée ultérieurement, suggérant une respécification irréversible pendant une période critique du développement [93]. Ces résultats soulignent l'importance des périodes critiques dans le développement neuronal, où l'activité électrique peut induire des

changements permanents dans l'identité des neurotransmetteurs. Avec ce dernier exemple, on comprend que la respécification peut survenir de façon précoce lors du développement neuronal et qu'il y a des situations où la respécification est réversible et d'autres non.

### Mécanismes de la respécification neuronale

Le phénomène de la respécification correspond donc au changement d'expression des neurotransmetteurs pour un même neurone et peut être déclenché par une stimulation chronique (en provenance de l'environnement), mais peut également être déclenché dans un contexte pathologique [81]. Le changement de neurotransmetteur peut s'accompagner d'un basculement fonctionnel de la synapse : une synapse initialement excitatrice peut devenir inhibitrice, et vice-versa [81, 93]. Mais, comment la respécification se produit au niveau moléculaire?

La transmission de l'information aux synapses repose sur la libération de neurotransmetteurs par les neurones présynaptiques et leur liaison aux récepteurs des neurones postsynaptiques. Une stimulation des neurones cause la relâche de neurotransmetteurs par les terminaisons nerveuses dans la fente synaptique [94]. Il s'en suit de la dépolarisation membranaire et l'influx de  $Ca^{2+}$  dans la membrane postsynaptique, activant une variété de changements moléculaires, tels que la phosphorylation de sites moléculaires [94]. Ces changements moléculaires peuvent causer des modifications sur l'expression de protéines en agissant entre autres sur la traduction des ARNm et engageant l'expression de facteurs de transcriptions modifiant l'expression génétique, engendrant la respécification des neurotransmetteurs [82, 94]. Cependant, ce n'est pas très clair comment une réponse chronique peut induire ces changements qui favorise la maintenance d'une nouvelle identité neuronale.

Sachant ceci, on pourrait alors croire que la respécification se produit dans les neurones postsynaptiques seulement. Cependant, elle peut se produire autant dans les neurones présynaptiques que dans les neurones postsynaptiques [82, 93].

Une étude sur la respécification neuronale chez *X. Laevis* suggère que la respécification neuronale serait physiologiquement impossible sans des changements correspondants dans l'expression des récepteurs des neurones postsynaptiques [82]. Si ce n'était pas le cas, la communication entre les neurones serait bloquée puisque les récepteurs

postsynaptiques, n'exprimant pas les nouveaux récepteurs appropriés, empêchaient la transmission synaptique du nouveau neurotransmetteur [82]. Ainsi, une certaine forme de communication entre les deux neurones doit exister. À la jonction neuromusculaire de *X. Laevis*, les synapses sont cholinergiques et libèrent de l'acétylcholine afin d'activer les récepteurs nicotiniques postsynaptiques [82]. Cependant, les cellules musculaires embryonnaires de *X. Laevis* expriment avant l'innervation (donc la maturation des connexions synaptiques), non seulement des récepteurs à l'acétylcholine, mais aussi au glutamate, au Gaba et à la glycine [82]. Du côté des neurones spinaux embryonnaires, la modulation de l'activité calcique entraîne des ajustements parallèles dans l'expression des récepteurs musculaire en devenir [82]. Il est important de comprendre qu'au stade embryonnaire, la maturation des synapses n'est pas à terme et que le déclenchement d'un influx calcique est spontané, c'est-à-dire qu'il provient des neurones embryonnaires eux-mêmes. Cependant cette activité modifie les neurotransmetteurs que ces neurones exprimeront et influence aussi, indirectement, l'expression des récepteurs postsynaptiques. Dans les neurones spinaux embryonnaires de *X. Laevis*, une augmentation de la fréquence des influx calciques favorise l'expression de récepteurs pour Gaba et la glycine, tandis que leur suppression stimule l'expression de récepteurs pour l'acétylcholine et le glutamate [82]. L'activité neuronale est ainsi essentielle à la formation de synapses fonctionnelles, en déterminant la classe synaptique [82].

## V. Neurogenèse

### Qu'est-ce que la neurogenèse ?

En soi, la neurogenèse est la formation de nouveaux neurones matures à partir de cellules souches neurales [95]. Chez la souris, la neurogenèse se produit à deux stades précoces du développement, le premier durant la période embryonnaire (E7 à E18.5) et le dernier stade se produit durant la période postnatale pour certaines régions du cerveau [96].

La neurogenèse à l'âge adulte, donc la formation de nouveaux neurones matures lorsque le cerveau n'est plus en développement, est un concept ne faisant pas l'unanimité en dehors de l'hippocampe, mais de plus en plus émergent en neuroscience. Malgré la controverse entourant la neurogenèse postdéveloppement [97, 98], certaines zones du cerveau sont bien connues et acceptées pour être des niches importantes de cellules souches neurales capables de différenciation dans un cerveau mature. Ces zones sont : la zone sous-ventriculaire antérieure du cerveau et la zone sous-granulaire du gyrus denté de l'hippocampe [99-113].

Pourtant, dans des études plus récentes, l'hypothalamus a été révélé comme niche de cellules souches neurales [114-118]. Ainsi, si de nouveaux neurones peuvent être générés dans l'hypothalamus d'un cerveau mature, ceux-ci pourraient influencer les processus homéostatiques responsables du contrôle de la masse corporelle en participant positivement ou négativement à l'obésité.

Il est important de mentionner que la majorité des études sur la neurogenèse dans un cerveau mature ont utilisé la bromodeoxyuridine (BrdU) *in vivo*, une molécule s'incorporant dans l'ADN des cellules en division, permettant de les marquer durablement afin de les suivre [119]. Bien que cette méthode permette l'identification de nouvelles cellules, le marquage au BrdU ne permet pas de suivre l'important réservoir de cellules multipotentes possédant la capacité de se différencier en neurones et autres types cellulaires, sans recourir à la division cellulaire [119, 120]. En effet, lors de la division asymétrique des cellules souches neurales, des cellules progénitrices de neurones sont créées; elles n'entament toutefois pas nécessairement leur processus de maturation immédiatement. Ces cellules peuvent demeurer présentes dans le parenchyme pendant une période prolongée en attendant le signal qui provoquera leur maturation en neurones. Ainsi,

dans une étude utilisant le BrdU simultanément à un stimulus particulier, ces progéniteurs neuronaux ne seront pas marqués.

Bien que de plus en plus d'études supportent que la neurogenèse soit sujette à se produire dans l'hypothalamus afin de satisfaire la régulation de la dépense énergétique [114, 116, 118], elle ne fait pourtant pas consensus [98, 118]. Comme présenté dans les sections précédentes (I-IV), l'ARC hypothalamique est la région responsable de la régulation de la balance énergétique et de l'homéostasie du métabolisme.

De façon intéressante, la régulation de la neurogenèse dans l'ARC serait sensible aux états métaboliques. En effet, les diètes obésogènes et les restrictions caloriques pourraient avoir une action activatrice ou inhibitrice sur la neurogenèse postnatale hypothalamique dans le but de raffiner leur action sur la balance énergétique.

Une étude réalisée par *Son, J.E., et al.* (2021), s'est penchée sur le rôle des gènes *Irx3* et *Irx5*, connus pour être déterminant dans l'obésité, a démontré que les souris doublement hétérozygotes pour une mutation de ces gènes avaient une diminution de leur consommation alimentaire et une augmentation de la réponse à la leptine hypothalamique [121]. Avec une technique de suivi de lignée cellulaire, les chercheurs ont aussi démontré que les gènes *Irx3* et *Irx5* sont grandement exprimés dans une population de cellules souches radiales de type gliales. Ainsi une réduction de l'expression de *Irx3* et *Irx5* favorise la neurogenèse postnatale dans l'hypothalamus, les nouveaux neurones générés sont majoritairement positifs au signal de la leptine, entraînant la diminution de la prise alimentaire [121].

Les découvertes de cet article sont en accord avec des études pionnières de *Kokoeva et al.* (2005 et 2007), qui démontrent la présence de cellules neurales prolifératives dans l'hypothalamus murin postnatal [114, 115]. Entre autres, les chercheurs ont étudié les effets de l'administration du facteur neurotrophique ciliaire (CNTF) connus pour causer une perte de poids, mais dont le mécanisme n'était pas documenté. L'administration de CNTF causerait la prolifération cellulaire dans les régions hypothalamiques responsables de la prise alimentaire [114]. De ces nouvelles cellules, plusieurs expriment des marqueurs neuronaux. Afin de déterminer si les nouveaux neurones sont impliqués dans la régulation de la balance énergétique, les chercheurs ont utilisé un anticorps pour STAT3 phosphorylé, un composant provenant de la cascade de signalisation de l'activation des récepteurs à la

leptine de l'hypothalamus. Cette signalisation est donc connue pour être essentielle à la régulation de l'équilibre énergétique par l'hypothalamus. À la suite de leur marquage pour STAT3 phosphorylé, *Kokoeva et al. (2005)*, ont trouvé que plusieurs des nouveaux neurones générés suivant l'administration de CNTF étaient positifs pour STAT3 phosphorylé, indiquant que ceux-ci sont impliqués dans le contrôle de la balance énergétique [114].

Dans une seconde étude, l'équipe de *Kokoeva et al. (2007)* utilise cette fois-ci le BrdU pour étudier la neurogenèse. Avec cette technique, les chercheurs ont démontré que de nouvelles cellules sont générées de façon continue dans l'hypothalamus murin postnatal et que de ce nombre, plusieurs sont positifs à l'expression de marqueurs neuronaux [115]. Ce qui est particulièrement intéressant de cet article, c'est que les chercheurs montrent que les nouvelles cellules hypothalamiques marquées au BrdU (y compris les nouveaux neurones) se retrouvent au niveau du parenchyme [115], ciblant ainsi une zone d'intérêt.

Finalement, une étude de *Pierce A.A et al. (2010)*, montre l'importance de la neurogenèse dans l'hypothalamus lors d'une perte de fonction progressive des neurones *Agrp*. Sommairement, leurs travaux montrent que les neurones importants pour l'homéostasie du métabolisme énergétique peuvent être générés à l'âge adulte lors de conditions neurodégénératives [116]. Les chercheurs ont utilisé des souris mutantes pour l'expression d'*Agrp* (*Agrp-Tfam*) et ont quantifié le nombre de cellules prolifératives dans l'hypothalamus de ces souris comparativement à des souris contrôles. Ils ont remarqué que la dégénération des neurones *Agrp* dans l'ARC causait une augmentation de la prolifération cellulaire dans cette région comparativement aux souris contrôles [116]. Ils ont également voulu identifier l'identité des nouvelles cellules par double immunofluorescence avec un marqueur de prolifération (le PCNA, qui marque les cellules actives dans le cycle cellulaire), et différents marqueurs des neurones responsables de la faim ou de la satiété, dont *Agrp* et *Acth* (marqueur pour les neurones *Pomc*) en plus d'un marqueur pour les cellules qui répondent à la leptine (pSTAT3). Selon leurs résultats, parmi les nouvelles cellules générées, on y retrouve des neurones *Agrp* (7.2 à 11.8%), des neurones *Pomc* (9.3%) ainsi qu'une population cellulaire répondant également à la leptine (22.6%) [116]. Il est important de mentionner que chez les souris *Agrp-Tfam*, le processus de

neurodifférenciation semble avoir un effet protecteur sur le poids corporel et la prise alimentaire malgré la dégénérescence d'AgRP, puisque lorsque les chercheurs inhibent la neurodifférenciation chez ces souris, il se produit une diminution importante de la prise alimentaire et de la masse adipocytaire alors que ceci ne se produit pas chez les souris contrôles [116]. À la lumière de ceci, la neurogenèse dans l'hypothalamus pourrait servir de mécanisme plastique du système nerveux afin de limiter les conséquences métaboliques lors de dégénérescence ou de déséquilibre d'une population neuronale.

Également, les tanycytes, des cellules gliales spécialisées et logées près du 3<sup>e</sup> ventricule ont été identifiées comme une niche de neurogenèse dans l'hypothalamus, ces cellules sont sensibles aux états métaboliques et participent au contrôle de la balance énergétique [118].

Dans une étude réalisée par *Daniel Lee et al. (2012)*, les chercheurs voulaient confirmer si les tanycytes, qui sont connus pour exprimer des marqueurs de cellules souches tels que *Nestin* et *Notch*, sont impliqués ou non dans la neurogenèse postnatale. En utilisant un marquage au BrdU, les chercheurs ont quantifié l'apparition de nouvelles cellules dans l'hypothalamus de souris matures [118]. De façon intéressante, ils ont observé un nombre important de nouvelles cellules marquées au BrdU au niveau de la couche épendymaire à la base du 3<sup>e</sup> ventricule de l'éminence médiale de l'hypothalamus [118]. En effectuant un marquage pour différents types cellulaires, les chercheurs ont confirmé l'identité des nouvelles cellules générées dans cette région comme étant des tanycytes [118]. Ils ont ensuite voulu savoir si les tanycytes jouent un rôle neurogénique. Pour ce faire les chercheurs ont effectué un suivi de lignée cellulaire pour les tanycytes en marquant les cellules exprimant *Nestin* de façon permanente grâce à un modèle de souris transgénique inducible par le tamoxifène (*Nestin-CreERT2;YFP*) et en couplant cette technique avec de l'immunofluorescence pour des marqueurs neuronaux [118]. Selon leurs résultats, les tanycytes sont hautement neurogéniques.

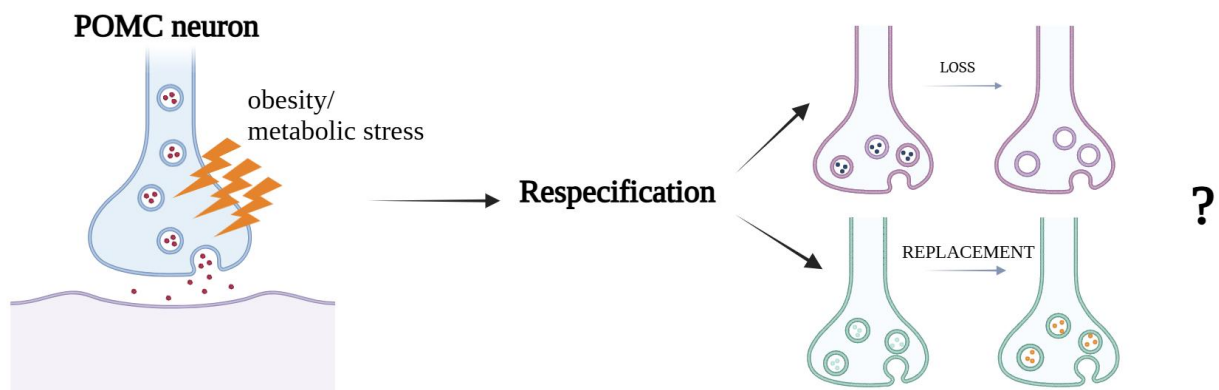
Toutes ensemble, ces découvertes soulignent que l'hypothalamus est une structure du cerveau hautement plastique et que celui-ci adopte des mécanismes dynamiques, dont la neurogenèse, pour réguler la balance énergétique [116].

## Hypothèses

Ma recherche s'est divisée en deux projets portant sur la plasticité neuronale hypothalamique. Dans cette section, deux hypothèses seront ainsi présentées.

### I : Respécification dans l'hypothalamus

Sachant que la respécification neuronale se produit lorsqu'un stimulus chronique est appliqué sur des neurones, notre équipe s'est penchée sur la possibilité qu'un stress métabolique prolongé qui active les neurones Pomc, induise la respécification du neurotransmetteur Pomc produit par les neurones Pomc.



**Figure 9 :** Schématisation de l'hypothèse qu'un stress métabolique cause la respécification des neurones Pomc hypothalamique.

Légende : la suractivation constante des neurones Pomc par un stress métabolique, comme l'obésité, entrainerait la respécification de ceux-ci. Les neurones subiraient un changement de neurotransmetteur causant soit la perte du neuropeptide Pomc ou le remplacement de celui-ci par un nouveau neuropeptide (non identifié).

Dans la littérature, l'expression du facteur transcriptionnel *Tbx3* est connue pour être essentielle dans le maintien des neurones hypothalamique de la satiété [66]. La perte de l'expression de *Tbx3* dans les neurones Pomc n'affecte pas la survie de ceux-ci, mais plutôt la capacité d'expression du neuropeptide Pomc par ces mêmes neurones [66].

Ainsi nous apportons l'hypothèse que le stress métabolique prolongé induit par l'obésité engendre la respécification des neurones Pomc et que cette respécification est probablement favorisée par la perte de l'expression du facteur *Tbx3*.

Afin de répondre à notre hypothèse, nous avons évalué *in vitro*, par culture cellulaire immortalisée, primaire et organotypique les conséquences d'un stress métabolique dans les neurones Pomc sur leur profil d'expression de neurotransmetteur, ce qui jusqu'à ce jour n'a jamais été déterminé. Accompagnés par des techniques d'imagerie à fluorescence et par l'analyse d'expression génétique, nous voulons tenter de résoudre le manque d'information sur la respécification des neurones Pomc.

Mieux comprendre comment le cerveau s'adapte à l'obésité pourrait nous permettre de révéler comment il réagit face à la perte de poids et comment il serait possible de favoriser sa maintenance, en plus d'établir les nouveaux processus moléculaires non connus du cerveau. Également, éclaircir ces mécanismes pourrait potentiellement offrir une nouvelle cible thérapeutique afin de guérir la maladie plutôt que de traiter les symptômes de manière continue.

## II : Neurogenèse dans l'hypothalamus

La neurogenèse dans le cerveau adulte demeure un sujet de controverse, bien que les zones sous-ventriculaire et sous-granulaire de l'hippocampe soient largement reconnues comme des régions où la neurogenèse se produit dans un cerveau mature. Cependant, l'hypothalamus, une région dotée d'une grande plasticité, pourrait également être une région où la neurogenèse est toujours active à l'âge adulte [114-116]. Nous émettons l'hypothèse que les habitudes de vie pourraient favoriser l'apparition de nouveaux neurones à l'âge adulte et que ces derniers pourraient avoir un impact significatif sur la régulation du poids corporel. Les études antérieures n'ont pas permis d'établir un consensus sur les effets d'une diète obésogène sur la neurogenèse [98]. Celle-ci pourrait être soit inhibée, soit activée sous l'effet d'un régime riche en lipides. Cette ambiguïté pourrait s'expliquer par les variations méthodologiques dans l'étude de la neurogenèse, notamment l'utilisation de BrdU comme marqueur [98].

Le BrdU est un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN lors de la synthèse de celle-ci. Cependant, elle peut également s'intégrer dans l'ADN durant des processus de réparation ou d'apoptose, ce qui complique l'interprétation des résultats et l'identification précise de la prolifération cellulaire [122, 123]. Il est également possible que des progéniteurs dans l'hypothalamus attendent des signaux appropriés pour se différencier, et que ces cellules ne procèdent pas à la division cellulaire avant leur différenciation. Dans ce cas, l'approche de marquage des cellules progénitrices par BrdU ne serait pas efficace. En ce sens, l'article de *McNay, D.E et al. (2007)*, souligne un remplacement des neurones de l'ARC hypothalamique : après avoir marqué au BrdU les cellules progénitrices du Noyau Arqué de souris au stade embryonnaire, les chercheurs sont venus suivre l'évolution des cellules BrdU+. De 4 à 12 semaines après la naissance, le nombre de cellules BrdU+ était réduit de 63% et pourtant le nombre de cellules totales de l'ARC était inchangé [117]. Ces résultats suggèrent qu'une fraction importante des neurones est renouvelée par de nouvelles cellules (turnover). L'ampleur de ce renouvellement n'est toutefois pas observable dans les études où des souris adultes sont traitées au BrdU, suggérant que le renouvellement est fortement lié à la différenciation tardive de progéniteurs, plutôt que par une division asymétrique de cellules pluripotentes.

Afin de nous assurer d'avoir un modèle convenable pour l'identification de la neurogenèse, nous avons décidé de faire un suivi de lignée cellulaire pour les cellules exprimant un marqueur de multipotence : le marqueur *Sox2*. En utilisant un modèle de souris transgénique permettant d'induire de la fluorescence dans les progéniteurs pluripotents du cerveau, nous pensons être en mesure de suivre la population multipotente de l'hypothalamus ainsi que leur devenir. Plus de détails seront fournis sur le choix et le fonctionnement de ce modèle murin dans la section: Explication du modèle.

Notre hypothèse pour ce projet est que la neurogenèse hypothalamique peut influencer l'équilibre énergétique, en fonction de la nature des nouveaux neurones générés. Mon rôle dans ce projet est d'établir les bases de l'approche en validant d'abord le modèle de souris transgénique permettant de faire un suivi du réservoir de cellules Sox2+, puis d'obtenir des résultats préliminaires montrant la preuve de neurodifférenciation à l'âge adulte, selon différents contextes métaboliques, tels que des régimes riches en sucre et en gras, la restriction calorique et l'activité physique.

Ces étapes sont cruciales afin de mettre sur pied les détails techniques qui vont permettre l'étude de la neurodifférenciation hypothalamique.

## Chapitre 1 : Respécification des neurones Pomc

L'expression du facteur transcriptionnel *Tbx3* est essentielle pour le maintien des neurones Pomc dans l'hypothalamus. Sa perte provoque une prise de poids et une perturbation de l'identité neuronale, sans affecter la survie des neurones. Afin d'étudier ce phénomène plus en détail, deux axes de recherche ont été déployés :

- Un axe in vitro : employant différentes techniques de culture cellulaire afin de causer une suractivation et d'utiliser des analyses d'expression génétique.
- Un axe in vivo : employant des souris transgéniques pour lesquelles il nous sera possible de suivre les neurones Pomc+ dès la naissance et d'évaluer leur devenir lors d'une suractivation neuronale spécifique.

Dans les prochaines sections de ce chapitre, nous élaborerons les méthodes, les résultats ainsi que l'analyse de ces derniers sur notre compréhension de l'adaptation neuronale face à l'obésité.

### I. Méthodes

#### ***Culture cellulaire de neurones POMC immortalisés***

Les cellules immortalisées Pomc hypothalamiques de souris C57Bl/6 mâles adultes *mHypoA-POMC/GFP-2 (CLU501)* de chez Cedarlane sont mises en culture dans du média DMEM à 25mM de glucose enrichi de 10% de sérum bovin fœtal (FBS) et 1% de solution de mélange antibiotique pénicilline/streptomycine puis sont maintenu dans un environnement à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>. Pour le maintien de la culture, les *CLU501* ont été passées lorsque la confluence atteignait le 70 à 90 % avec un ratio 1:4 de trypsine EDTA 0,25%.

#### ***Suractivation au KCl***

Après un passage, les *CLU501* ont été mises en culture dans des plaques de 24 puits (Sarstedt 83.3922) avec 50 000 cellules/puits. Pour la suractivation, des solutions de 25mM, 50mM ou bien 75mM de KCl (Sigma-Aldrich P5405-250G, lot : SLCC9757) ont

été ajoutées au DMEM régulier (25 mM glucose, 10% de FBS non inactivé et 1% d'antibiotique), pendant des périodes de 6h, 24h et 48h.

### ***Analyse de la viabilité cellulaire (LDH Assays)***

L'analyse de la viabilité cellulaire des *CLU501* à la suite de la suractivation au KCl a été effectuée à l'aide du *Cytotoxicity Detection KitPlus (LDH)*, de Roche (cat # 11644793001 Roche, Indianapolis, USA) en suivant le protocole fourni par le fabricant. Le média des cellules a été récolté après 6h, 24h et 48h pour les différentes concentrations de KCl (25mM, 50mM ou 75mM) puis centrifugé afin d'éliminer le plus possible de débris et de cellules. La concentration de LDH a été mesurée par colorimétrie à 490 nm. Comme contrôle de mort cellulaire totale, le média de *CLU501* exposé à du Triton-X pour les mêmes périodes fût utilisé. Les pourcentages de cytotoxicité ont été calculés via Excel à l'aide de la formule suivante : Cytotoxicité (%):  $\frac{\text{valeur expérimentale} - \text{blank}}{\text{high control} - \text{blank}} \times 100$ .

### ***Analyse quantitative des gènes exprimés dans les CLU501***

L'ARN total a été isolé des *CLU501* en culture et traité avec du KCl avec le kit (*Aurum<sup>TM</sup> total RNA mini kit*). Ensuite l'ARN total a été transcrit en ADN complémentaire avec le kit *iScript RT supermix* (Biorad). Les analyses Real-time PCR ont été effectuées avec une machine *BIO RAD CFX connect Real-time System*. Le gène pour *Hprt* a été utilisé comme gène de référence. Le programme PCR est le suivant: 95°C 2 min, 40 cycles de 95°C pendant 5 s, 55°C pendant 15 s avec lecture de plaque et analyse subséquente de la melting curve. Les données sont les moyennes de 3 répliques indépendantes. L'expression relative de chaque gène a été calculée avec la technique du  $\Delta\Delta C_t$ .

Genes	company	Primer F	Primer R
<i>Pomc</i>	IDT technology	GGAGAGAAAGCCGAGTCACAA	GGAGGGACCCCGTCCTGT
<i>Tbx3</i>	IDT technology	GTTCCACATCGTCAGAGCCA	GCTGGAGGACTCATCCGAAG
<i>Ngn2</i>	IDT technology	CAATCACAATAGACAGCGGCG	TCTCCTTAAACCCCGAAGCC
<i>Ngn3</i>	IDT technology	AATTTACTCCAGGCGAGGGC	ATGAGGCGCCATCCTAGTTC
<i>Isl1</i>	IDT technology	AACCCAACGACAAAATAATATCC	TAGAGCCTGGTCCTCCTTCT
<i>MC4R</i>	IDT technology	CCCGGACGGAGGATGTAT	TCGCCACGATCACTAGAATGT
<i>CART</i>	IDT technology	CCCGAGCCCTGGACATCTA	GCTTCGATCTGCAACATAGCG

<i>Ascl1-Mash1</i>	IDT technology	ATGGACTTTTGAAGCAGGATGG	GAAGGTGCCCTGTAGGTTG
<i>HPRT</i>	IDT technology	TCAGTCAACGGGGACATAAA	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG
<i>Nhlh2</i>	IDT technology	TTCCACCATCTCCAGGCTAAA	CAAGGAGGAGAGATCCTTGTGG
<i>Lhx2</i>	IDT technology	CTGTTCCACAGTCTGTCCGGG	CAGCAGGTAGTAGCGGTCAG

**Tableau 2:** liste des amorces utilisées pour l'analyse quantitative des gènes exprimés dans les CLU501.

### ***Modèle murin expérimental pour la culture hypothalamique primaire***

Les souris *Pomc*<sup>Cre/+</sup> ont été croisé avec des souris *Pomc*<sup>eGFP/+</sup> afin d'obtenir une lignée murine hétérozygote *Pomc*<sup>CRE/eGFP</sup>. Les colonies de souris ont été maintenues à l'interne par reproduction des souris *Pomc*<sup>Cre/+</sup> ; *Pomc*<sup>Cre/+</sup> et *Pomc*<sup>eGFP/+</sup>; *Pomc*<sup>eGFP/+</sup>. Les souris ont été maintenues entre 20 et 24°C sur un cycle d'exposition à la lumière de 12 :12 avec un accès constant à de l'eau fraîche et de la nourriture régulière. L'état de santé général des souris a été vérifié régulièrement (déshydratation, fatigue et posture). L'âge et le nombre de souris analysés pour chaque expérience sont détaillés dans les légendes des figures. Le protocole éthique animal approuvé par le Comité de Bons Soins aux Animaux de l'UQTR est AF4.

### ***Culture primaire hypothalamique***

Les souriceaux issus de la génération de souris *Pomc*<sup>CRE/GFP</sup> ont été sacrifiés par décapitation au 3<sup>e</sup> jour après la naissance. Le cerveau a immédiatement été recueilli dans du média Leibovitz's L-15 Medium (Gibco™; 11415064). Les tissus hypothalamiques ont été dissouts dans une solution de 4,5 U/ml papaïne (Worthington; LS003120) et de 200 U/ml DNase (Worthington; LS006333) et récupérer sur des lamelles traitées avec 0,01% de poly-L-lysine (Millipore Sigma; P4707-50ML). Les cellules sont incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans 1,5 ml de média Neurobasal (Gibco™; 10888022) supplémenté de B-27 50X (Gibco™; 17504044), Glutamax 100X (Gibco™; a1286001), solution antibiotique de pénicilline et streptomycine 100X, 2% de FBS) pendant 4 jours avant d'ajouter 1.5 µl de Cytarabine 2mM (Millipore Sigma; C1768-100MG) afin d'inhiber la croissance de cellules non neuronale. Finalement les neurones incubent pour une durée totale de 7 jours avant la suite des manipulations et avant d'avoir un changement de demi-milieu.

### ***Microscopie de la culture primaire pour visualisation de la eGFP***

Les images ont été capturées avec un microscope confocal Leica SP-8, équipé d'une lentille à l'huile  $\times 40/1.30$ . L'intensité des lasers pour DAPI et GFP (eGFP) était les mêmes pour tout le processus de prise d'image avec une résolution de 512 x 512 et une vitesse de numérisation de 400 ms. Les projections maximales ont été réalisées par l'utilisation du logiciel d'imagerie FIJI (National Institutes of Health). Les images ont été éditées dans FIJI en ce qui concerne la luminosité et le contraste. Les paramètres ont été appliqués de manière égale à toutes les images. La colocalisation avec DAPI et GFP a été confirmée de façon qualitative par observation de la fluorescence eGFP.

### ***Analyse quantitative des gènes exprimés dans la culture primaire hypothalamique $Pomc^{CRE/eGFP}$ par RT-qPCR***

L'ARN total a été isolé des cellules primaires  $Pomc^{CRE/eGFP}$  en culture avec le kit (Aurum<sup>TM</sup> total RNA mini kit). Ensuite l'ARN total a été transcrit en ADN complémentaire avec de kit iScript RT supermix (Biorad). Les analyses Real-time PCR ont été effectuées avec une machine BIO RAD CFX connect Real-time System. Le gène pour Hprt a été utilisé comme gène de référence. Le programme PCR est le suivant: 95°C 2 min, 40 cycles de 95°C pendant 5 s, 55°C pendant 15 s avec lecture de plaque et analyse subséquente de la melting curve. Les données sont les moyennes de 3 répliques indépendantes. L'expression relative de chaque gène a été calculée avec la technique du  $\Delta\Delta C_t$ . La liste des amorces utilisée:

Genes	company	Primer F	Primer R
<i>Pomc</i>	IDT technology	GGAGAGAAAGCCGAGTCACAA	GGAGGGACCCCGTCTGT
<i>AgRP</i>	IDT technology	AGGGCATCAGAAGGCCTGACCAGG	TTGAAGAAGCGGCAGTAGCACGT
<i>NPY</i>	IDT technology	TGGCCAGATACTACTCCGCT	AGGGTCTTCAAGCCTTGTCT
<i>GFAP</i>	IDT technology	AGAAAGGTTGAATCGCTGGA	CGGCGATAGTCGTTAGCTTC
<i>GFP</i>	IDT technology	CCACATGAAGCAGCAGGACTT	GGTGCCTCCTGGACGTA
<i>MC4R</i>	IDT technology	CCCGGACGGAGGATGCTAT	TCGCCACGATCACTAGAATGT
<i>CART</i>	IDT technology	CCCGAGCCCTGGACATCTA	GCTTCGATCTGCAACATAGCG

HPRT	IDT technology	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG
------	-------------------	-----------------------	-----------------------

**Tableau 3:** liste des amorces utilisées pour l'analyse quantitative des gènes exprimés dans les cultures hypothalamiques primaires  $Pomc^{eGFP}$ .

### ***Modèle murin expérimental pour la culture organotypique***

Les souris  $Pomc^{Cre/+}$  ont été croisé avec des souris  $Pomc^{eGFP/+}$  afin d'obtenir une lignée murine  $Pomc-Cre;Pomc-eGFP$ . Les colonies de souris ont été maintenues à l'interne par reproduction des souris  $Pomc^{Cre/+}$ ;  $Pomc^{Cre/+}$  et  $Pomc^{eGFP/+}$ ;  $Pomc^{eGFP/+}$ . Les souris ont été maintenues entre 20 et 24°C sur un cycle d'exposition à la lumière de 10 :14 avec un accès constant à de l'eau fraîche et de la nourriture régulière. L'état de santé général des souris a été vérifié régulièrement (déshydratation, fatigue et posture). L'âge et le nombre de souris analysés pour chaque expérience sont détaillés dans les légendes des figures. Le protocole éthique animal approuvé par le Comité de Bons Soins aux Animaux de l'UQTR est AF4.

### ***Modèle murin expérimental in vivo***

Les souris  $Pomc^{Cre/+}$  ont été croisé avec des souris  $Pomc^{Sun1sfGFP/+}$  afin d'obtenir une lignée murine  $Pomc-Cre;Sun-sfGFP$ . Les colonies de souris ont été maintenues à l'interne par reproduction des souris  $Pomc^{Cre/+}$ ;  $Pomc^{Cre/+}$  et  $Pomc^{Sun1sfGFP/+}$ ;  $Pomc^{Sun1sfGFP/+}$ . Les souris ont été maintenues entre 20 et 24°C sur un cycle d'exposition à la lumière de 12 :12 avec un accès constant à de l'eau fraîche, de la nourriture régulière. L'état de santé général des souris a été vérifié régulièrement (déshydratation, fatigue et posture). L'âge et le nombre de souris analysés pour chaque expérience sont détaillés dans les légendes des figures. Le protocole éthique animal approuvé par le Comité de Bons Soins aux Animaux de l'UQTR est AF6.

### ***Infection virale par chirurgie stéréotaxique***

Des souris  $Pomc-Cre;Sun-sfGFP$  mâles et femelles âgées entre 8 à 10 semaines, de 2 groupes expérimentaux (NaChBac ou CTRL), ont reçu une injection bilatérale de 500 nl de virus AAV2/2-Ef1a-tfTomato-P2A-mNaChBac ou AAV2/2-Ef1a-tfTomato (Neurophonic Core) au niveau du noyau ARC hypothalamique. Les coordonnées d'injections virales à partir de Bregma sont les suivantes : AP, -1.5mm; ML,  $\pm$  0,3mm; DV,

-5,9mm pour les mâles et AP, -1.5mm; ML,  $\pm$  0,3mm; DV, -5.8mm pour les femelles. Les souris ont été suivies pendant une moyenne de 7 jours suivant la chirurgie stéréotaxique afin d'évaluer tout signe d'inconfort et de douleur en suivant les protocoles éthiques établis par le comité de bons soins aux animaux de l'UQTR. Les souris ont ensuite été placées sous diète obésogène HFHS (58kcal % en provenance des graisses et du glucose (d12331 Research diet)) ou sur diète contrôle (CTRL) pendant 16 semaines, avec suivi de leur poids corporel et de leur consommation alimentaire, avant euthanasie par perfusion (PFA 4%) pour l'immunofluorescence ou par décapitation pour extraction des tissus à des fins de futures analyses transcriptomiques.

#### ***Test de résistance au glucose (GTT)***

À 16 semaines postchirurgie stéréotaxique, les souris *Pomc-Cre;Sun-sfGFP* mâles et femelles ont été placées à jeun pendant 4 heures avant le début de la procédure. Le niveau de glucose sanguin basal (t=0) a été mesuré. Les souris ont ensuite reçu un volume de 2g/kg de solution de D-glucose 20% (0.2g/mL) et leur niveau de glucose sanguin a été mesuré au temps 0, 15, 30, 60, 120 minutes après l'injection de D-glucose.

#### ***Immunofluorescence de tranches hypothalamiques***

Les cerveaux des souris *Pomc-Cre;SunI-sfGFP* mâles et femelles ont été entièrement recueillis dans du PFA 4% à 4°C pendant 16 heures. Les cerveaux ont ensuite été transférés dans une solution de sucrose 30% supplémentée de 0,05% d'azide de sodium pendant au moins 24 heures. Les cerveaux ont été coupés en tranche de 30 $\mu$ m à l'aide d'un cryostat (Leica CM3050s) à -20°C. Pour la détection de *Pomc*, un anticorps primaire anti-*Pomc* (porcine) (1 :200, Phoenix Pharmaceutival) a été utilisé, la visualisation s'est faite avec un anticorps secondaire Goat-anti-rabbit Alexa 647 (1 :2000, Cell Signalling Technology). La détection de C-Fos c'est fait par l'utilisation de l'anticorps primaire anti-c-Fos (1 :1600, Cell Signalling Technology), la visualisation s'est fait avec un anticorps secondaire Goat-anti-rabbit Alexa 647 (1 :2000, Cell Signalling Technology) sur des tranches hypothalamiques différentes de celles marquées avec anti-*Pomc*. La fluorescence provenant de la GFP (endogène) et de tdTomato (virale) ne nécessitait pas de détections

par anticorps. Les projections maximales ont été réalisées sur FIJI (National Institutes of Health).

### ***Microscopie confocale pour la validation des injections virales***

Les images pour la validation des injections virales ont été capturées par l'utilisation d'un microscope confocal Leica SP8, équipé d'un objectif 20x. Les sections de l'ARC hypothalamique de 8 souris mâles (4 DV :5.9; 4 DV : 6.0) et de 4 souris femelles (DV : 5.9) ont été capturées de façon unilatérale de l'antérieur vers postérieur sur une plage d'une épaisseur totale de 30µm. Les intensités des lasers pour les différents canaux furent les mêmes pour tout le processus d'imagerie. Les projections maximales ont été réalisées sur FIJI (National Institutes of Health). Pour les images, une dizaine de sections ont été analysées par animal et une photo a été prise par animal, avec le même objectif confocal; une résolution de 1024x1024 et une vitesse de 400ms.

## **II. Résultats : suractivation *in vitro* et *in vivo***

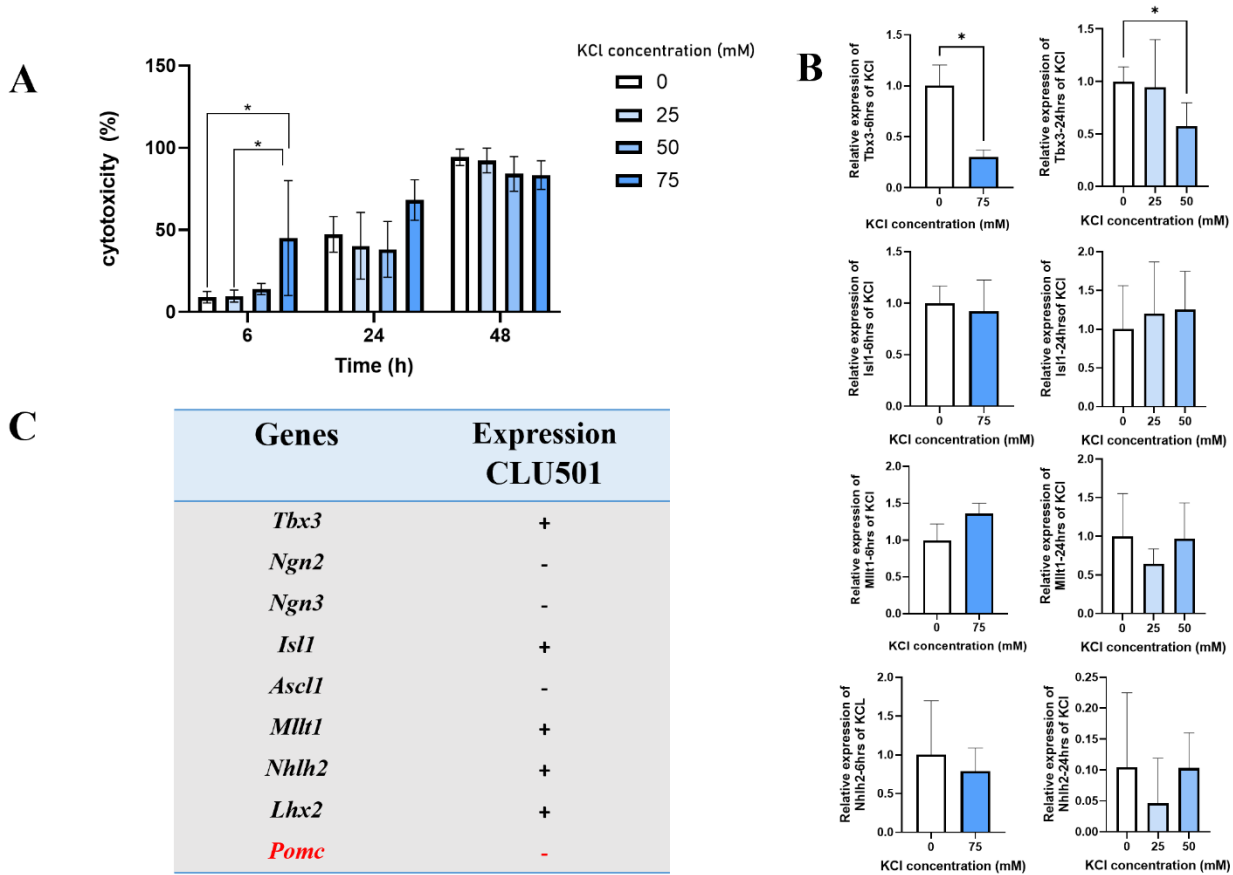
Afin de répondre à notre hypothèse que les neurones de la satiété Pomc sont capables de respécification en situation de stress métabolique, plusieurs techniques ont été testées et seront discutées dans cette section. Pour étudier la respécification hypothalamique, deux approches principales ont été utilisées : une approche *in vitro* et une approche *in vivo*. Il est important de mentionner qu'aucune de ces techniques n'était mise sur pied à mes débuts dans le laboratoire, alors la mise au point de celle-ci fût centrale à ma recherche.

### **Respécification *in vitro***

#### **Culture de neurones Pomc immortalisés**

En premier lieu, nous avons utilisé la culture immortalisée de cellules Pomc. La lignée cellulaire choisie est commercialement disponible chez Cerdalane® au nom de CLU501 et est établie à partir de neurones Pomc-GFP provenant de souris mâles transgéniques. La culture de neurones hypothalamiques Pomc immortalisées est très simple à réaliser et confère l'avantage d'obtenir des cellules en culture rapidement. Après

seulement quelques jours de culture, les cellules sont prêtes à être utilisées à des fins expérimentales. Nous avons décidé d'employer une méthode d'activation chimique avec du chlorure de potassium (KCl). Cette méthode d'activation n'est pas spécifique, mais comme notre type de culture est homogène, les neurones peuvent tous être traités en simultané. Le KCl est un ion favorisant la dépolarisation des neurones [124]. Nous sommes venus à tester différentes concentrations de KCl, selon différentes périodes afin d'identifier la meilleure combinaison pour suractiver les neurones Pomc immortalisés. 3 concentrations de KCl ont été testées: 25mM, 50mM et 75mM pendant des périodes de 6h, 24h et 48h. Ces doses et périodes ont été choisies selon la littérature [124], qui démontre que la réponse excitatrice au KCl varie en fonction de la concentration et de la durée. Pour définir la meilleure combinaison et nous assurer que les traitements au KCl n'étaient pas cytotoxiques, nous avons performé un test de cytotoxicité par mesure du lactate déshydrogénase (LDH). Ce test de cytotoxicité est basé sur la présence de LDH dans le milieu de culture cellulaire. La LDH est une enzyme stable présente dans le cytoplasme de toutes les cellules. Lorsque des cellules subissent un type de traitement susceptible de perturber leur membrane, la LDH est relâchée dans le milieu extracellulaire [125]. En récupérant leur milieu de culture, nous sommes en mesure de quantifier par colorimétrie le niveau de LDH contenu dans le liquide extracellulaire, qui est proportionnel au nombre de cellules ayant subi un stress cytotoxique.



**Figure 10:** Conséquence de la suractivation de neurones Pomc en culture immortalisée.

Validation de l'utilisation du modèle cellulaire CLU501 dans l'optique d'étudier la respecification de neurones Pomc. **A**, LDH mesurée par spectrophotométrie corrélant avec la cytotoxicité induite par la suractivation au KCl sur les neurones Pomc immortalisée pendant 6h, 24h et 48h (n=3), les analyses statistiques sont les résultats de 2 way anova + test de comparaison multiple tuckey, \* : p<0.05. **B**, expression relative des gènes *Tbx3*, *Isl1*, *Mlt1* et *Nhlh2* rapporté sur *hprt* (n=3), les analyses statistiques sont les résultats d'un unpaired t-test, \* : p<0.05. **C**, recensement des gènes exprimés (+) ou non (-) dans les cellules immortalisées CLU501 (n=3). Toutes les valeurs sont les résultats des moyennes ± SEM.

Selon les résultats de la **figure 10A**, les doses de 25mM, 50mM et 75mM pour une période de 48h étaient toutes létales pour les cellules immortalisées Pomc. Cependant les doses de 25mM et de 50mM pendant 24 h avaient une cytotoxicité sous les 50%, indiquant que le KCl a bien une action sur les neurones et que cette action semble suffisante pour activer les neurones sans causer trop de mort cellulaire. De plus, la dose de 75mM pendant 6 h induit une cytotoxicité sous les 50%, indiquant la même chose: un nombre significatif de cellules sont en vie, malgré le stress d'activation important. Afin de s'assurer qu'il y a

bel et bien de la suractivation des neurones immortalisés *Pomc*, il aurait été possible de réaliser un RT-qPCR pour le facteur de transcription c-Fos, un gène activé en premier lieu lorsque les neurones sont dépolarisés [34, 94]. Ces résultats soulèvent toutefois un questionnement important : pourquoi la mortalité cellulaire chez les cellules non traitées est-elle de 50% après 24h et de pratiquement 100% après 48h? Une hypothèse qui pourrait expliquer ceci serait que le milieu DMEM que nous utilisons est très riche en glucose (25mM) et que malgré qu'il s'agisse des recommandations du fournisseur, l'utilisation d'une telle concentration en glucose cause la toxicité.

Les répercussions de l'activation au KCl sur certains facteurs transcriptionnels connus des neurones *Pomc* furent mesurées par RT-qPCR (**figure 10B**). Aucune différence significative ne fut mesurée dans l'expression relative des gènes *Isl1*, *Mllt1*, *Nhlh2* lorsque les neurones *Pomc* immortalisés sont suractivés avec du KCl pour les doses de 25mM et de 50mM pendant 24 h ainsi que pour la dose de 75mM pendant 6 h. En revanche, la dose de 50mM pendant 24 h ainsi que la dose de 75mM pendant 6 h ont eu un effet significatif sur la diminution de l'expression du facteur de transcription *Tbx3*. Dans la littérature, il est reconnu que *Tbx3* est un facteur de transcription important dans la régulation des neurones *Pomc* et que la délétion artificielle de celui-ci entraîne la perte de l'expression du neuropeptide *Pomc* [66].

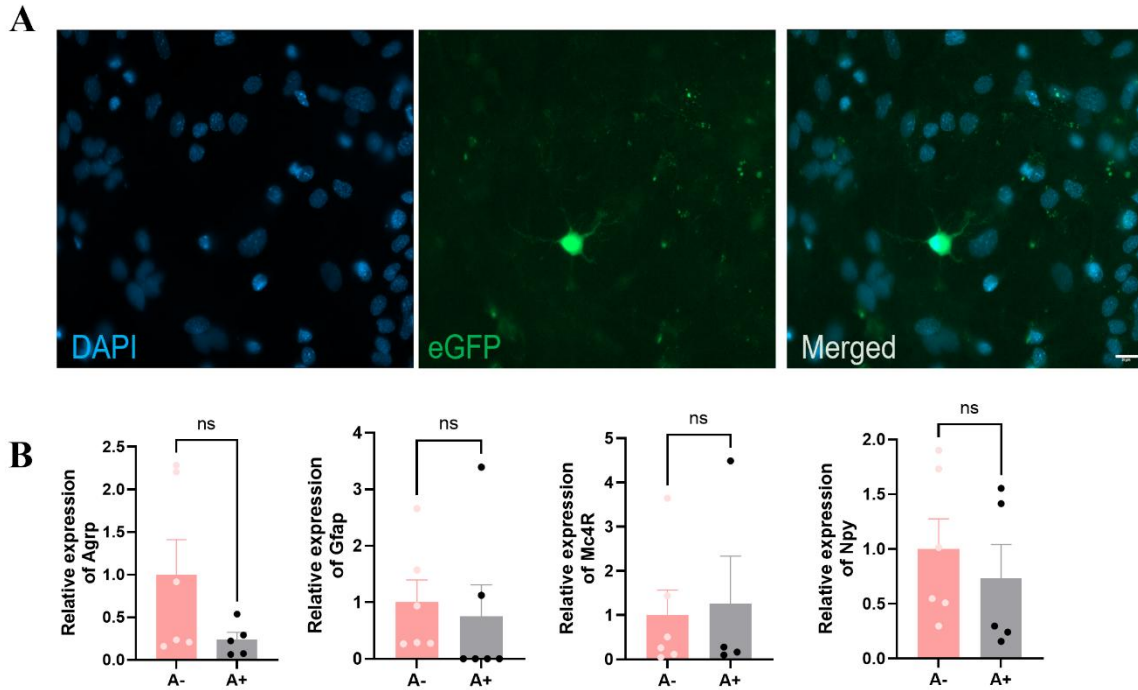
Puisque je travaillais avec une lignée cellulaire immortalisée, une caractérisation de ces cellules était de mise afin de comprendre quels facteurs sont exprimés (**figure 10C**). Ainsi j'ai pu observer la présence de nombreux facteurs de transcriptions importants pour les neurones *Pomc* tels que *Tbx3*, *Isl1*, *Mllt1*, *Nhlh2* et *Lhx2*. Toutefois, certains facteurs étaient absents et de manière importante, *Pomc* n'est pas exprimé dans les CLU501.

Bien qu'il soit possible d'observer une diminution significative de l'expression de *Tbx3* dans les neurones *Pomc* suractivés (**figure 10B**), il nous était impossible de valider la répercussion de cette diminution sur l'expression du neuropeptide *Pomc* (**figure 10C**). Ainsi nous avons été forcés de conclure que le modèle cellulaire immortalisé CLU501 ne reflète pas un portfolio génétique parfait et véritable des neurones *Pomc* matures. Comme discuté précédemment dans la section **II : Accent sur les neurones Pomc** à la **figure 4**, où l'on peut voir l'expression des facteurs identitaires en fonction du stade de croissance des neurones *Pomc*, nos résultats semblent faire correspondre les neurones CLU501 à une

période assez immature du développement des neurones, tout de suite après la neurodifférenciation, mais avant la maturation des circuits. De plus, les cellules immortalisées CLU501 sont capables de division cellulaire, une autre caractéristique les éloignant de la vraie nature des neurones *Pomc* matures. Devant ces faits, il était nécessaire d'établir un modèle cellulaire représentatif des neurones *Pomc*.

### **Culture de neurones hypothalamiques primaires**

Toujours dans le but de causer de la suractivation des neurones *Pomc*, la seconde méthode que nous avons mise sur pied est la culture hypothalamique primaire. Ce modèle offre de nombreux avantages, tout d'abord la culture primaire se rapproche de la nature des neurones. En second lieu, les neurones ne se diviseront pas, contrairement aux neurones hypothalamiques immortalisés CLU501. Cependant, la culture hypothalamique primaire a aussi un désavantage : cette culture est hétérogène, elle comprend un large éventail de différents neurones et non seulement des *Pomc*<sup>+</sup>. Considérant ceci, nous nous rapprochons de la réalité complexe des interactions neuronales, de leur environnement et de l'impact de cet ensemble sur la régulation de la balance énergétique. Pour mettre au point la technique de culture hypothalamique primaire, nous utilisons des souris *Pomc*-eGFP âgées entre 3 et 4 jours chez lesquelles nous venons isoler par différentes techniques de digestion et de séparation mécaniques des tissus, les cellules du tissu hypothalamique pour les mettre en culture. Il est important de noter que le modèle de souris pour la suractivation devra être différent des souris *Pomc*-eGFP afin de permettre une spécificité d'activation. En effet, puisque la culture primaire nous offre des cellules hétérogènes et que nous visons la suractivation des neurones *Pomc* seulement, une stratégie utilisant la chiomiogénétique est envisagée. Cependant, durant ma maîtrise, mon projet consistait en l'élaboration d'un protocole établissant la culture primaire, ainsi plus de détails concernant les modèles murins et techniques de suractivation spécifiques sont discutés plus tard dans le chapitre 1 : IV : ouverture.



**Figure 11:** Expression qualitative et quantitative de neurones *Pomc*<sup>+</sup> en culture primaire hypothalamique.

Quantification et observation qualitative de la présence de neurones *Pomc*<sup>+</sup> en culture hypothalamique primaire de souris *Pomc*-eGFP âgée entre 3 et 4 jours. **A**, marquage nucléaire des cellules hypothalamiques non traitées avec la Cytarabine (A -) avec DAPI et expression endogène de eGFP les images ont été acquises avec un microscope Zeiss Axio observer.Z1/7 et un objectif 40x/1,30 avec immersion à l'huile (n=1). **B**, expression relative des gènes *AgRP*, *Npy*, *Mc4R*, *Gfap*, rapportés sur *Hprt* pour les cellules traitées avec Cytarabine (A+) et non traitées avec Cytarabine (A -) (n=3), les analyses statistiques sont les résultats d'un unpaired t-test, ns :  $p > 0.05$ . Toutes les valeurs sont les résultats des moyennes  $\pm$  SEM. La barre d'échelle est de 20  $\mu$ m.

Par microscopie à fluorescence, nous avons observé la présence de cellules eGFP<sup>+</sup> dans les cultures primaires (**figure 11A**). Cette fluorescence correspond directement aux cellules *Pomc*<sup>+</sup>. Malheureusement, très peu de cellules eGFP<sup>+</sup> étaient observables comparativement aux nombres de cellules Dapi<sup>+</sup>. Le ratio de cellules eGFP<sup>+</sup> vs Dapi<sup>+</sup> n'a pas été quantifié, ceci aurait pu permettre d'obtenir des données plus précises sur la survie des neurones *Pomc*<sup>+</sup> en culture primaire. Cependant, ceci n'a pas été fait devant le trop peu de cellules *Pomc*<sup>+</sup> visibles.

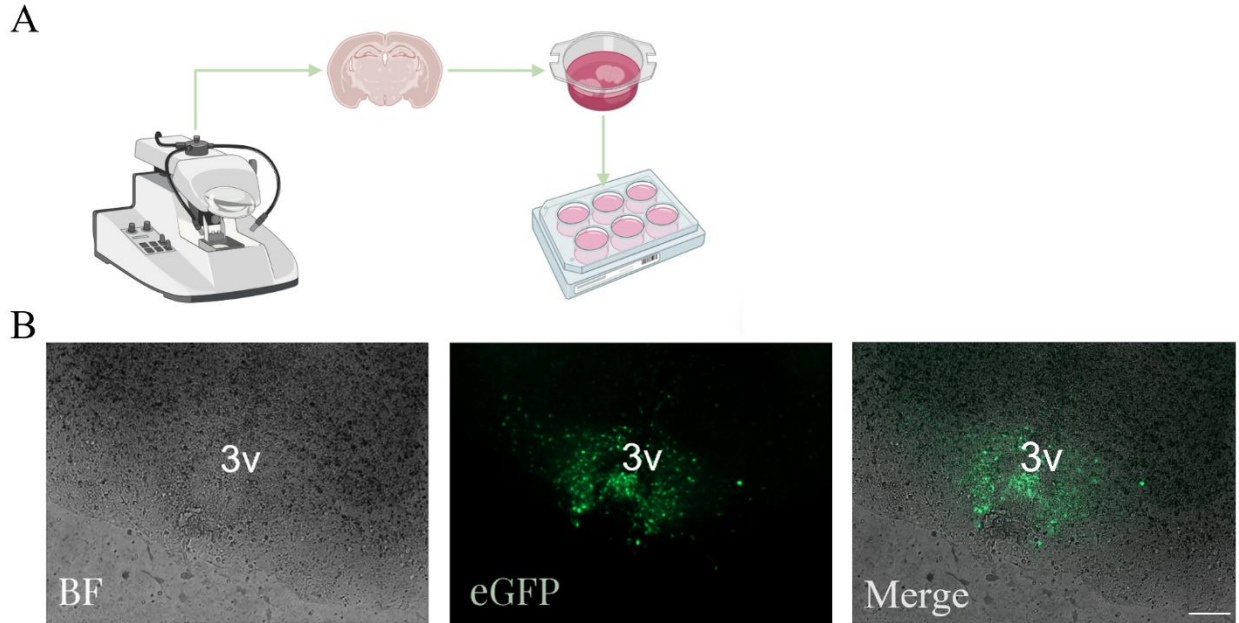
Il est important de rappeler que notre culture hypothalamique est mixte, par conséquent si nous désirons avoir seulement un type de cellules, comme les neurones, il

est possible d'utiliser un inhibiteur de division cellulaire rapide. L'inhibiteur que nous avons choisi est la Cytarabine (AraC), qui neutralise les cellules capables de division cellulaire, y compris les cellules gliales. Ainsi, nous souhaitons obtenir une culture cellulaire exclusive aux neurones. Par RT-qPCR, nous avons fait l'éventail des gènes exprimés avec ou sans l'inhibiteur AraC. Les cellules sont laissées pendant un minimum de 7 jours au repos avant de procéder à l'extraction d'ARN total, la transcription d'ADNc et le RT-qPCR. Comme il est observable à la **figure 11B**, aucune différence significative entre les cultures traitées et non traitées avec AraC, dans l'expression des gènes hypothalamiques *Argp*, *Npy*, *Mc4R* et *Gfap* a été observé. Nous avons également mesuré l'expression des gènes *Pomc*, *Cart* (*Cart* est typiquement exprimé conjointement avec *Pomc* dans les neurones de l'ARC [11, 66]) et *Gfp* dans les cultures primaires. Malheureusement, l'expression de ceux-ci n'était pas quantifiable. Il semble donc que la survie des neurones *Pomc* soit compromise lors de la préparation de culture hypothalamique primaire. Bien qu'il soit possible d'observer quelques neurones eGFP+ par microscopie, il est pratiquement impossible de quantifier l'expression relative de notre gène d'intérêt *Pomc* (ainsi que de ses gènes conjoints *Cart* et *Gfp*) par RT-qPCR.

### **Culture hypothalamique organotypique**

C'est ainsi que j'ai mis sur pied une troisième technique de culture cellulaire: la culture organotypique. Ce type de culture consiste à prendre un tissu frais et le mettre en culture, plutôt que d'en isoler les cellules. La culture organotypique confère l'avantage de préserver l'intégrité des communications entre les réseaux neuronaux et entre les cellules [126]. Mais tout comme la culture primaire, la culture organotypique est hétérogène. Afin de mettre au point la technique, nous isolons les tissus hypothalamiques de souris *Pomc-eGFP* âgées entre 3 et 4 jours, ces derniers sont mis en culture pour une période allant jusqu'à 21 jours. Durant cette période, nous souhaitons trouver les meilleurs paramètres (épaisseur de coupe hypothalamique, volume de média de culture, volume d'infection

lentiviral nécessaire) afin d'être en mesure d'utiliser des coupes de cerveaux pour de provoquer une suractivation spécifique des neurones Pomc.



**Figure 12** : Visualisation de la fluorescence eGFP des tissus hypothalamiques en culture organotypique.

Observation des tissus hypothalamiques *Pomc*-eGFP de 100µm en culture, après 3 jours post-coupe. **A**, schématisation de la réalisation de coupe organotypique : les cerveaux sont coupés avec un vibratome en tranches de 100 µm puis déposées dans des inserts pour plaques de culture avec puits. **B**, observation du tissu hypothalamique en culture organotypique en Bright Field (BF) et de la fluorescence eGFP en provenance des neurones Pomc. Les images ont été acquises avec un microscope à fluorescence Zeiss Axio observer.Z1/7 avec un objectif 5x (n=1). La barre d'échelle est de 200µm.

Dans la **figure 12**, il est possible d'observer la fluorescence eGFP en provenance des neurones Pomc de l'ARC hypothalamique d'une tranche de cerveau de 100µm après 3 jours de culture. Plus de données restent à obtenir afin de confirmer la durée de vie des coupes organotypiques. L'obtention d'un microscope confocal muni d'un support pour plaque ainsi que d'un incubateur va nous permettre de faire de l'imagerie en temps réel. De plus, devant la difficulté à identifier des zones hypothalamiques sur une coupe de 100µm, nous avons également décidé de tester d'autres épaisseurs soit de 110 µm, 225µm

et 300µm. Nous pensons qu'une coupe plus épaisse permettrait de mieux conserver l'intégrité des tissus.

Il est évident que l'optimisation de la culture organotypique n'est pas finalisée et que beaucoup est encore à faire. En premier lieu, établir l'épaisseur de coupe idéale pour prolonger la survie du tissu est primordial. Il est important que cette épaisseur permette une visualisation de la fluorescence endogène. En second lieu, il serait intéressant de valider la survie cellulaire des coupes hypothalamique en culture en quantifiant l'expression relative par RT-qPCR de certains marqueurs d'apoptose (comme Caspase3 par exemple) sur des coupes de tissus fraîchement coupées vs des coupes de tissus datant de différents jours, par exemple 3, 7, 15, 21 jours. Une fois l'optimisation terminée, les manipulations d'activation des neurones Pomc pourront débuter. Puisque la culture organotypique est hétérogène, un modèle différent devra être utilisé afin de permettre une activation neuronale spécifique. Plus de détails sur ce modèle est discuté dans le chapitre 1 : IV ouverture.

Ainsi, au cours de ma maîtrise, j'ai eu l'opportunité de développer 3 techniques de culture cellulaire qui sont couramment utilisées par mes collègues pour d'autres projets du laboratoire en plus des miens. Il reste encore beaucoup à faire pour étudier les effets d'une suractivation des neurones Pomc. Toutefois, bien que le modèle de culture cellulaire immortalisée ne soit pas représentatif des neurones Pomc matures, nous avons réussi à observer qu'une suractivation chronique était suffisante pour perturber l'expression du facteur transcriptionnel *Tbx3*. Également, la culture hypothalamique primaire fonctionne, mais la survie des neurones Pomc semble être compromise lorsqu'on les visualise par microscopie et la technique de quantification génomique reste à être optimisée. Finalement, la culture hypothalamique organotypique semble très prometteuse et permet notamment de prolonger la longévité de la culture. Lorsque la technique sera optimisée pour la conservation des tissus, nous serons en mesure de procéder aux premières infections lentivirale afin de causer une suractivation *in vitro* spécifiquement aux neurones Pomc+.

### Respécification *in vivo*

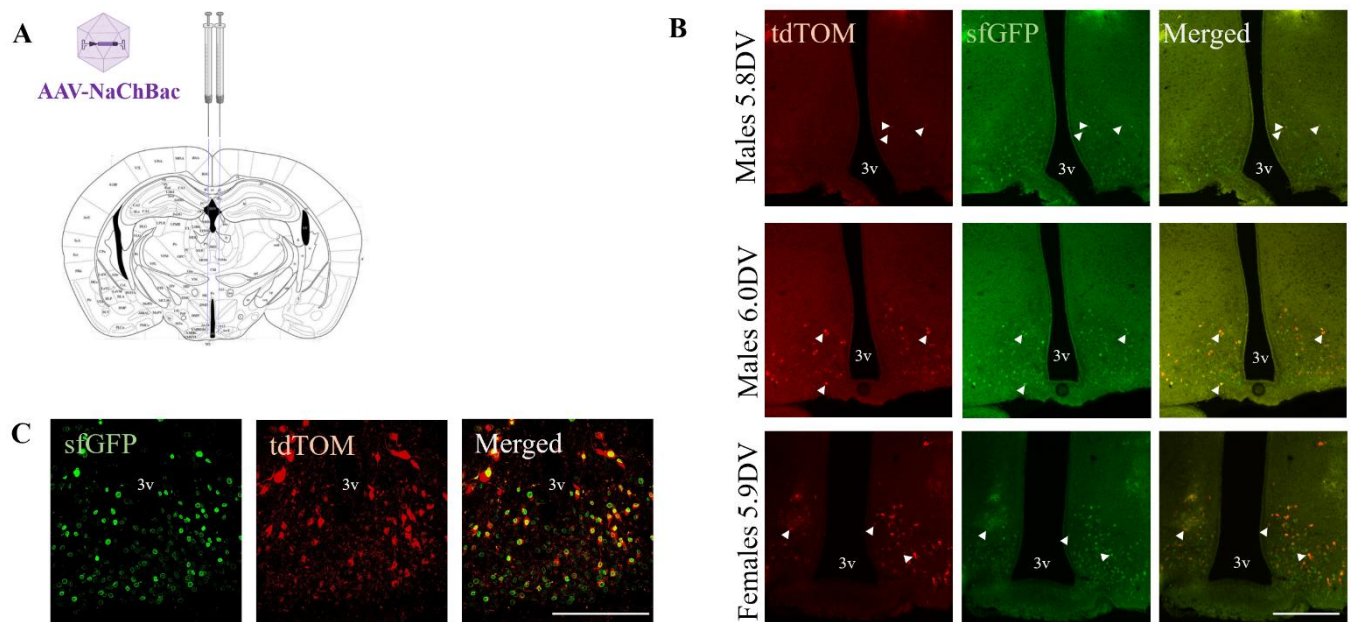
La seconde portion de ce projet consiste à étudier la respécification des neurones Pomc *in vivo*. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche de suivi de lignée cellulaire,

afin de suivre le devenir des neurones Pomc<sup>+</sup> au fil du temps. Le modèle murin employé, *Pomc-Cre;Sun1-sfGFP* repose sur une stratégie génétique dans laquelle les neurones exprimant Pomc activent spécifiquement une recombinaise appelée Cre. Cette enzyme permet l'expression d'un marqueur fluorescent, sfGFP (green fluorescent protein superfolder), localisé à la surface de la membrane nucléaire (grâce à la protéine membranaire Sun1) des neurones Pomc<sup>+</sup>, et ce dès la naissance. Ce modèle permet donc de localiser précisément les neurones dans l'hypothalamus. Toutefois, il est important de comprendre que ce modèle ne permet pas de distinguer les neurones qui expriment actuellement le neuropeptide Pomc de ceux qui l'ont exprimé de façon transitoire par le passé. En effet, une fois la recombinaison Cre effectuée, l'expression de la sfGFP devient permanente, même si la cellule cesse par la suite d'exprimer Pomc. C'est pourquoi nous avons recours à une approche virale complémentaire, afin d'activer de manière spécifique les neurones qui sont Pomc<sup>+</sup> au moment de l'injection.

Avec l'expression de la Cre recombinaise dans ces neurones, nous avons ciblé spécifiquement les neurones Pomc<sup>+</sup> avec des virus adéno-associés (AAV) porteurs soit d'un canal sodique voltage-dépendant, NaChBac (AAV-NaChBac), soit d'un virus contrôle exprimant uniquement un fluorophore tdTomato (AAV-CTRL). Cette spécificité est rendue possible par l'utilisation d'un FLEX (*Flip-Excision*), aussi appelé DIO (*Double-floxed Inverted Orientation*), intégré dans la construction des AAV. Ce système repose sur une configuration génétique inversée du gène viral d'intérêt, encadrée par des sites de recombinaison reconnus par la Cre. Puisque l'infection virale peut se faire dans toutes les cellules où l'injection a lieu, seule la présence de la Cre recombinaise dans les neurones Pomc<sup>+</sup> permet l'inversion et l'activation stable du transgène, ici l'expression de NaChBac et de tdTomato (AAV-NaChBac) ou de dtTomato (AAV-CTRL) seulement, assurant une expression strictement ciblée. NaChBac est un canal sodique voltage-dépendant procaryote issu de la bactérie *Bacillus halodurans*, qui permet une entrée de sodium constante lorsqu'il est exprimé dans les neurones [127]. Ainsi, une infection virale avec NaChBac ajoute des canaux Na<sup>+</sup> dépendant du voltage à la surface des synapses des neurones qui sont positifs à la Cre recombinaise seulement, causant une activation quasi constante des neurones infectés [127].

Maintenant que le principe derrière le modèle murin est plus clair, en quoi consiste une chirurgie stéréotaxique?

Les coordonnées stéréotaxiques sont des valeurs numériques qui délimitent les zones antéro-postérieures (AP), médio-latérales (ML) et dorso-ventrales (DV) du cerveau. Ces valeurs permettent de localiser avec précision une structure dans le cerveau en se basant sur un repère anatomique, typiquement le bregma, le point de jonction entre les os pariétaux et la suture sagittale du crâne. Ensuite, on utilise les coordonnées pour guider une seringue vers une région cérébrale précise, dans notre cas : l'ARC.



**Figure 13 :** Validation du site d'injection viral par chirurgie stéréotaxique chez des souris *Pomc-Cre; Sun1-sfGFP*.

Optimisation du site d'injection hypothalamique chez des souris *Pomc-Cre; Sun1-sfGFP* mâles et femelles et validation de l'expression de la fluorescence émise par sfGFP et tdTomato. **A**, représentation schématisée de l'administration virale dans l'ARC hypothalamique. **B**, observation de l'émission de la fluorescence émise par l'infection virale tdTomato pour les distances ventrales (DV) de 5.8 (n=4) et 6.0 (n=4) chez les mâles et 5.9 (n=4) chez les femelles avec un objectif de 20x, la barre d'échelle est de 200  $\mu$ m. Les flèches pointent vers un exemple de cellules positives soit pour tdTomato, sfGFP ou bien les deux. **C**, observation de la fluorescence sfGFP émise par les neurones *Pomc*+ ainsi que la colocalisation de l'expression virale tdTomato, les images ont été acquises avec un microscope confocal Leica SP-8 et un objectif de 40x/1.30 avec immersion à l'huile, la barre d'échelle est de 200  $\mu$ m.

Puisque la technique de chirurgie stéréotaxique n'était pas encore implantée dans le laboratoire, j'ai participé activement à sa mise au point.

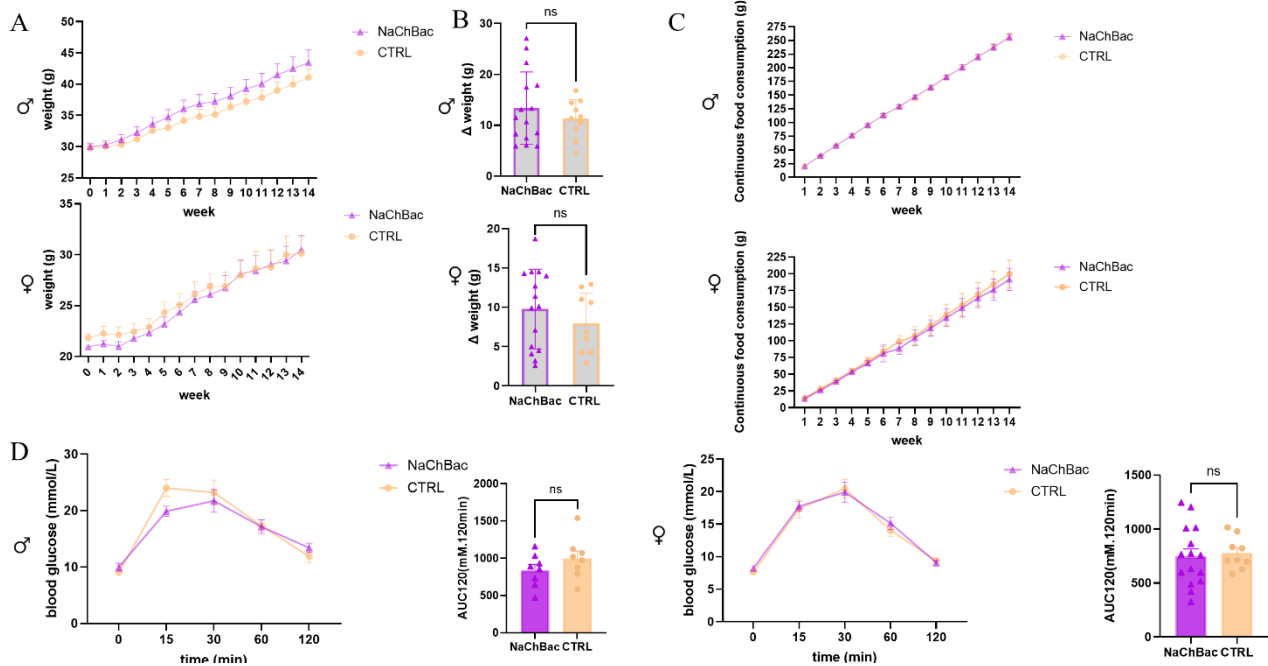
En premier lieu, puisqu'il existe des variabilités anatomiques en fonction de l'épaisseur du crâne et du sexe, il fallait valider le site d'injection hypothalamique. Pour ce faire, 8 souris mâles ont été divisées en deux groupes recevant soit une injection bilatérale à la coordonnée 5.8DV ou 6.0DV. Également, un groupe de 4 souris femelles ont reçu une injection bilatérale à 5.9DV. En plus de valider le fonctionnement du modèle murin et du virus, ces tests nous ont permis de choisir un site d'infection optimal afin que le virus soit injecté près de la zone d'intérêt (**figure 13B**).

Pour les mâles, nous avons déterminé qu'il était préférable d'injecter le virus à 5.9DV, une position intermédiaire entre 5.8 et 6.0DV (**figure 13B**). Nous avons choisi cette position afin de respecter une distance sécuritaire dans la face ventrale hypothalamique et pour éviter d'endommager le tissu du noyau arqué.

Bien que pour les femelles l'injection de 5.9DV semble atteindre la région hypothalamique (**figure 13B**), une distance de 5.8DV fut choisie afin de maintenir une distance sécuritaire avec l'ARC. Cette décision a été prise considérant que les femelles sont plus petites que les mâles et que la largeur de leur tête demandait davantage d'ajustement sur l'appareil stéréotaxique.

Finalement, on constate la présence de sfGFP localisée dans l'ARC, validant le modèle murin *Pomc-Cre; Sun1-sfGFP* qui doit être uniquement spécifique aux neurones de lignées *Pomc* (**figure 13C**). De plus, nous sommes en mesure de valider la spécificité des infections virales par l'expression de tdTomato qui colocalise avec les neurones *Pomc*<sup>+</sup> marqués en vert (**figure 13C**). Afin d'éviter toute activation neuronale non spécifique, il est impératif que l'activation neuronale induite par les AAV soit restreinte aux neurones *Pomc*<sup>+</sup>. Comme le montrent nos résultats à la **figure 13C**, l'infection est majoritairement restreinte aux cellules *Pomc-Cre*<sup>+</sup> par l'observation de la colocalisation entre sfGFP et tdTomato. Bien que la colocalisation entre sfGFP et tdTomato ne soit pas parfaite, il est possible que l'expression virale de tdTomato soit présente en dehors des neurones sfGFP<sup>+</sup>. En soi cela pourrait représenter une limitation du modèle et il est ainsi important d'apporter une attention particulière à ceci lorsque nous analysons nos résultats. Puisque nous désirons étudier la suractivation des neurones *Pomc*<sup>+</sup> (qui expriment sfGFP) avec l'utilisation du

virus (exprimant le rapporteur tdTomato), nous allons faire un suivi de l'expression peptidique Pomc par immunofluorescence seulement sur les neurones exprimant les deux marqueurs. Ainsi, tous neurones exprimant le rapporteur viral tdTomato seul sans co-expression avec sfGFP ne seront pas inclus dans nos analyses.



**Figure 14 :** suivi hebdomadaire des phénotypes post-chirurgie stéréotaxique avec infection de AAV-NaChBac ou CTRL des souris *Pomc-Cre; Sun1-sfGFP*.

Données des suivis hebdomadaires du poids, de la consommation alimentaire ainsi que du GTT des souris ayant reçu une injection virale NaChBac ou CTRL de façon unie ou bilatérale. **A**, suivi du poids hebdomadaire entre les mâles NaChBac vs CTRL et entre les femelles NaChBac vs CTRL. Les analyses statistiques sont les résultats de Two-Way Anova+Sidak. **B**, prise de poids relative des souris mâles NaChBac vs CTRL et des souris femelles NaChBac vs CTRL entre la première semaine de HFHS et la 14<sup>e</sup>. Les analyses statistiques sont les résultats d'unpaired T-test two tailed, ns :  $p > 0.05$ . **C**, suivi hebdomadaire de la consommation de nourriture HFHS des souris mâles NaChBac vs CTRL et des souris femelles NaChBac vs CTRL. Les analyses statistiques sont les résultats de Two-Way Anova+Sidak. **D**, effets de l'injection intrapéritonéale d'une solution de glucose 30% après 4h de jeûne sur les souris mâles et femelles NaChBac vs CTRL. Les analyses statistiques sont les résultats de Two-Way Anova+Sidak, ns :  $p > 0.05$ . Toutes les valeurs sont les résultats des moyennes  $\pm$  SEM, un minimum de 9 animaux par groupe a été utilisé.

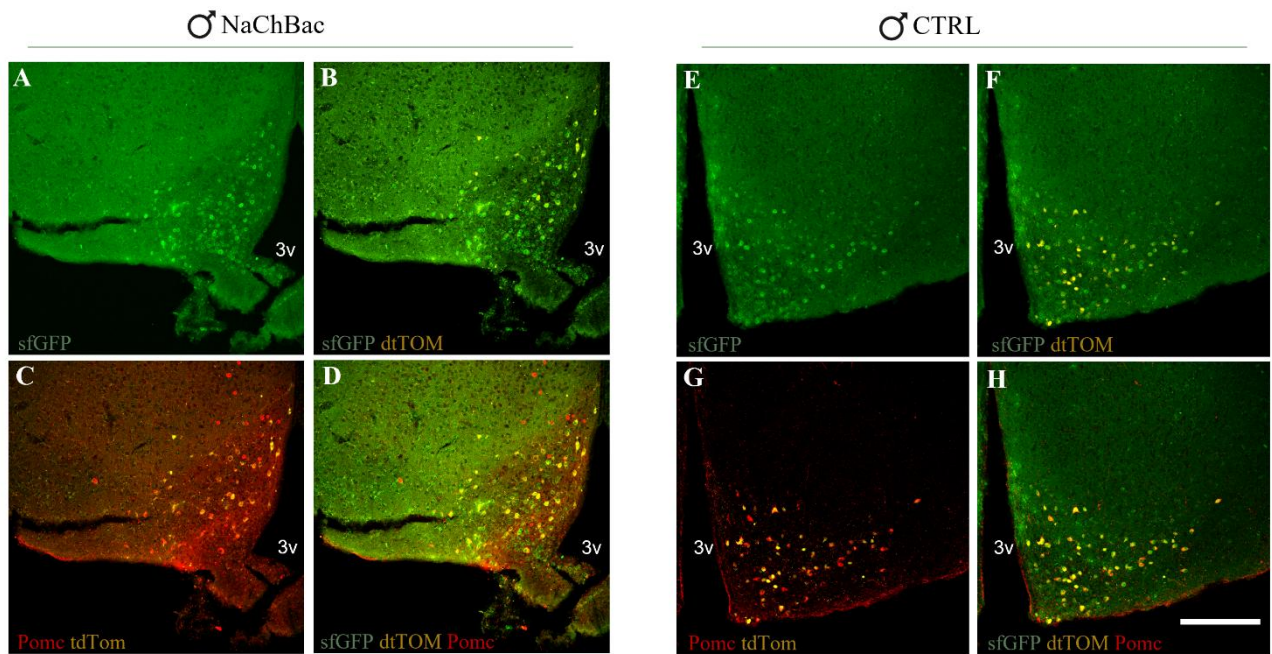
Avec les sites d'injection confirmés, les groupes expérimentaux ont été lancés. 15 souris mâles *Pomc-Cre; Sun1-sfGFP* ont reçu une injection bilatérale de 500nl de virus AAV-NaChBac tandis que 10 souris mâles *Pomc-Cre; Sun1-sfGFP* ont reçus une injection

bilatérale de 500nl de AAV-CTRL. 15 souris femelles *Pomc-Cre; Sun1-sfGFP* ont reçu 500nl de virus bilatérale AAV-NaChBac et 9 autres *Pomc-Cre;Sun1-sfGFP* le virus AAV-CTRL.

Suivant la chirurgie stéréotaxique, les souris ont été surveillées pendant 7 jours afin de s'assurer qu'il n'y avait aucun signe de douleur lié aux chirurgies. Les souris ont ensuite été placées sous une diète riche en graisses et en sucre (HFHS) pendant 14 semaines. De façon hebdomadaire, nous avons suivi le poids des souris, ainsi que de leur consommation alimentaire (**figure 14A-B-C**) afin de comparer ces paramètres entre les groupes AAV-NaChBac et AAV-CTRL d'un même sexe. Aucune différence significative ne fut observée pour la masse corporelle ni pour la consommation alimentaire chez les mâles ayant reçu ou non un virus AAV-NaChBac, idem chez les femelles. Bien que nous avons vérifié les effets métaboliques de la suractivation des neurones *Pomc*<sup>+</sup> par l'administration du virus AAV-NaChBac sur le phénotype (masse corporelle) et sur le comportement (consommation alimentaire) des souris, il est connu dans la littérature que l'activation unique des neurones *Pomc* n'a pas tendance à fournir de grand effet sur le métabolisme puisque le cerveau fonctionne avec des signaux logiques et cohérents en provenance de plusieurs populations neuronales en même temps, en particulier des neurones *Agrp* [128]. Dans une condition métabolique saine, lorsque les neurones *Pomc* sont suractivés, les neurones *Agrp* sont inhibés et vice-versa. Dans notre modèle, nous utilisons l'activation des neurones *Pomc* sans intervenir dans le signal des neurones *Agrp*, ce qui est incohérent pour le cerveau. Ceci pourrait expliquer le fait que nous n'observons pas de différence significative entre nos groupes AAV-NaChBac et AAV-CTRL mâles et femelles. Il est important de préciser que notre modèle est cependant approprié pour l'étude que nous désirons faire : regarder les effets d'une suractivation des neurones *Pomc* hypothalamiques sur leur identité.

À la fin du protocole, nous avons réalisé un test de résistance au glucose (GTT) sur les souris *Pomc-Cre; Sun1-sfGFP*. Ce test permet de détecter des irrégularités dans l'homéostasie du glucose [129]. Pour ce faire, les souris sont privées de nourriture et placées dans le local d'expérimentation 4 heures avant le début du GTT. Ceci permet aux souris d'être acclimatées à l'environnement afin de réduire l'effet de la réponse au stress sur la lecture du glucose, en plus d'éviter que les souris consomment de la nourriture avant le test. La première mesure de glucose est prise juste avant l'injection de la solution de

30% de glucose (temps 0, **figure 14D**). Les souris sont ensuite injectées avec la solution de 30% de glucose, et les mesures de glucose sont prises à 15, 30, 60 et 120 minutes suivant celle-ci (**figure 14D**). Il est intéressant de constater que pour les mâles ayant reçu le virus AAV-NaChBac, la première réponse au glucose est plus faible comparativement aux souris AAV-CTRL (**figure 14D**). Bien que la différence soit non significative, cette tendance à la baisse de la réponse pourrait s'expliquer par l'effet protecteur provenant de la suractivation des neurones Pomc par le virus. Chez les femelles, aucune différence n'est observée entre les deux groupes viraux (**figure 14D**). Il est en effet plus difficile de mesurer les variations du glucose chez les femelles à cause des variations importantes des hormones sexuelles, telles que l'estrogène, qui sont connues pour exercer une influence sur l'homéostasie du glucose [129, 130]. On remarque également que contrairement aux mâles AAV-NaChBac, les femelles AAV-NaChBac ne semblent pas bénéficier d'une protection provenant de la suractivation des neurones Pomc sur leur homéostasie du glucose.



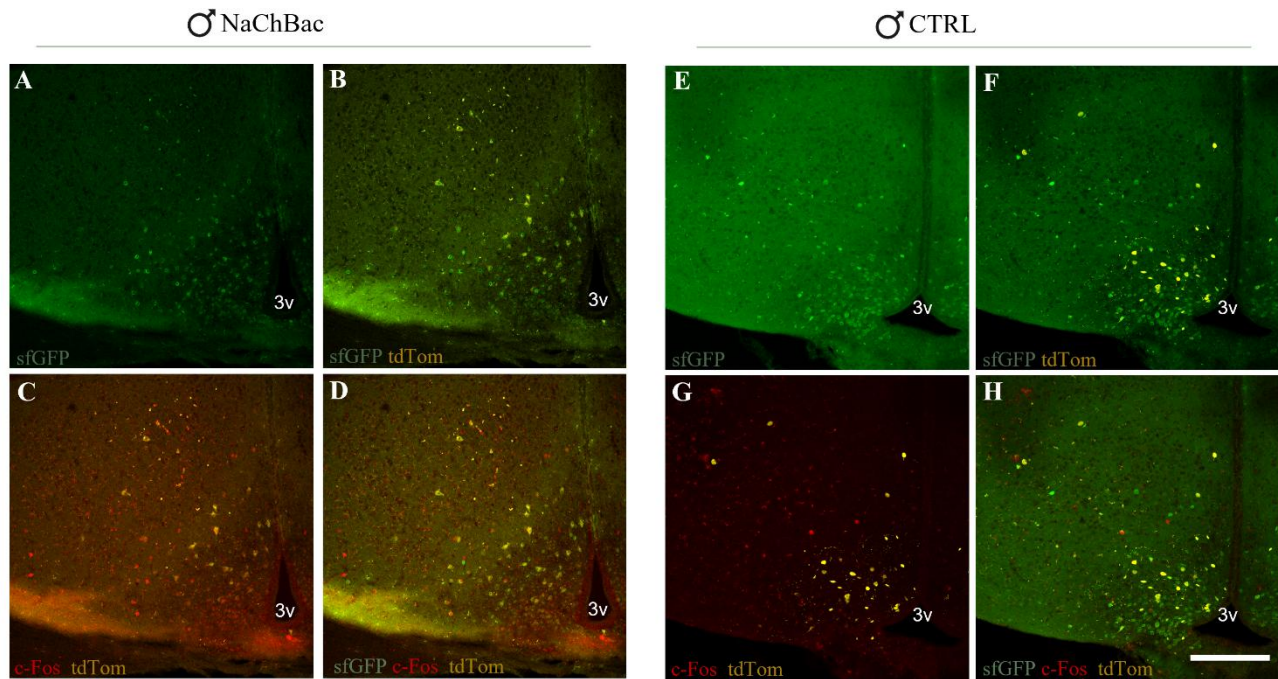
**Figure 15** : Expression de la protéine Pomc in vivo après 14 semaines HFHS chez les souris *Pomc-Cre; Sun1-sfGFP* mâles ayant reçu soit le virus AAV-NaChBac ou le virus AAV-CTRL.

Images représentatives de l'expression de la sfGFP (endogène depuis la naissance), tdTomato (expression virale) et *Pomc* (immunofluorescence). **A-D**, souris NaChBac. **A**, observation de l'expression de sfGFP (en vert) depuis la naissance. **B**, observation de l'expression de sfGFP (en vert) avec l'expression virale dtTomato (en jaune). **C**, observation de

l'expression par immunofluorescence du neuropeptide *Pomc* (en rouge) avec l'expression virale tdTomato après 14 semaines de HFHS. **D**, colocalisation entre l'expression de sfGFP, tdTomato, et *Pomc*. **E-H**, souris CTRL. **E**, observation de l'expression de sfGFP (en vert) depuis la naissance. **F**, observation de l'expression de sfGFP (en vert) avec l'expression virale dtTomato (en jaune). **G**, observation de l'expression par immunofluorescence du neuropeptide *Pomc* (en rouge) avec l'expression virale tdTomato après 14 semaines de HFHS. **H**, colocalisation entre l'expression de sfGFP, tdTomato, et *Pomc*. **A-D**, n=9. **E-H**, n=8. La barre d'échelle est de 200  $\mu$ m.

À la fin des 14 semaines, les souris ont été sacrifiées par perfusion (17 mâles, 9 femelles) à des fins d'imageries par immunofluorescence ou bien par décapitation (8 mâles, 15 femelles) à des fins d'analyses transcriptomiques. Parmi les souris perfusées, nous avons vérifié si l'infection est bilatérale et si la suractivation virale s'est produite. Nous avons marqué les tranches de cerveaux avec un anticorps anti-*Pomc* (**figure 15**) ou anti-*c-Fos* (**figure 16**). Avant d'aller plus loin dans nos résultats, rappelons que notre hypothèse est que l'activation chronique des neurones *Pomc* pourrait promouvoir leur respécification. Ainsi, dans le groupe NaChBac, nous retrouverions moins de neurones exprimant *Pomc* que dans le groupe contrôle, de plus la possibilité de mort cellulaire causée par l'activation pourra être observée par la présence ou l'absence du rapporteur sfGFP. Quant au marqueur d'activation neuronale *c-Fos*, celui-ci devrait se retrouver de manière systématique dans les neurones infectés, en plus des autres neurones normalement activés hors infection.

Nous avons marqué les coupes hypothalamiques provenant de souris *Pomc-Cre;Sun-sfGFP* avec un anticorps anti-*Pomc*. Les souris transgéniques expriment la sfGFP dans les neurones *Pomc*<sup>+</sup> dès la naissance (**figure 15A** et **figure 15E**). Les deux virus, AAV-NaChBac et AAV-CTRL, expriment tdTomato lorsque l'infection cellulaire est un succès, encore une fois nous avons validé la spécificité d'infection virale par l'expression de tdTomato restreinte là où est exprimé sfGFP (**figure 15B** et **figure 15F**). S'en est suivi la comparaison qualitative de l'expression de la protéine *Pomc* entre les groupes AAV-NaChBac et AAV-CTRL (**figure 15C** et **figure 15G**). Les observations faites nous permettent de valider la spécificité des virus pour les neurones *Pomc*<sup>+</sup>. Pour l'instant, les cellules positives à la protéine *Pomc* n'ont pas été quantifiées autrement que qualitativement. Avec l'aide de mes collègues, nous sommes présentement en train de comparer différents logiciels permettant de compter des cellules afin de procéder aux comparaisons de neurones *Pomc*<sup>+</sup> entre les groupes NaChBac et contrôles.



**Figure 16** : Expression de la protéine *c-Fos* in vivo après 14 semaines HFHS chez les souris *Pomc-Cre; Sun1-sfGFP* mâles ayant reçu soit le virus AAV-NaChBac ou le virus AAV-CTRL.

Images représentatives de l'expression de la sfGFP (endogène depuis la naissance), tdTomato (expression virale) et *c-Fos* (immunofluorescence). **A-D**, souris NaChBac. **A**, observation de l'expression de sfGFP (en vert) depuis la naissance. **B**, observation de l'expression de sfGFP (en vert) avec l'expression virale dtTomato (en jaune). **C**, observation de l'expression par immunofluorescence du neuropeptide *c-Fos* (en rouge) avec l'expression virale tdTomato après 14 semaines de HFHS. **D**, colocalisation entre l'expression de sfGFP, tdTomato, et *c-Fos*. **E-H**, souris CTRL. **E**, observation de l'expression de sfGFP (en vert) depuis la naissance. **F**, observation de l'expression de sfGFP (en vert) avec l'expression virale dtTomato (en jaune). **G**, observation de l'expression par immunofluorescence du neuropeptide *c-Fos* (en rouge) avec l'expression virale tdTomato après 14 semaines de HFHS. **H**, colocalisation entre l'expression de sfGFP, tdTomato, et *c-Fos*. **A-D**, n=9. **E-H**, n=8. La barre d'échelle est de 200  $\mu$ m.

En ce qui concerne l'immunomarquage avec l'anticorps anti-*c-Fos* (**figure 16**), on remarque qualitativement que l'expression de *c-Fos* est plus importante chez les souris mâles AAV-NaChBac que les AAV-CTRL. Cependant, tout comme pour l'immunomarquage anti-*Pomc*, les cellules doubles positives pour *c-Fos* et tdTomato n'ont pas été quantifiés autrement que qualitativement. On observe une colocalisation pour le marqueur *c-Fos* et tdTomato chez les souris AAV-NaChBac, alors que ceci n'est pas observé chez les souris AAV-CTRL, indiquant que le virus AAV-NaChBac active les

neurones infectés et que cet effet ne se retrouve pas chez les neurones infectés par AAV-CTRL. Il sera important d'également quantifier les cellules doubles positives c-Fos<sup>+</sup> et tdTomato<sup>+</sup> dans les deux groupes de souris afin de comparer l'activation des neurones.

Il reste encore beaucoup à faire pour ce projet. En plus de terminer les analyses des expressions des niveaux de la protéine Pomc et c-Fos, nous aimerions valider la réussite des infections bilatérales afin de classer les souris dans les bons groupes expérimentaux et/ou d'être en mesure d'écarter des souris du protocole afin d'augmenter la puissance statistique. Finalement, rappelons que nous avons toujours 8 mâles et 15 femelles chez lesquelles nous avons recueilli les hypothalamus à des fins d'analyses transcriptomiques. L'étude génomique des gènes *Pomc*, *tdTomato* et *c-Fos* viendra confirmer les analyses de colocalisation par imagerie. De plus, ceci nous permettra de mesurer plus précisément l'expression du gène *Pomc* afin de confirmer sa diminution d'expression chez les souris AAV-NaChBac .

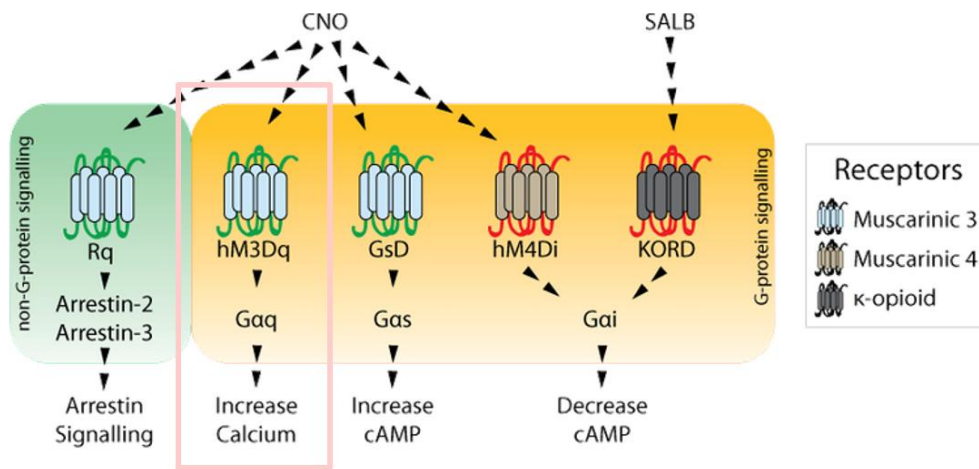
#### IV.Ouverture

Il reste encore beaucoup de chemin à parcourir pour vérifier si l'activation chronique des neurones Pomc hypothalamique provoque leur respécification. Cependant, notre travail a permis d'identifier, de mettre au point, et de valider les meilleures techniques pour y parvenir. *In vitro*, la culture organotypique présente de nombreux avantages par rapport aux techniques plus conventionnelles, telles que les cultures immortalisées ou primaires. Avec la culture organotypique, l'intégrité des neurones Pomc et de leurs connexions avec d'autres neurones dans des régions hypothalamiques adjacentes, comme les neurones Mc4R<sup>+</sup> du PVN, est préservée. En revanche, comme nous l'avons déjà souligné, cette culture est composée de cellules hétérogènes. Ainsi, une fois que les détails techniques (épaisseur de coupe et la durée de vie des tranches en culture) seront parfaitement maîtrisés, une lignée murine différente des *Pomc*-eGFP devra être utilisée afin de permettre une spécificité d'activation neuronale. À cette fin, la lignée murine *Pomc*-Cre;*Pomc*-eGFP sera employée. Dans ce modèle, la Cre recombinase sera active seulement dans les neurones Pomc<sup>+</sup> afin de permettre une action virale. Contrairement au modèle *Pomc*-Cre; *Sun1*-sfGFP, la fluorescence eGFP n'est pas induite par l'activité de la Cre

recombinase mais est ici exprimée de manière endogène aux neurones Pomc+, directement sous le contrôle du promoteur Pomc. Ce sera l'activité de la Cre recombinase sous contrôle du promoteur Pomc qui permettra d'induire l'activation neuronale par l'utilisation d'un système contrôlé par DREADD (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*). Cette technologie chimiogénétique permet d'activer un type de récepteur spécifique (à l'aide d'un traitement ou d'une drogue) selon la construction du lentivirus couplé avec le modèle murin transgénique [131].

Dans notre cas, le modèle murin sera *Pomc-Cre;Pomc-eGFP* et le lentivirus est Lenti-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry. Lorsque les cellules *in vitro* des souris *Pomc-Cre;Pomc-eGFP* seront infectées avec notre lentivirus DREADD, les cellules exprimant la recombinase Cre exprimeront les récepteurs à protéine Gq, des récepteurs muscariniques modifiés. L'ajout d'une drogue comme la clozapine-N-oxyde (CNO) permettra l'activation spécifique des récepteurs à protéine Gq, provoquant une relâche accrue du Ca<sup>2+</sup>, conduisant à une dépolarisation neuronale [131]. Encore une fois notre méthode d'activation neuronale est munie d'un système FLEX/DIO intégré dans la construction du DREADD. Ce système repose sur une configuration génétique inversée du gène viral d'intérêt, encadrée par des sites de recombinaison reconnus par la Cre. Puisque l'infection virale peut se faire dans toutes les cellules, seule la présence de la Cre recombinase dans les neurones Pomc+ permet l'inversion et l'activation stable du transgène, ici l'expression du DREADD activateur (Gq) et de la fluorescence mCherry assurant une expression strictement ciblée.

Finalement, l'utilisation de ce système combinant souris transgénique et activation chimiogénétique va permettre de faire un suivi dans le temps de la fluorescence eGFP. Nous pensons que celle-ci sera amenée à disparaître au moment où la respécification des neurones se produit, alors que la fluorescence mCherry en provenance de l'expression du transgène va demeurer. De plus, nous aimerions pousser davantage nos analyses et venir étudier la fonction mitochondriale des neurones Pomc ayant été suractivés. Comme mentionné dans l'introduction, les mitochondries des neurones Pomc sont influencées par le stress métabolique induit par une alimentation hypercalorique soutenue [55, 56, 77]. Ainsi nous voulons venir étudier si une perte de fonction mitochondriale dans les neurones Pomc est la cause de leur perte d'efficacité.



**Figure 17 :** Schématisation du fonctionnement de la technologie chimiogénétique DREADD.

Légende : figure provenant du site internet *Genetic Engineering & Biotechnology News (2018)* [132]. L'encadré rose représente le type de récepteurs à protéine G qui sera activé par la CNO.

*In vivo*, nos résultats montrent peu de différences dans les phénotypes entre les groupes AAV-NaChBac et AAV-CTRL, tant chez les mâles que chez les femelles. Nous avons initialement émis l'hypothèse que les souris AAV-NaChBac consommeraient moins de nourriture au début du régime HFHS par rapport aux souris AAV-CTRL. Cette différence aurait pu être causée par une activation intense des neurones Pomc induite par le virus, suivie d'une phase de respecification où les souris AAV-NaChBac augmenteraient leur consommation alimentaire de manière compensatoire pour rejoindre le comportement des souris AAV-CTRL, identifiant ainsi le moment où se produit la respecification. Cependant, un article publié entretemps suggère que l'activation des neurones Pomc seuls ne permet pas de diminuer la prise alimentaire dans un contexte d'obésité [133].

Nos données révèlent qu'il n'existe aucune différence phénotypique significative entre les deux groupes. Cette absence de différences pourrait s'expliquer par le rôle critique d'une communication cohérente entre les neurones Pomc et Agrp. Nos résultats renforcent l'importance de l'interaction synergique entre ces deux populations neuronales. Ainsi, l'intégration contraire, mais simultanée des signaux périphériques par les neurones de la faim (Agrp) et de la satiété (Pomc) est essentielle pour maintenir la balance énergétique et

à une régulation cohérente du métabolisme [52]. Par conséquent, l'inhibition ou l'activation d'un seul de ces systèmes pourrait ne pas suffire à provoquer tous les symptômes associés à l'obésité.

Sachant que nous avons uniquement provoqué la suractivation des neurones Pomc avec le virus AAV-NaChBac, sans perturber directement le fonctionnement des neurones Agrp, il est probable que l'absence de différences phénotypiques observées soit due à une incohérence dans la communication entre ces deux types de neurones. Cela dit, pour l'étude de la suractivation des neurones Pomc, une cohérence parfaite entre ces deux populations neuronales n'est pas obligatoire. De nouvelles cohortes de souris sont planifiées afin de répéter ces expériences (suractivation par adénovirus associés avec NaChBac et CTRL, test GTT, immunofluorescence pour Pomc et c-Fos), mais également dans le but de quantifier par RT-qPCR l'expression de Pomc et c-Fos entre les groupes de souris AAV-NaChBac et AAV-CTRL.

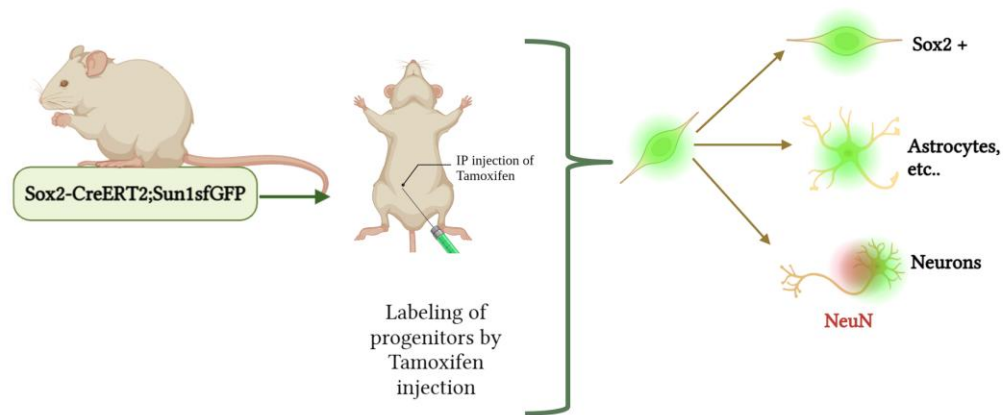
## Chapitre 2 : La neurogenèse

L'objectif principal était de valider l'utilisation d'un modèle murin transgénique servant à faire le suivi du réservoir de cellules multipotentes Sox2+, puis d'identifier parmi celles-ci, lesquelles se sont différenciées en neurones.

### I. Explication du modèle & méthodes

Afin de suivre dans le temps le destin du réservoir de cellules multipotentes dans l'hypothalamus, j'ai participé au développement d'une nouvelle approche combinant souris transgéniques et activation inductible d'un rapporteur fluorescent. Cette approche nous permet de faire le suivi de lignée de cette population multipotente (ainsi que de toute cellule fille étant générée).

Nous avons choisi d'utiliser des souris *Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP*. Ce modèle a la particularité d'avoir la recombinaison Cre sous l'effet d'un récepteur à l'estrogène modifié pour être seulement activable par le tamoxifène (ERT2) [134]. C'est donc seulement en présence de tamoxifène, que le récepteur ERT2 transloque la recombinaison Cre vers le noyau et permet la recombinaison au niveau de sites loxP, permettant l'expression de la fluorescence sfGFP dans les cellules Sox2+. Ceci nous permet donc de marquer les cellules Sox2+ seulement à partir du moment voulu. Les noyaux des cellules où la recombinaison Cre est permise, seront marqués par le sfGFP de façon stable, et ce même après l'arrêt de l'administration de tamoxifène [134]. Par la suite, avec l'immunofluorescence, nous allons venir identifier les cellules doubles positives pour un marqueur des neurones et pour sfGFP (qui correspond aux cellules Sox2+).



**Figure 18 :** Représentation du modèle murin pour suivi de lignée cellulaire multipotente Sox2+.

Légende : l’injection intrapéritonéale chez des souris *Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP* de tamoxifène permet de marquer de façon permanente la membrane nucléaire externe des cellules Sox2+. Par la suite, des techniques d’immunofluorescence permettront d’identifier les cellules doublement positives avec le marqueur NeuN, un marqueur neuronal. Les cellules doubles positives pour la fluorescence Sox2 et NeuN correspondent aux nouveaux neurones générés depuis les traitements de tamoxifène.

Cette technique de suivi de lignée cellulaire est différente de l’approche traditionnelle de l’étude de la neurogenèse qui emploie régulièrement l’utilisation de BrdU. Dans la section Hypothèse : Neurogenèse dans l’hypothalamus, nous avons déjà identifié de nombreuses limitations liées à l’utilisation de BrdU, menant bien souvent à une mauvaise interprétation de la neurogenèse dans un cerveau mature, telles que l’incorporation dans de l’ADN en réparation plutôt qu’en division [122] ainsi que le fait que de nombreux progéniteurs neuronaux sont déjà divisés et destinés pour une différenciation neuronale, mais en attente d’un signal avant d’entamer cette étape. Également, l’incorporation de BrdU dans les cellules progénitrices neurales peut causer de la sénescence [135]. Des chercheurs ont observé un déclin rapide de la prolifération des cellules progénitrices ayant incorporé de BrdU *in vitro* et *in vivo*, en plus d’une morphologie cellulaire et une expression peptidique altérée, une perte significative de leur propriété de différenciation fut observée [135]. Finalement, le BrdU peut influencer la différenciation des progéniteurs neuraux en réprimant la différenciation neuronale pour favoriser la différenciation astrocytaire [136, 137].

Avec toutes les considérations qui sont à prendre lors de l'interprétation de résultats impliquant l'emploi de BrdU, il va sans dire qu'on ne peut s'attendre à ce que les cellules progénitrices agissent normalement, justifiant le besoin d'employer un modèle d'étude de la neurogenèse différent.

#### - **Préparation de la solution de tamoxifène et traitement**

Notre modèle permet le marquage permanent de la GFP des souris *Sox2-CreERT* ; *Sun1-sfGFP* par induction de tamoxifène. Puisque l'action de la recombinaise Cre est sous le contrôle du promoteur synthétique de l'estrogène (ERT2), celui-ci répond seulement au tamoxifène, un analogue synthétique de l'estrogène. Lorsque la recombinaise Cre est activé, la fluorescence permanente en provenance de *Sun1-sfGFP* est induite dans les cellules *Sox2+*. Puisque la fluorescence est permanente, elle sera exprimée dans les cellules *Sox+* même si elles se différencient en un nouveau type cellulaire (voir **figure 4.1**).

Une solution de 20mg/ml de tamoxifène est préparée en pesant la quantité appropriée puis dissoute dans le volume approprié d'huile de sésame chauffé à 60°C pendant 1h avec agitation fréquente. La solution d'huile et de tamoxifène est conservée à 37°C pendant la nuit puis agitée de nouveau afin de s'assurer de la dissolution complète des cristaux de tamoxifène. La solution est filtrée à l'aide d'un filtre à seringue stérile 0,45µm (filtropur sarstedt ref :83.1826). Les souris ont été traitées pendant une période de 5 jours consécutifs avec une dose de 100 µl à 20mg/ml. Les souris sont placées en isolement dans les cages et sont réparties selon leur poids dans les différents états métaboliques. Les souris soumises à une diète obésogène consomment de la nourriture HFHS de ResearchDiet (D12331 58kcal% fat and sucrose) tandis que les souris appartenant au groupe contrôle consomment de la nourriture CHOW.

#### - **Modèle murin expérimental**

Les souris *Sox2<sup>CreERT2/+</sup>* ont été croisé avec des souris *Sun1<sup>sfGFP/+</sup>* afin d'obtenir une lignée murine hétérozygote *Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP*. Les colonies de souris ont été maintenues à l'interne par la reproduction des souris *Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP* et *Sun1-sfGFP; Sun1-sfGFP*. Les souris ont été maintenues entre 20 et 24°C sur un cycle

d'exposition à la lumière de 10 :14 avec un accès constant à de l'eau fraîche, de la nourriture régulière. L'état de santé général des souris a été vérifié régulièrement (déshydratation, fatigue et posture). L'âge et le nombre de souris analysés pour chaque expérience sont détaillés dans les légendes des figures. Le protocole éthique animal approuvé par le Comité de Bons Soins aux Animaux de l'UQTR est AF7.

- ***Immunofluorescence de tranches hypothalamiques***

Les cerveaux des souris *Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP* mâles et femelles ont été entièrement recueillis dans du PFA 4% à 4°C pendant 16 heures. Les cerveaux ont ensuite été transférés dans une solution de sucrose 30% supplémentée de 0,05% d'azide de sodium pendant au moins 24 heures. Les cerveaux ont été coupés en tranche de 30µm à l'aide d'un cryostat (Leica) à -20°C. Pour la détection de Sox2, un anticorps primaire anti-Sox2 (Rat) (1 : 200, Invitrogen) a été utilisé, la visualisation s'est fait avec un anticorps secondaire Goat-anti-rat Alexa 546 (1 :2000, Cell Signalling Technology). La détection de NeuN s'est faite par l'utilisation de l'anticorps primaire anti-NeuN (1 :100, New England Biolabs), la visualisation s'est faite avec un anticorps secondaire Goat-anti-rabbit Alexa 647 (1 :2000, Cell Signalling Technology) sur des tranches hypothalamiques différentes de celles marquées avec anti-Sox2. La fluorescence provenant de la sfGFP (endogène) et ne nécessitaient pas de détection par anticorps.

- ***Microscopie confocale***

Toutes les images ont été capturées par l'utilisation d'un microscope confocal Leica SP8, équipé d'un objectif 20x. Les sections de l'ARC hypothalamique ont été capturées de façon unilatérale de l'antérieur vers postérieur couvrant une épaisseur totale de 30µm. Les intensités des lasers pour les différents canaux furent les mêmes pour tout le processus d'imagerie. Les projections maximales ont été réalisées sur FIJI. Une dizaine de sections ont été analysées par animal et une photo a été prise par animal, avec le même objectif confocal; une résolution de 1024x1024 et une vitesse de 400ms.

- ***Décompte de cellules doubles positives pour sfGFP et NeuN***

Le nombre de cellules doubles positives pour sfGFP et NeuN furent comptés manuellement en divisant la région de l'ARC en 3 : la région ARC antérieure, médiale et postérieure. La moyenne de 3 décomptes par région (3 coupes antérieures, 3 coupes médiales, 3 coupes postérieures) par souris est présentée.

- **Objectifs**

En plus de valider l'utilisation d'un modèle murin transgénique servant à faire le suivi du réservoir de cellules multipotentes Sox2+, le second objectif de ce projet est d'étudier les effets de diverses conditions nutritionnelles et métaboliques sur la neurodifférenciation hypothalamique. Pour ce faire, nous avons établi plusieurs groupes de souris *Sox2-CreERT2*; *Sun1*-sfGFP mâles et femelles qui, suivant un marquage des progéniteurs multipotents Sox2 par traitement au tamoxifène, seront exposés aux interventions suivantes :

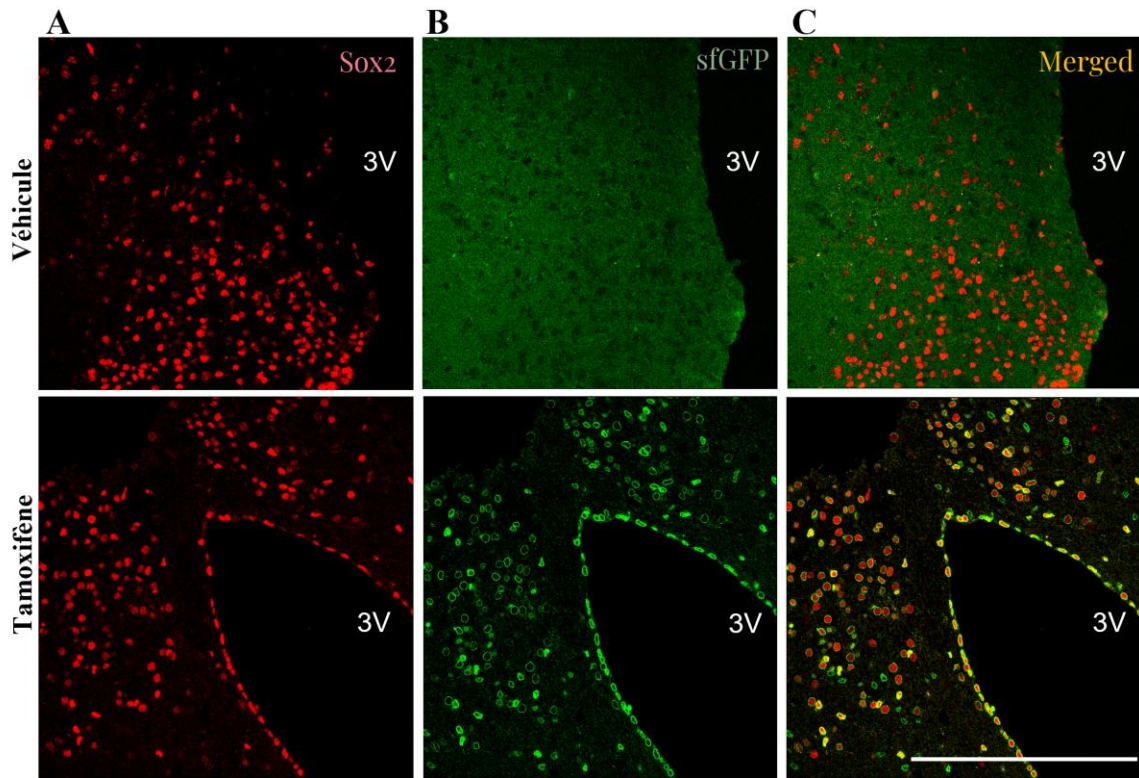
- Un régime riche en gras et en sucre,
- Une restriction calorique de 50%,
- Effectués de l'activité physique,
- Un groupe contrôle.

Les suivis des lignées cellulaires multipotentes hypothalamiques se feront à l'aide d'immunofluorescence pour divers marqueurs neuronaux, gliaux et de cellules multipotentes superposées au signal de suivi de lignée sfGFP induit par tamoxifène.

## II. Résultats & discussion

Avant de tester les divers effets des conditions métaboliques sur la neurogenèse dans l'hypothalamus, il était primordial de valider notre modèle murin. Ainsi la section des résultats se divise en 2 sections principales : la validation du modèle murin et l'évaluation de la neurogenèse sous certaines conditions métaboliques.

### *Validation du modèle murin expérimental*



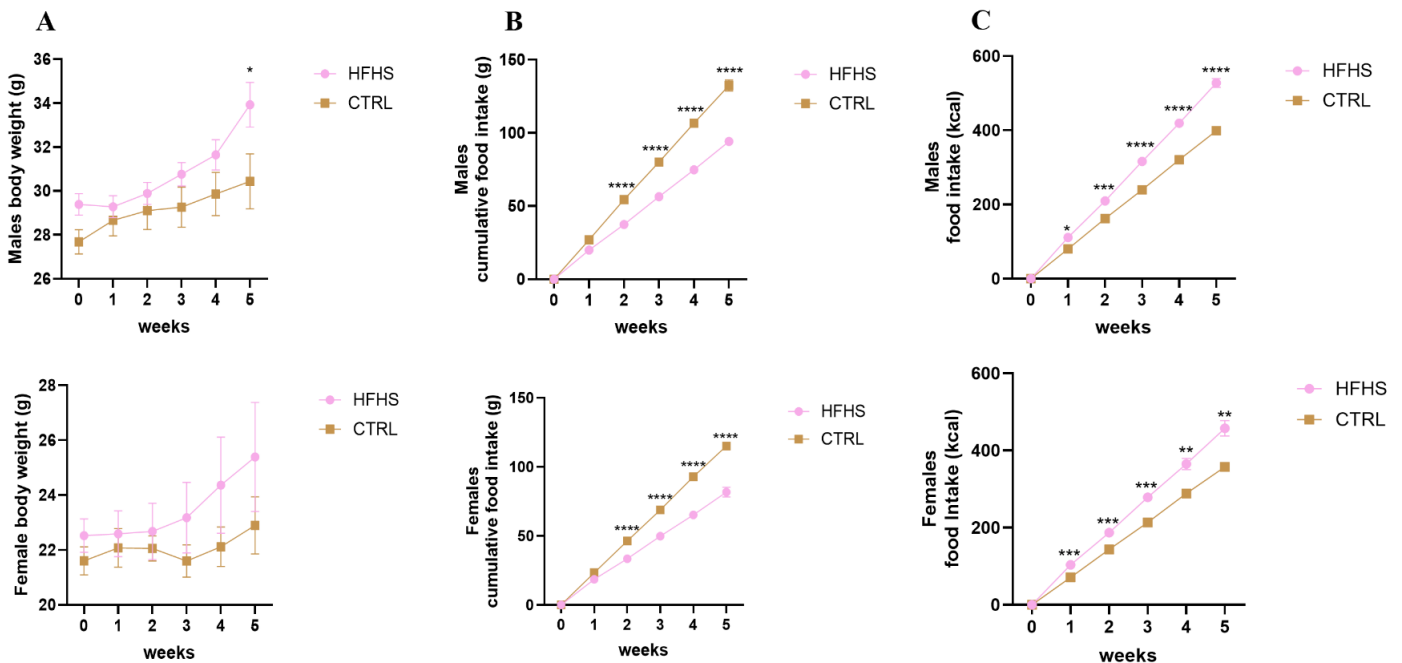
**Figure 19:** expression de la recombinase Cre chez les souris *Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP* avec le véhicule ou tamoxifène.

Images représentatives montrant la présence ou l'absence de l'expression de la recombinase Cre dans neurones indifférenciés dans l'hypothalamus de souris adultes ayant soit reçus des IP du véhicule (huile de sésame) (n=2) ou IP de tamoxifène (n=1). **A**, cellules marquées avec Anti-Sox2 (rouge) correspondant à des progéniteurs neuronaux indifférenciés. **B**, fluorescence verte permanente (sfGFP) en provenance du modèle murin correspondant aux cellules où la recombinase Cre est activé par du tamoxifène. **C**, colocalisation de la fluorescence rouge et verte, correspondant aux cellules qui sont encore indifférenciées (rouge et vert) et aux progéniteurs qui se sont différenciés (fluorescence verte seule). La barre d'échelle est de 200µm.

Pour valider notre modèle murin, nous avons tout d'abord vérifié si l'activation de la recombinase Cre dans les cellules Sox2<sup>+</sup> était spécifiquement induite par l'administration de tamoxifène. À cette fin, des souris *Sox2CreERT2/+; CagSun1sfGFP/+* ont reçu des injections quotidiennes du véhicule (huile de sésame) pendant 5 jours consécutifs. Après perfusion et fixation de leurs cerveaux, nous avons réalisé une immunofluorescence ciblant le marqueur *Sox2* afin de rechercher une colocalisation avec la fluorescence *sfGFP*. Comme illustré à la **figure 19**, l'injection du véhicule seul n'a pas entraîné l'activation non désirée de la recombinase Cre, confirmant ainsi l'absence d'activation spontanée.

Ensuite, nous avons vérifié que l'administration de tamoxifène induisait l'activation de la recombinaise Cre et l'expression de sfGFP. Les souris ont reçu des injections intrapéritonéales (IP) quotidiennes de tamoxifène pendant 5 jours, suivies de perfusion pour analyse par immunofluorescence. Comme le montre la **figure 19**, une colocalisation marquée entre *Sox2* et sfGFP est observée, confirmant l'activation de la Cre dans les cellules *Sox2*<sup>+</sup>. De plus, aucune expression de *Sox2* n'a été détectée en dehors des cellules exprimant sfGFP, confirmant la spécificité de l'expression de sfGFP pour les cellules *Sox2*<sup>+</sup> au moment des traitements par tamoxifène. Nous avons également noté que certaines cellules exprimant sfGFP ne présentaient plus de signal *Sox2*, suggérant une possible différenciation cellulaire depuis le début des injections au tamoxifène.

### *Évaluation de la neurogenèse selon certaines conditions métaboliques*

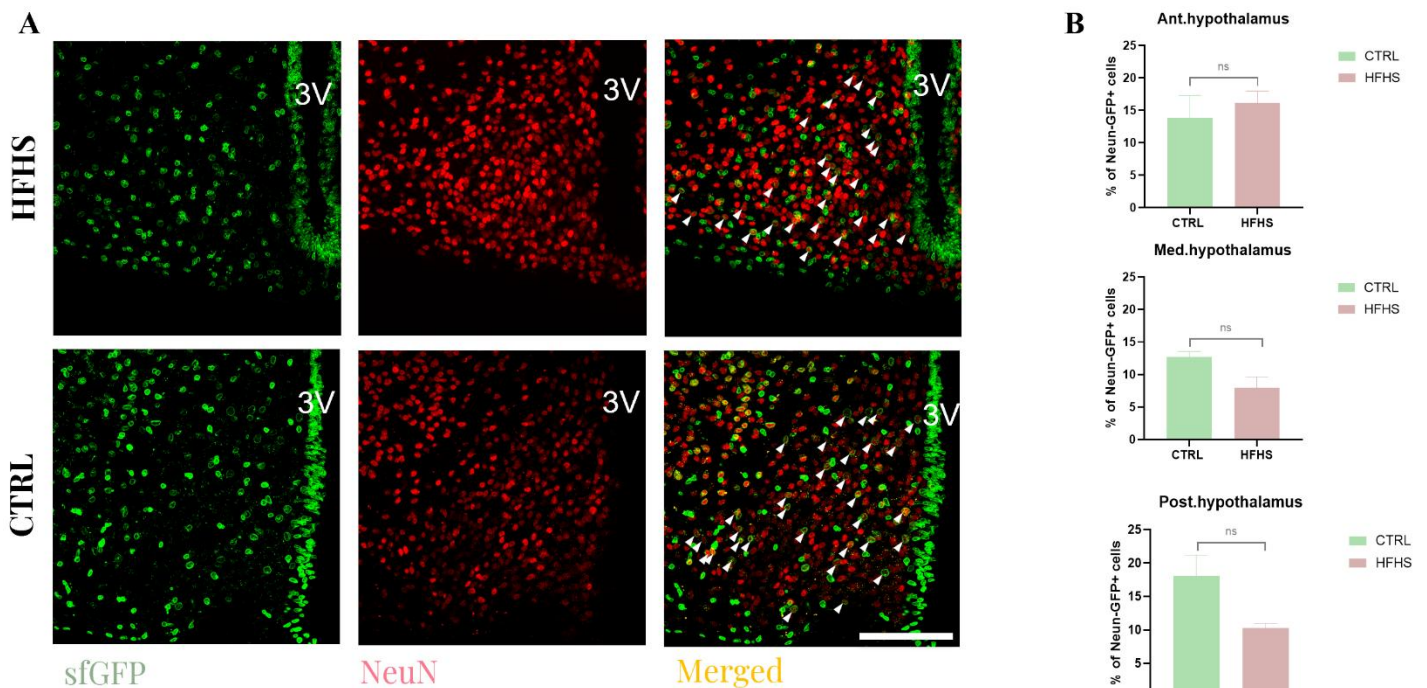


**Figure 20:** Suivi hebdomadaire du poids et de la consommation alimentaire des souris *Sox2-CreERT2*; *Sun1-sfGFP*.

Suivis du poids corporel et de l'apport alimentaire chez les mâles et les femelles ayant reçu du tamoxifène une fois par jour pendant 5 jours, suivi d'un régime HFHS ou Chow (CTRL) pendant 5 semaines. **A**, suivi du poids hebdomadaire chez les mâles HFHS (n=9) vs CTRL (n=5) et chez les femelles HFHS (n=8) vs CTRL (n=5). **B**, suivi cumulatif de la consommation de nourriture chez les mâles HFHS (n=9) vs CTRL (n=5) et chez les femelles HFHS (n=8) vs CTRL (n=5). **C**, conversion du suivi de la consommation de nourriture en kilocalorie (kcal) chez les mâles HFHS (n=9) vs CTRL

(n=5) et chez les femelles HFHS (n=8) vs CTRL (n=5). Les analyses statistiques ont été réalisées avec two-way anova+Sidak. Toutes les valeurs sont les résultats des moyennes  $\pm$  SEM, \* :  $p < 0,05$ , \*\* :  $p < 0,005$ , \*\*\* :  $p < 0,0005$ , \*\*\*\* :  $p < 0,0001$ .

Une fois le modèle validé, les premières cohortes expérimentales ont été constituées. Après les injections IP de tamoxifène, les souris ont été réparties en deux groupes selon leur sexe, puis assignées à une diète HFHS (riche en graisse et sucre) ou CTRL (contrôle) pendant 5 semaines. Durant cette période, nous avons effectué un suivi hebdomadaire de leur poids corporel (**figure 20A**) et de leur consommation alimentaire (**figure 20B**). La consommation alimentaire en gramme (g) a ensuite été multipliée par la densité calorique (kcal) des diètes afin de vérifier quel groupe de souris consommait davantage (**figure 20C**). Ainsi en comparant la **figure 20B** avec la **figure 20C**, on s'aperçoit que les souris mâles et femelles sous diète de contrôle ont consommé moins de calories que celles sous diète HFHS. Cette observation nous confirme que la diète HFHS induit une surconsommation calorique indépendante du sexe des souris et cohérente avec sa densité calorique élevée. De plus, la différence significative de consommation calorique entre les deux diètes confirme une différence métabolique entre les groupes de souris, justifiant leur comparaison subséquente pour la neurogenèse.



**Figure 21:** Évaluation de la neurogenèse dans l'hypothalamus de souris *Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP* mâle sous HFHS ou CTRL.

Images suivant le devenir des cellules indifférenciées par le marquage de Sox2 pour évaluation de la neurogenèse. **A.** observation de la différenciation des progéniteurs Sox2+ en nouveaux neurones NeuN+ générés 5 semaines après la dernière IP de tamoxifène chez les souris HFHS (n=6) vs CTRL (n=5), sfGFP correspond à la fluorescence induite par le marquage Sox2 après IP de tamoxifène, NeuN correspond à l'immunofluorescence anti-NeuN, les nouveaux neurones dans l'ARC hypothalamique sont identifiés au moyen des flèches. Les images ont été prises avec un objectif de 20x et la barre d'échelle est de 200 µm. **B.** Pourcentage de neurogenèse induit dans les souris HFHS (n=3) vs CTRL (n=3) dans l'hypothalamus. Ant : hypothalamus antérieur, Med : hypothalamus médial, Post : hypothalamus postérieur. Les analyses statistiques ont été réalisées par unpaired t-test.

À l'issue des 5 semaines, les souris ont été sacrifiées par perfusion, et leurs cerveaux ont été analysés par immunofluorescence pour le marqueur neuronal NeuN, combiné avec la fluorescence endogène sfGFP spécifique aux cellules Sox2+, afin d'évaluer la génération de nouveaux neurones. La colocalisation entre sfGFP et NeuN (**figure 21**) a révélé que de nombreuses cellules exprimant sfGFP étaient également positives pour NeuN, confirmant la différenciation des cellules Sox2+ en nouveaux neurones. Ce phénomène a été observé dans les deux groupes (HFHS et CTRL). Cependant, une tendance à la diminution de la neurogenèse dans l'hypothalamus médial et postérieur a été notée chez les souris mâles HFHS. Ces résultats, bien que préliminaires, ne sont pas statistiquement significatifs en raison de la taille limitée des souris analysées pour cette figure (n=3 pour les souris mâles HFHS). Des analyses complémentaires sont nécessaires pour confirmer ces observations.

### III. Ouverture

Bien que nous ayons démontré qu'il se produit de la neurogenèse à l'âge adulte, nous n'avons pas terminé nos analyses. En effet, ce ne sont pas toutes les souris des cohortes HFHS et CTRL qui ont été analysées jusqu'à présent. Les cerveaux sont tous coupés et les images sont prises, cependant les analyses d'images sont rigoureuses et demande une grande attention. Avec l'aide de mes collègues, nous sommes en train de développer une macro sur le logiciel FIJI afin de comptabiliser plus facilement et

rapidement les cellules doublement positives pour sfGFP et NeuN. Également, la neurogenèse dans les cerveaux des souris femelles n'a pas encore été analysée et il est bien possible que les résultats soient très différents de ceux obtenus jusqu'à maintenant pour les cohortes de souris mâles. Dans ce sens, une étude réalisée par *Daniel A Lee et al. (2014)*, sur des souris mâles et femelles sous diète riche en graisse, montre que les femelles présentent une neurogenèse dans l'hypothalamus plus importante que les mâles pour cette même condition métabolique [138].

Mes objectifs consistaient en la validation du modèle murin *Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP* et l'évaluation de la neurogenèse par imagerie. Toutefois, ces objectifs étaient préliminaires à de multiples volets visant à fournir plusieurs informations clés sur la neurogenèse. Notamment, notre modèle murin pourrait nous permettre de faire l'isolation de noyaux GFP+ à des fins de séquençage pour réaliser un portfolio des cellules progénitrices hypothalamiques, afin d'aider à comprendre le devenir de ces cellules, en particulier celles devenues neurones.

Cependant, une étude menée par *Sugiura A, et al. (2020)*, montre que des cellules neuronales différenciées peuvent exprimer le marqueur Sox2 [139]. Ainsi, il est essentiel de vérifier qu'il n'existe pas de colocalisation entre Sox2 et NeuN afin d'identifier correctement les événements de neurogenèse. Aucun marqueur de progéniteur n'étant « parfait », nous avons choisi de limiter cette contrainte en mesurant l'expression active de Sox2. Dans notre modèle murin *Sox2-CreERT2; Sun1-sfGFP*, les cellules qui ont déjà été ou qui sont actuellement des progéniteurs Sox2 sont marquées de façon permanente par sfGFP. L'utilisation d'un anticorps anti-Sox2 permet alors d'identifier, par immunofluorescence, les cellules exprimant toujours cette protéine. Ainsi, les cellules doubles positives pour sfGFP et Sox2 correspondent soit à des cellules indifférenciées, soit à des populations différenciées qui maintiennent l'expression de Sox2. En ajoutant le marquage neuronal NeuN, il devient possible de distinguer les populations neuronales co-exprimant Sox2 de celles exprimant uniquement sfGFP. De plus, l'analyse de souris contrôles permet d'identifier les populations NeuN+ sfGFP+. La comparaison entre la neurogenèse basale en condition de contrôle et celle observée sous conditions métaboliques permettra ensuite d'évaluer le véritable impact de ces conditions sur la neurogenèse.

Également, nous souhaitons identifier le rôle des nouveaux neurones générés et les effets de leur activation. Pour ce faire, nous envisageons l'utilisation de souris transgéniques FLP couplées avec DREADD, pour les différentes conditions métaboliques (diète HFHS, activité physique, restriction calorique). Pour ce faire les souris *Sox2<sup>CreERT2</sup>* seront croisées avec :

RC::FLP-hM3Dq ou RC::FLP-hM3Di. Il s'agit d'un modèle activable par la recombinaison Cre, dans toutes les cellules qui expriment Sox2 et qui permet de cibler de manière très spécifique les neurones dérivés de cellules souches (qui ont déjà exprimé Sox2) et exprimant la recombinaison FLP sous un promoteur neuronal activé à la maturation : Syn [131]. La recombinaison Cre sera activée par les injections de tamoxifène au début du protocole. Ensuite, les souris subiront des interventions métaboliques et/ou nutritionnelles à la suite desquelles une injection intrahypothalamique virale d'AAV-Syn-FLP permettra l'expression des DREADD présents dans le génome, activateurs ou inhibiteurs couplés à un fluorophore mCherry. Ainsi, seuls les neurones nouvellement générés qui expriment les deux recombinaisons seront marqués par mCherry et activés ou inhibés par DREADD. Ce modèle offre un suivi très spécifique de la différenciation neuronale à partir des cellules Sox2<sup>+</sup> en plus d'offrir la possibilité d'étudier les effets de leur activation ou inhibition sur le métabolisme des souris.

Ainsi, les seules cellules qui exprimeront le DREADD seront celles ayant subi à la fois :

- 1) une recombinaison Cre au moment où elles étaient des cellules progénitrices (induite par le traitement de tamoxifène + transgène *Sox2-CreERT2*), et
- 2) une recombinaison FLP induite au moment où elles étaient des neurones (induite par le traitement viral AAV-Syn-FLP) donc, uniquement les neurones s'étant différenciés à l'âge adulte.

Les conséquences de l'activation de ces neurones seront évaluées à l'aide de cages métaboliques Promethion de Sable Systems (suivi en temps réel de la dépense énergétique, de la prise alimentaire, de l'activité locomotrice, du poids corporel, etc.). Cette expérience

permettra de comprendre l'importance physiologique de ces neurones dans un contexte homéostatique.

## Conclusion générale

En débutant ma maîtrise, j'ai eu la chance de mettre sur pied plusieurs techniques désormais couramment utilisées par mes collègues.

J'ai notamment établi les protocoles de culture cellulaire (immortalisées, primaires et organotypiques), qui sont aujourd'hui des méthodes de référence dans notre laboratoire.

La chirurgie stéréotaxique, que j'ai contribué à élaborer et optimiser, nous permet de cibler la région hypothalamique de manière précise, non invasive et avec très peu d'effets indésirables. Cette technique est devenue un pilier de notre laboratoire, et la majorité des projets de recherche l'emploient désormais. Je suis particulièrement reconnaissante d'avoir pu participer activement à sa mise en place.

### I. Étude de la respécification *in vitro* et *in vivo*

Lorsque j'ai débuté ma maîtrise en 2022, le projet de l'étude de la respécification des neurones Pomc n'était pas encore mis au point. Le laboratoire venait tout juste d'ouvrir, et les seuls résultats préliminaires que nous avions étaient ceux obtenus lors du postdoctorat de mon directeur de maîtrise. Ces résultats suggèreraient la respécification des neurones Pomc plutôt que leur apoptose en situation de stress métabolique chronique, cependant les mécanismes moléculaires entraînant ce changement sont inconnus. Afin d'étudier ces changements moléculaires, nous ne savions pas si l'utilisation d'un modèle *in vitro* ou *in vivo* serait à favoriser pour atteindre nos objectifs, sachant qu'aucun modèle de culture cellulaire ou de souris transgéniques n'avait été établi préalablement dans notre laboratoire. Il était donc primordial de mettre sur pied des modèles *in vivo* et *in vitro* afin d'étudier la respécification neuronale dans l'hypothalamus.

Selon les nombreux résultats que nous avons obtenus pendant ces deux années de durs labeurs, ceux-ci tendent à suggérer que :

1. L'activation chronique des neurones Pomc immortalisés diminue l'expression de Tbx3, ce qui pourrait être causé par l'activation chronique, et l'une des causes du changement identitaire.

2. La culture organotypique est un modèle *in vitro* plus près de la réalité et lorsqu'optimisée, cette méthode pourrait permettre de générer des données rapidement.
3. *In vivo*, on observe chez les mâles ayant reçu le virus AAV-NaChBac, un effet protecteur sur la réponse au glucose, vraisemblablement lié à l'activation chronique des neurones Pomc.

Pour la première portion du projet, soit d'établir un modèle *in vitro* nous permettant d'étudier les neurones Pomc : on se tourne désormais vers la culture organotypique. Cette culture semble mieux préserver les neurones Pomc qui semblent très sensibles aux manipulations en culture, tout en conservant les connexions des réseaux neuronaux et des cellules de soutiens. Bien que la technique ne soit pas encore totalement optimisée pour nos besoins, nous sommes capables de faire survivre des tissus hypothalamiques en culture sur plusieurs jours. Également, nous pensons utiliser des souris plus âgées pour nos prochaines coupes hypothalamiques, puisque les neurones Pomc atteignent le stade mature dès la 3<sup>e</sup> semaine après la naissance. Une fois tous les paramètres ajustés, nous serons en mesure d'aller de l'avant avec notre approche chimiogénétique par DREADD lentiviral dans le but de faire la suractivation des neurones Pomc et étudier l'impact sur leur identité.

Pour la deuxième portion du projet, portant sur l'étude de la suractivation des neurones Pomc *in vivo* : les injections intrahypothalamiques de virus AAV-NaChBac et AAV-CTRL ont été confirmées chez les cohortes de souris mâles. En fonction de la réussite complète, partielle ou nulle des injections virales, les souris mâles ont été classées ou retirées des analyses phénotypiques et d'imagerie. Il sera nécessaire de refaire nos analyses phénotypiques (prise de poids et consommation alimentaire) et métaboliques (métabolisme du glucose) lorsque les groupes de souris femelles auront été classés en fonction du taux de réussite complet, partiel ou nul de l'injection bilatérale de virus AAV-NaChBac et AAV-CTRL. Tant que ceci n'est pas fait, il n'est pas possible de nous prononcer sur l'influence de la suractivation virale sur les fonctions caractéristiques des neurones Pomc chez les souris femelles. Ensuite, toujours chez les femelles, les analyses des images des coupes hypothalamiques AAV-NaChBac et AAV-CTRL pour le marqueur Pomc et c-Fos, doivent être imagées et analysées.

## II. Étude de la neurogenèse dans l'hypothalamus mature

J'ai eu l'opportunité de mettre sur pied le projet pilote, permettant de valider à la fois un modèle murin robuste pour cibler une population spécifique et d'initier les premières cohortes expérimentales pour étudier la neurogenèse selon certaines conditions métaboliques : la diète HFHS vs CTRL. Également, ce travail m'a permis de lancer les premières analyses d'imagerie des cohortes expérimentales, établissant ainsi les bases pour les expériences futures.

Encore beaucoup reste à faire pour évaluer le rôle de la neurogenèse dans un cerveau mature. En premier lieu toutes les cohortes de souris mâles et femelles doivent être analysées rigoureusement.

À la lumière des résultats obtenus au cours de ma maîtrise, notre modèle murin permet de faire le suivi de lignée des progéniteurs neuronaux et fonctionne de façon spécifique au tamoxifène. De plus, les premières cohortes expérimentales suggèrent la présence de neurogenèse dans l'hypothalamus de souris adultes sous diète HFHS ainsi que sous diète CTRL.

Maintenant que le projet est mis sur pied et que nous savons que notre modèle murin fonctionne, les premières analyses préliminaires ont permis d'observer de la neurogenèse dans des hypothalamus murins matures. Le développement d'un algorithme de quantification des neurones, de progéniteurs, et de suivi de lignée permettra de faciliter et de standardiser les analyses. Ce projet ira d'ailleurs de l'avant en comparant la neurogenèse hypothalamique avec différentes conditions métaboliques :

- Diète obésogène (HFHS)
- Diète régulière (CTRL)
- Restriction calorique
- Activité physique

En plus d'offrir une compréhension globale et fonctionnelle du devenir des cellules progénitrices multipotentes de l'hypothalamus en situation de stress métabolique, cette étude permet d'évaluer leur contribution à la régulation de la balance énergétique.

L'étude des progéniteurs neuronaux est déjà reconnue comme extrêmement importante, en particulier en lien avec les maladies neurodégénératives. L'analyse de ces

cellules dans un contexte métabolique altéré nous aidera à mieux cerner leur rôle dans l'adaptation physiologique et à identifier les mécanismes par lesquels elles influencent l'homéostasie énergétique. Ce projet de recherche permettra de mieux comprendre leur importance, au sein de l'hypothalamus, ainsi que le lien avec la balance énergétique et le développement d'obésité.

### III. Ouverture

Dans l'obésité, malgré une perte de poids due à des changements d'habitude de vie ou par la prise de médicaments, le risque de regagner du poids est majeur. Il semble donc qu'il existe une « maladie résiduelle », probablement au niveau du cerveau, qui favorise un regain de poids. Mon projet a visé de mettre en lumière deux aspects importants de la plasticité de l'hypothalamus en fonction des conditions métaboliques, soient les changements identitaires de certains neurones ainsi que la formation de nouveaux neurones. Dans les deux cas, ces processus peuvent affecter la balance énergétique et pourraient être durables et ainsi contribuer au regain de poids.

## Bibliographie

1. Canada, O. *L'obésité au Canada*. 2024; Available from: <https://obesitycanada.ca/fr/>.
2. Santé, O.M.d.I. *Obésité*. Thème de santé 2024 [cited 2024 2024]; Available from: [https://www.who.int/fr/health-topics/obesity#tab=tab\\_1](https://www.who.int/fr/health-topics/obesity#tab=tab_1).
3. Canada-statistique, S. *Feuillets d'information de la santé : Embonpoint et obésité chez les adultes, 2018*. 2019 [cited 2019; Available from: <https://www150.statcan.gc.ca/n1/pub/82-625-x/2019001/article/00005-fra.htm>.
4. Vispute, S.S., et al., *The effect of abdominal exercise on abdominal fat*. J Strength Cond Res, 2011. **25**(9): p. 2559-64.
5. Wharton, S., et al., *L'obésité chez l'adulte : ligne directrice de pratique clinique*. Cmaj, 2020. **192**(49): p. E1757-e1775.
6. Hartmann-Boyce, J., et al., *Association between characteristics of behavioural weight loss programmes and weight change after programme end: systematic review and meta-analysis*. Bmj, 2021. **374**: p. n1840.
7. Nordisk., N. *Frequently asked questions: are there long-term risks to using Ozempic? Medication guide*. 2025.
8. Wilding, J.P.H., et al., *Weight regain and cardiometabolic effects after withdrawal of semaglutide: The STEP 1 trial extension*. Diabetes Obes Metab, 2022. **24**(8): p. 1553-1564.
9. Wei, Y., et al., *Chronic exposure to air pollution particles increases the risk of obesity and metabolic syndrome: findings from a natural experiment in Beijing*. FASEB J, 2016. **30**(6): p. 2115-22.
10. Aranaz, P., et al., *A predictive regression model of the obesity-related inflammatory status based on gut microbiota composition*. International Journal of Obesity, 2021. **45**(10): p. 2261-2268.
11. Locke, A.E., et al., *Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology*. Nature, 2015. **518**(7538): p. 197-206.
12. Caron, A. and N. Jane Michael, *New Horizons: Is Obesity a Disorder of Neurotransmission?* J Clin Endocrinol Metab, 2021. **106**(12): p. e4872-e4886.
13. Garfield, A.S., et al., *Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis*. Trends in Endocrinology & Metabolism, 2009. **20**(5): p. 203-215.
14. Krashes, M.J., B.B. Lowell, and A.S. Garfield, *Melanocortin-4 receptor-regulated energy homeostasis*. Nat Neurosci, 2016. **19**(2): p. 206-19.
15. Luquet, S., et al., *Les signaux de la régulation du comportement alimentaire*. Obésité, 2008. **3**(3): p. 167-176.
16. Campos, A., J.D. Port, and A. Acosta, *Integrative Hedonic and Homeostatic Food Intake Regulation by the Central Nervous System: Insights from Neuroimaging*. Brain Sciences, 2022. **12**(4): p. 431.
17. Hill, J.W. and L.D. Faulkner, *The Role of the Melanocortin System in Metabolic Disease: New Developments and Advances*. Neuroendocrinology, 2017. **104**(4): p. 330-346.
18. Williams, G., J.A. Harrold, and D.J. Cutler, *The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box*. Proceedings of the Nutrition Society, 2000. **59**(3): p. 385-396.
19. Singh, U., et al., *Neuroanatomical organization and functional roles of PVN MC4R pathways in physiological and behavioral regulations*. Mol Metab, 2022. **55**: p. 101401.

20. Andermann, M.L. and B.B. Lowell, *Toward a Wiring Diagram Understanding of Appetite Control*. *Neuron*, 2017. **95**(4): p. 757-778.
21. Kanoski, S.E., et al., *Ghrelin signaling in the ventral hippocampus stimulates learned and motivational aspects of feeding via PI3K-Akt signaling*. *Biol Psychiatry*, 2013. **73**(9): p. 915-23.
22. Brookes, S.J., et al., *Extrinsic primary afferent signalling in the gut*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. **10**(5): p. 286-96.
23. Berthoud, H.R. and W.L. Neuhuber, *Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system*. *Auton Neurosci*, 2000. **85**(1-3): p. 1-17.
24. Morton, G.J., T.H. Meek, and M.W. Schwartz, *Neurobiology of food intake in health and disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2014. **15**(6): p. 367-78.
25. Dubuc, B., *Le cerveau à tous les niveaux! Les voies désirantes de l'hypothalamus*, B. Dubuc, Editor. 2024, Université McGill.
26. Tran, L.T., et al., *Hypothalamic control of energy expenditure and thermogenesis*. *Experimental & Molecular Medicine*, 2022. **54**(4): p. 358-369.
27. Saucisse, N., et al., *Functional heterogeneity of POMC neurons relies on mTORC1 signaling*. *Cell Rep*, 2021. **37**(2): p. 109800.
28. Toda, C., et al., *POMC Neurons: From Birth to Death*. *Annu Rev Physiol*, 2017. **79**: p. 209-236.
29. Sternson, S.M. and D. Atasoy, *Agouti-related protein neuron circuits that regulate appetite*. *Neuroendocrinology*, 2014. **100**(2-3): p. 95-102.
30. Khodai, T. and S.M. Luckman, *Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus Neurons Under the Magnifying Glass*. *Endocrinology*, 2021. **162**(10).
31. Hetherington, A.W. and S.W. Ranson, *The relation of various hypothalamic lesions to adiposity in the rat*. *Journal of Comparative Neurology*, 1942. **76**(3): p. 475-499.
32. Dhillon, H., et al., *Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis*. *Neuron*, 2006. **49**(2): p. 191-203.
33. Rau, A.R. and S.T. Hentges, *Energy state alters regulation of proopiomelanocortin neurons by glutamatergic ventromedial hypothalamus neurons: pre- and postsynaptic mechanisms*. *J Neurophysiol*, 2021. **125**(3): p. 720-730.
34. Zhang, Y., et al., *Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits*. *J Neurosci*, 2011. **31**(5): p. 1873-84.
35. Chao, P.T., et al., *Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity*. *Cell Metab*, 2011. **13**(5): p. 573-83.
36. Rau, A.R. and S.T. Hentges, *GABAergic Inputs to POMC Neurons Originating from the Dorsomedial Hypothalamus Are Regulated by Energy State*. *J Neurosci*, 2019. **39**(33): p. 6449-6459.
37. Wu, Z., et al., *An obligate role of oxytocin neurons in diet induced energy expenditure*. *PLoS One*, 2012. **7**(9): p. e45167.
38. Ho, J.M. and J.E. Blevins, *Coming Full Circle: Contributions of Central and Peripheral Oxytocin Actions to Energy Balance*. *Endocrinology*, 2013. **154**(2): p. 589-596.
39. Maejima, Y., et al., *The Anorexigenic Neural Pathways of Oxytocin and Their Clinical Implication*. *Neuroendocrinology*, 2018. **107**(1): p. 91-104.
40. Fioramonti, X., et al., *Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks?* *Diabetes*, 2007. **56**(5): p. 1219-27.

41. Ganong, W.F., *Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000. **27**(5-6): p. 422-7.
42. Coll, A.P., I.S. Farooqi, and S. O'Rahilly, *The hormonal control of food intake*. Cell, 2007. **129**(2): p. 251-62.
43. 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, 2003. **37**(4): p. 649-61.
44. van den Top, M., et al., *Orexigen-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus*. Nat Neurosci, 2004. **7**(5): p. 493-4.
45. Tong, Q., et al., *Synaptic release of GABA by AgRP neurons is required for normal regulation of energy balance*. Nat Neurosci, 2008. **11**(9): p. 998-1000.
46. Campbell, J.N., et al., *A molecular census of arcuate hypothalamus and median eminence cell types*. Nat Neurosci, 2017. **20**(3): p. 484-496.
47. Suyama, S. and T. Yada, *New insight into GABAergic neurons in the hypothalamic feeding regulation*. The Journal of Physiological Sciences, 2018. **68**(6): p. 717-722.
48. Xu, Y., et al., *Role of GABA release from leptin receptor-expressing neurons in body weight regulation*. Endocrinology, 2012. **153**(5): p. 2223-33.
49. Vong, L., et al., *Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons*. Neuron, 2011. **71**(1): p. 142-54.
50. Rønnekleiv, O.K., J. Qiu, and M.J. Kelly, *Hypothalamic Kisspeptin Neurons and the Control of Homeostasis*. Endocrinology, 2021. **163**(2).
51. Qi-Lytle, X., S. Sayers, and E.J. Wagner, *Current Review of the Function and Regulation of Tuberoinfundibular Dopamine Neurons*. International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25**(1): p. 110.
52. De Solis, A.J., et al., *Reciprocal activity of AgRP and POMC neurons governs coordinated control of feeding and metabolism*. Nature Metabolism, 2024. **6**(3): p. 473-493.
53. Zhang, S.X., et al., *Competition between stochastic neuropeptide signals calibrates the rate of satiation*. bioRxiv, 2023.
54. Zhang, X., et al., *Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity*. Cell, 2008. **135**(1): p. 61-73.
55. Thaler, J.P., et al., *Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 153-62.
56. Yi, C.X., et al., *TNFA drives mitochondrial stress in POMC neurons in obesity*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15143.
57. Lemus, M.B., et al., *A stereological analysis of NPY, POMC, Orexin, GFAP astrocyte, and Iba1 microglia cell number and volume in diet-induced obese male mice*. Endocrinology, 2015. **156**(5): p. 1701-13.
58. Joseph, C., *Design, synthesis, and characterization of peptides and peptidomimetics for mouse melanocortin receptors [electronic resource]*.
59. Fox, D.L., K.R. Vella, and D.J. Good, *Energy balance pathways converging on the Nhlh2 transcription factor*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 3983-93.
60. Emeson, R.B. and B.A. Eipper, *Characterization of pro-ACTH/endorphin-derived peptides in rat hypothalamus*. J Neurosci, 1986. **6**(3): p. 837-49.
61. Smith, A.I. and J.W. Funder, *Proopiomelanocortin Processing in the Pituitary, Central Nervous System, and Peripheral Tissues*. Endocrine Reviews, 1988. **9**(1): p. 159-179.
62. Castro, M.G. and E. Morrison, *Post-translational processing of proopiomelanocortin in the pituitary and in the brain*. Crit Rev Neurobiol, 1997. **11**(1): p. 35-57.

63. Wikberg, J.E., *Melanocortin receptors: perspectives for novel drugs*. Eur J Pharmacol, 1999. **375**(1-3): p. 295-310.
64. Harno, E., et al., *POMC: The Physiological Power of Hormone Processing*. Physiol Rev, 2018. **98**(4): p. 2381-2430.
65. Shimada, M. and T. Nakamura, *Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei*. Exp Neurol, 1973. **41**(1): p. 163-73.
66. Quarta, C., et al., *Functional identity of hypothalamic melanocortin neurons depends on Tbx3*. Nature Metabolism, 2019. **1**(2): p. 222-235.
67. Lin, H.C., et al., *NGN2 induces diverse neuron types from human pluripotency*. Stem Cell Reports, 2021. **16**(9): p. 2118-2127.
68. Pelling, M., et al., *Differential requirements for neurogenin 3 in the development of POMC and NPY neurons in the hypothalamus*. Dev Biol, 2011. **349**(2): p. 406-16.
69. McNay, D.E., et al., *Mash1 is required for generic and subtype differentiation of hypothalamic neuroendocrine cells*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(7): p. 1623-32.
70. Nasif, S., et al., *Islet 1 specifies the identity of hypothalamic melanocortin neurons and is critical for normal food intake and adiposity in adulthood*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(15): p. E1861-70.
71. Coyle, C.A., et al., *Reduced voluntary activity precedes adult-onset obesity in Nhlh2 knockout mice*. Physiology & Behavior, 2002. **77**(2): p. 387-402.
72. Good, D.J., et al., *Hypogonadism and obesity in mice with a targeted deletion of the Nhlh2 gene*. Nature Genetics, 1997. **15**(4): p. 397-401.
73. Chou, S.J. and S. Tole, *Lhx2, an evolutionarily conserved, multifunctional regulator of forebrain development*. Brain Res, 2019. **1705**: p. 1-14.
74. Salvatierra, J., et al., *The LIM homeodomain factor Lhx2 is required for hypothalamic tanycyte specification and differentiation*. J Neurosci, 2014. **34**(50): p. 16809-20.
75. Liddelow, S.A., et al., *Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia*. Nature, 2017. **541**(7638): p. 481-487.
76. Guillemot-Legris, O. and G.G. Muccioli, *Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus*. Trends Neurosci, 2017. **40**(4): p. 237-253.
77. Kang, G.M., et al., *Mitohormesis in Hypothalamic POMC Neurons Mediates Regular Exercise-Induced High-Turnover Metabolism*. Cell Metab, 2021. **33**(2): p. 334-349.e6.
78. Ramírez, S., et al., *Mitochondrial Dynamics Mediated by Mitofusin 1 Is Required for POMC Neuron Glucose-Sensing and Insulin Release Control*. Cell Metab, 2017. **25**(6): p. 1390-1399.e6.
79. Santoro, A., et al., *DRP1 Suppresses Leptin and Glucose Sensing of POMC Neurons*. Cell Metab, 2017. **25**(3): p. 647-660.
80. Li, H.Q., et al., *Decoding Neurotransmitter Switching: The Road Forward*. J Neurosci, 2020. **40**(21): p. 4078-4089.
81. Spitzer, N.C., *Neurotransmitter Switching in the Developing and Adult Brain*. Annu Rev Neurosci, 2017. **40**: p. 1-19.
82. Spitzer, N.C., *Activity-dependent neurotransmitter respecification*. Nature Reviews Neuroscience, 2012. **13**(2): p. 94-106.
83. Mateos-Aparicio, P. and A. Rodríguez-Moreno, *The Impact of Studying Brain Plasticity*. Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 66.
84. Ramirez, A. and M.R. Arbuckle, *Synaptic Plasticity: The Role of Learning and Unlearning in Addiction and Beyond*. Biol Psychiatry, 2016. **80**(9): p. e73-e75.

85. Sweatt, J.D., *Chapter 7 - Long-Term Potentiation—A Candidate Cellular Mechanism for Information Storage in the Central Nervous System*, in *Mechanisms of Memory (Second Edition)*, J.D. Sweatt, Editor. 2010, Academic Press: London. p. 150-189.
86. Yamamori, T., et al., *The cholinergic neuronal differentiation factor from heart cells is identical to leukemia inhibitory factor*. *Science*, 1989. **246**(4936): p. 1412-6.
87. Demarque, M. and N.C. Spitzer, *Activity-dependent expression of Lmx1b regulates specification of serotonergic neurons modulating swimming behavior*. *Neuron*, 2010. **67**(2): p. 321-34.
88. Dulcis, D., et al., *Neurotransmitter Switching Regulated by miRNAs Controls Changes in Social Preference*. *Neuron*, 2017. **95**(6): p. 1319-1333.e5.
89. Pritchard, R., et al., *Photoperiod-induced neurotransmitter plasticity declines with aging: An epigenetic regulation?* *J Comp Neurol*, 2020. **528**(2): p. 199-210.
90. Guemez-Gamboa, A., et al., *Non-cell-autonomous mechanism of activity-dependent neurotransmitter switching*. *Neuron*, 2014. **82**(5): p. 1004-16.
91. Yip, S.H., et al., *Elevated Prolactin during Pregnancy Drives a Phenotypic Switch in Mouse Hypothalamic Dopaminergic Neurons*. *Cell Rep*, 2019. **26**(7): p. 1787-1799.e5.
92. Meng, D., et al., *Neuronal activity regulates neurotransmitter switching in the adult brain following light-induced stress*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018. **115**(20): p. 5064-5071.
93. Borodinsky, L.N., et al., *Activity-dependent homeostatic specification of transmitter expression in embryonic neurons*. *Nature*, 2004. **429**(6991): p. 523-30.
94. Flavell, S.W. and M.E. Greenberg, *Signalling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system*. *Annu Rev Neurosci*, 2008. **31**: p. 563-90.
95. McKay, R., *Stem cells in the central nervous system*. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 66-71.
96. La Manno, G., et al., *Molecular architecture of the developing mouse brain*. *Nature*, 2021. **596**(7870): p. 92-96.
97. Lee, D.A. and S. Blackshaw, *Functional implications of hypothalamic neurogenesis in the adult mammalian brain*. *Int J Dev Neurosci*, 2012. **30**(8): p. 615-21.
98. Yoo, S. and S. Blackshaw, *Regulation and function of neurogenesis in the adult mammalian hypothalamus*. *Prog Neurobiol*, 2018. **170**: p. 53-66.
99. Cameron, H.A. and R. McKay, *Stem cells and neurogenesis in the adult brain*. *Curr Opin Neurobiol*, 1998. **8**(5): p. 677-80.
100. Reynolds, B.A. and S. Weiss, *Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system*. *Science*, 1992. **255**(5052): p. 1707-10.
101. Ray, J., et al., *Proliferation, differentiation, and long-term culture of primary hippocampal neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(8): p. 3602-6.
102. Johansson, C.B., et al., *Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system*. *Cell*, 1999. **96**(1): p. 25-34.
103. Gage, F.H., *Mammalian neural stem cells*. *Science*, 2000. **287**(5457): p. 1433-8.
104. Gross, C.G., *Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma*. *Nat Rev Neurosci*, 2000. **1**(1): p. 67-73.
105. Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla, *The glial nature of embryonic and adult neural stem cells*. *Annu Rev Neurosci*, 2009. **32**: p. 149-84.
106. Merkle, F.T., Z. Mirzadeh, and A. Alvarez-Buylla, *Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain*. *Science*, 2007. **317**(5836): p. 381-4.
107. Doetsch, F., et al., *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. *Cell*, 1999. **97**(6): p. 703-16.

108. Temple, S., *The development of neural stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 112-7.
109. Whitman, M.C. and C.A. Greer, *Adult neurogenesis and the olfactory system*. Prog Neurobiol, 2009. **89**(2): p. 162-75.
110. Gould, E., *How widespread is adult neurogenesis in mammals?* Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(6): p. 481-8.
111. Emsley, J.G., et al., *Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells*. Prog Neurobiol, 2005. **75**(5): p. 321-41.
112. Alvarez-Buylla, A. and D.A. Lim, *For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain*. Neuron, 2004. **41**(5): p. 683-6.
113. Morrison, S.J., *Neuronal potential and lineage determination by neural stem cells*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(6): p. 666-72.
114. Kokoeva, M.V., H. Yin, and J.S. Flier, *Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance*. Science, 2005. **310**(5748): p. 679-83.
115. Kokoeva, M.V., H. Yin, and J.S. Flier, *Evidence for constitutive neural cell proliferation in the adult murine hypothalamus*. J Comp Neurol, 2007. **505**(2): p. 209-20.
116. Pierce, A.A. and A.W. Xu, *De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance*. J Neurosci, 2010. **30**(2): p. 723-30.
117. McNay, D.E., et al., *Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice*. J Clin Invest, 2012. **122**(1): p. 142-52.
118. Lee, D.A., et al., *Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche*. Nat Neurosci, 2012. **15**(5): p. 700-2.
119. Taupin, P., *BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation*. Brain Res Rev, 2007. **53**(1): p. 198-214.
120. Recabal, A., T. Caprile, and M.L.A. García-Robles, *Hypothalamic Neurogenesis as an Adaptive Metabolic Mechanism*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 190.
121. Son, J.E., et al., *Irx3 and Irx5 in Ins2-Cre+ cells regulate hypothalamic postnatal neurogenesis and leptin response*. Nature Metabolism, 2021. **3**(5): p. 701-713.
122. Martí-Clúa, J., *Incorporation of 5-Bromo-2'-deoxyuridine into DNA and Proliferative Behavior of Cerebellar Neuroblasts: All That Glitters Is Not Gold*. Cells, 2021. **10**(6): p. 1453.
123. Duque, A. and P. Rakic, *Different effects of bromodeoxyuridine and [3H]thymidine incorporation into DNA on cell proliferation, position, and fate*. J Neurosci, 2011. **31**(42): p. 15205-17.
124. Rienecker, K.D.A., R.G. Poston, and R.N. Saha, *Merits and Limitations of Studying Neuronal Depolarization-Dependent Processes Using Elevated External Potassium*. ASN Neuro, 2020. **12**: p. 1759091420974807.
125. Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, G., *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*. 2016. p. 20.
126. Liu, Y., et al., *Brain aging is faithfully modelled in organotypic brain slices and accelerated by prions*. Communications Biology, 2022. **5**(1): p. 557.
127. Charalambous, K. and B.A. Wallace, *NaChBac: the long lost sodium channel ancestor*. Biochemistry, 2011. **50**(32): p. 6742-52.
128. De Solis, A.J., et al., *Reciprocal activity of AgRP and POMC neurons governs coordinated control of feeding and metabolism*. Nature Metabolism, 2024.

129. Kennard, M.R., et al., *The glucose tolerance test in mice: Sex, drugs and protocol*. *Diabetes Obes Metab*, 2022. **24**(11): p. 2241-2252.
130. González-García, I., et al., *Estradiol regulates leptin sensitivity to control feeding via hypothalamic Cited1*. *Cell Metabolism*, 2023. **35**(3): p. 438-455.e7.
131. Roth, B.L., *DREADDs for Neuroscientists*. *Neuron*, 2016. **89**(4): p. 683-94.
132. Seydel, C. *This is your brain on DREADD*. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 2018; Available from: <https://www.genengnews.com/insights/this-is-your-brain-on-dreadds/>.
133. Zhu, C., et al., *Profound and redundant functions of arcuate neurons in obesity development*. *Nat Metab*, 2020. **2**(8): p. 763-774.
134. Deal, R.B. and S. Henikoff, *The INTACT method for cell type-specific gene expression and chromatin profiling in Arabidopsis thaliana*. *Nat Protoc*, 2011. **6**(1): p. 56-68.
135. Ross, H.H., et al., *Bromodeoxyuridine induces senescence in neural stem and progenitor cells*. *Stem Cells*, 2008. **26**(12): p. 3218-27.
136. Lehner, B., et al., *The dark side of BrdU in neural stem cell biology: detrimental effects on cell cycle, differentiation and survival*. *Cell Tissue Res*, 2011. **345**(3): p. 313-28.
137. Schneider, L. and F. d'Adda di Fagagna, *Neural stem cells exposed to BrdU lose their global DNA methylation and undergo astrocytic differentiation*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(12): p. 5332-42.
138. Lee, D.A., et al., *Dietary and sex-specific factors regulate hypothalamic neurogenesis in young adult mice*. *Front Neurosci*, 2014. **8**: p. 157.
139. Sugiura, A., et al., *Identification of Sox2 and NeuN Double-Positive Cells in the Mouse Hypothalamic Arcuate Nucleus and Their Reduction in Number With Aging*. *Front Aging Neurosci*, 2020. **12**: p. 609911.