



# **Implication de l'Acyl-CoA Binding Domain 7 dans le contrôle neuronal de la prise alimentaire et de la dépense énergétique chez le rat**

**Mémoire**

**Stéphanie Delage**

**Maîtrise en neurobiologie - avec mémoire**  
**Maître ès sciences (M. Sc.)**

Québec, Canada

# **Implication de l'*AcyI-CoA Binding Domain 7* dans le contrôle neuronal de la prise alimentaire et de la dépense énergétique chez le rat**

**Mémoire**

**Stéphanie Delage**

**Maîtrise en neuroscience**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

Sous la direction de :  
Dr Denis Richard

## Résumé

Avec l'augmentation préoccupante des cas d'obésité à l'échelle mondial depuis les dernières décennies, la communauté scientifique s'intéresse de plus en plus aux facteurs responsables de cette hausse alarmante et aux différents mécanismes impliqués dans la régulation du bilan d'énergie. Cette régulation dépend de deux composantes principales, la prise alimentaire et la dépense d'énergie, contrôlées par différentes voies périphériques et neuronales, parmi lesquelles les circuits neuronaux hypothalamiques ont été les plus étudiés. Ces circuits forment des systèmes bien définis, qui incluent le système à mélancortine, qui essentiellement comprend les neurones à proopiomélanocortine (POMC) du noyau arqué (ARC), les neurones adjacents à ces derniers qui produisent le *Agouti-related peptide* et les neurones arborant les récepteurs des mélancortines 4 (MC4R) qui se retrouvent dans diverses régions du cerveau. La stimulation du système à mélancortine diminue la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique. L'activité du système à mélancortine est modulée de plusieurs façons et par différentes molécules, incluant l'*Acyl-CoA Binding Domain 7* (ACBD7). Cette protéine produit deux fragments peptidiques, nommément le nonadecaneuropeptide (NDN) et le *new endozepine member 18* (NEM18). L'implication de NDN a été récemment démontrée dans le contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique chez la souris. De plus, on a pu démontrer que les effets du peptide disparaissaient en présence d'un antagoniste du MC4R. Le projet de recherche sous-jacent à ce mémoire visait à (i) confirmer l'implication d'ACBD7 dans le contrôle de la balance énergétique chez le rat, (ii) étudier les effets d'ACBD7 sur l'aversion gustative conditionnée et (iii) comparer l'expression cérébrale des ARNm ACBD7 et DBI, les sites d'action neuronaux de ces protéines ainsi que leurs effets cataboliques. Contrairement à ce qui a été observé chez la souris, NDN n'altère pas les composantes énergétiques chez le rat. Les résultats obtenus suggèrent plutôt l'implication de NEM18 dans le contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. On observe d'abord une augmentation de la prise alimentaire lors de l'injection intracérébroventriculaire de 0,125 et 0,250 µg de NEM18. Les variables énergétiques, telles que la consommation d'oxygène ainsi que la dépense énergétique en kcal, se trouvent également modulées par la présence de NEM18 chez le rat.

## **Abstract**

With the worrying increase in obesity cases worldwide over the last decades, the scientific community has increasingly been interested in the various mechanisms involved in the regulation of energy balance. The energy balance regulation is based on two main components, namely food intake and energy expenditure, insured by various peripheral and neural circuits. The hypothalamus plays a major role in energy balance regulation. It hosts the proopiomelanocortin (POMC) and agouti-related peptide (AgRP) neurons, which are found in the arcuate nucleus, and which form, together with the melanocortin 4 receptor (MC4R), the melanocortin system. The melanocortin system when activated reduces food intake and stimulates energy expenditure. Its role in energy balance regulation is prominent and its activity is modulated by various molecules including the Acyl-CoA Binding Domain 7 (ACBD7) protein which can generate two peptide fragments, namely, nonadecaneuropeptide (NDN) and the new endozepine member 18 (NEM18). The involvement of NDN has been shown to reduce food intake and stimulate energy expenditure in mice, effect that can be blocked by a MC4R antagonist. This study constituting the core of this *mémoire* aimed to (i) confirm the involvement of ACBD7 in the control of energy balance in rats, (ii) study the effects of ACBD7 on conditioned taste aversion and (iii) compare the cerebral expression, the neural action sites and the catabolic effects caused by ACBD7 and DBI. In contrasts with what has been observed in mice, NDN does not influence energy balance in rats. Results obtained suggest the involvement of NEM18 in the control of food intake and energy expenditure. We observed an increase in food intake following the intracerebroventricular injection of 0,125 and 0,250 µg of NEM18. Energetic parameters, as oxygen consumption and energy expenditure in kcal, were also modulated by NEM18 in rats.

# Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des abréviations, sigles, acronymes.....	vii
Avant-propos .....	x
Introduction générale .....	1
Obésité .....	1
Régulation de l'homéostasie énergétique .....	2
Implication de l'hypothalamus dans la régulation de l'homéostasie énergétique.....	3
Implication du tronc cérébral dans la régulation de l'homéostasie énergétique .....	5
Structures corticales et limbiques impliquées dans de l'homéostasie énergétique .....	6
Hormones homéostatiques périphériques impliquées dans la régulation de la balance énergétique .....	9
Contrôles à court terme de la prise alimentaire.....	12
Dépense énergétique .....	13
Endozépines et homéostasie énergétique.....	15
Diazepam Binding Inhibitor.....	16
Récepteur à protéine G .....	16
Activité biologique du DBI.....	17
Acyl-CoA Binding Domain 7 .....	18
Problématique et objectifs de la recherche .....	19
Chapitre 1 : Article .....	21
Résumé.....	23
Abstract.....	24
Introduction.....	25
Method .....	26
<i>Animals and surgical procedures</i> .....	26
<i>Rat Acbd7 and Dbi mRNA sequencing</i> .....	26
<i>Acbd7 and Dbi probe design</i> .....	27
<i>In situ hybridization</i> .....	27
<i>Drug injections</i> .....	28

<i>Food intake experiments</i> .....	29
<i>Indirect calorimetry</i> .....	29
<i>Two-bottle preference test</i> .....	29
<i>Statistical analysis</i> .....	30
<b>Results</b> .....	30
<i>Cumulative food intake</i> .....	30
<i>Effect of intracerebroventricular injection on conditioned taste aversion (CTA) of sucrose solution</i> .....	31
<i>Energy expenditure</i> .....	32
<i>RNA expression profile of Acbd7 and Dbi in the rat brain</i> .....	33
<i>Effect of intracerebroventricular injection of 0.25 µg of NDN, 0.25 µg of NEM18 and 1 µg of ODN on mRNA c-fos expression in the rat brain.</i> .....	34
<b>Discussion</b> .....	35
<b>Figures and Tables</b> .....	40
<b>Chapitre 2 : Discussion générale</b> .....	55
<b>Conclusion générale</b> .....	59
<b>Perspectives</b> .....	60
<b>Bibliographie</b> .....	61

## Liste des figures, tableaux, illustrations

Figure 1 : Données pertinentes sur l'obésité à l'échelle mondiale [2] .....	1
Figure 2: Principaux noyaux hypothalamiques impliqués dans l'homéostasie énergétique.	3
Figure 3 : Régions cérébrales impliquées dans le circuit de la récompense et hédonique.	8
Figure 4 : Représentation des actions des signaux métaboliques sur le système à mélancortine de l'hypothalamus et sur le noyau du tractus solitaire du tronc cérébral.....	9
Figure 5 : Intégration à court et à long terme des signaux métaboliques périphériques dans l'équilibre énergétique.....	12
Figure 6 : Représentation des circuits neuronaux impliqués dans la régulation de la thermogénèse adaptative du tissu adipeux brun.....	15
Figure 7 : Circuit neuronal hypothétique illustrant l'implication d'ACBD7 dans la régulation du bilan d'énergie .....	19

## Liste des abréviations, sigles, acronymes

- ABCD7: Acyl-CoA Binding Domain 7  
ACBP: Acyl-CoA Binding Protein  
ACC: Anterior cingulate cortex  
AP: Area Postrema  
ARC: Arcuate nucleus  
ATP: Adenosine Triphosphate  
BZs: Benzodiazepines  
CBR: Central benzodiazepine receptor  
cDNA: Complementary Deoxyribonucleic acid  
CGRP: calcitonin gene-related peptide  
CO<sub>2</sub>: Carbon Dioxide  
aCSF: Artificial cerebrospinal fluid  
DBI: Diazepam Binding Inhibitor  
DVC: Dorsal Vagal Complex  
EE: Energy Expenditure  
EZs: Endozepines  
GPCR: G-Protein Coupled Receptors  
ICV: Intracerebroventricular  
IPN: Interpeduncular Nucleus  
LPBN: Lateral Parabrachial Nucleus  
MHb: Median Habenula  
MnPO: Median Preoptic Nucleus  
Nac: Accumben Nucleus  
NDN: Nonadecaneuropeptide  
NEM18: New Endozepine Member 18  
NTS: Solitary Tract Nucleus  
O<sub>2</sub>: Oxygen  
ODN: Octadecaneuropeptide  
OP: Octapeptide  
PBR: Peripheral Benzodiazepine Receptors  
PFC: Prefrontal Cortex  
POA: Preoptic Area  
PVH: Paraventricular Nucleus

RNA: Ribonucleic acid

RPa: Raphe Pallidus

TSPO : Translocator Protein

TTN: Triakontatetraneuropeptide

VGAT: Anti-Vesicular GABA Transporte

## **Remerciements**

Ce mémoire a été réalisé sous la bienveillance et l'accompagnement de mon directeur de recherche Denis Richard et de sa précieuse équipe de laboratoire. Je tiens donc d'abord à remercier chaleureusement le Dr Denis Richard, qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire pour une deuxième fois. Merci pour ta confiance, pour tes bons conseils et pour ton soutien. Merci également à Natacha Lemoine et à Julie Plamondon, deux professionnelles de recherche dévouées et disponibles. Merci pour votre temps, vos connaissances et votre patience. Vous y êtes pour beaucoup. Merci à mes collègues qui ont partagé mes bons moments et mes faiblesses au laboratoire et qui ont fait de mon séjour un moment très agréable, Paulette Mukorako, Sara Soltani, Geneviève Guèvremont, Sandrine Sallé-Lefort et Stéphanie Miard. Merci à Damien Lanfray, un mentor qui m'a beaucoup enseigné sur ACBD7. Merci de ta disponibilité malgré la distance.

Une grande partie de ma réussite va à ma mère. À mes côtés depuis toujours, son amour inconditionnel et ses encouragements sont l'élément déclencheur de ma persévérance. Sans son écoute, ses conseils et ses muffins aux bananes, tout aurait été plus difficile. Tu es un modèle. Enfin, mon amoureux, qui a tout traversé avec moi depuis le début de cette maîtrise et qui a cru en moi. Merci pour ta présence, ton support et ton écoute.

# Avant-propos

La présente maîtrise est déposée à la Faculté des Études supérieures de l'Université Laval dans l'objectif d'obtenir le grade de maître ès en sciences. Le sujet de ce mémoire est «*Implication de l'Acyl-CoA Binding Domain 7 dans le contrôle neuronal de la prise alimentaire et de la dépense énergétique chez le rat*». Une introduction générale décrit le fonctionnement neuronal et périphérique du contrôle de l'homéostasie énergétique. Les résultats et les conclusions de mes travaux de recherche sont présentés dans ce document sous la forme d'un article s'intitulant :«*Involvement of Acyl-CoA Binding Domain 7 in the neuronal control of food intake and energy expenditure in rats*». Ces recherches, conduites au Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec (CRIUCPQ), ont été le fruit d'un travail d'équipe, dont j'ai été la première auteure, sous la supervision du Dr Denis Richard. Cet article est le fruit d'une collaboration avec de précieux collègues. Tout d'abord, je remercie Julie Plamondon qui m'a encadré dans la réalisation de mes expériences au laboratoire. Je remercie aussi Natacha Lemoine qui m'a aidé dans la réalisation de mes chirurgies et dans mes protocoles à l'animalerie.

## Introduction générale

### Obésité

L'obésité résulte d'un déséquilibre entre la prise et la dépense d'énergie et consiste en une accumulation excessive de graisse corporelle, représentant un risque pour la santé. [1] Elle est non seulement déterminée par des gènes, mais aussi associée à des facteurs environnementaux. En effet, l'accès facile à des aliments riches et palatables ainsi que le mode de vie sédentaire contribuent manifestement à l'augmentation alarmante de cas d'obésité dans notre société. D'après les estimations les plus récentes de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), plus de 1,9 milliard d'humains âgés de plus de 18 ans seraient en surpoids, c'est-à-dire avec un indice de masse corporelle (IMC) entre 25 et 30 [IMC : poids (kg) / taille ( $m^2$ )] ou obèse (IMC > 30) ; de ce total, plus de 600 millions seraient obèses [2]. Ces données sont profondément inquiétantes (Figure 1), considérant que la prévalence de l'obésité a plus que doublé à l'échelle mondiale depuis 1980 et que déjà en 2008, les coûts médicaux engendrés étaient de l'ordre de 2 milliards de dollars.

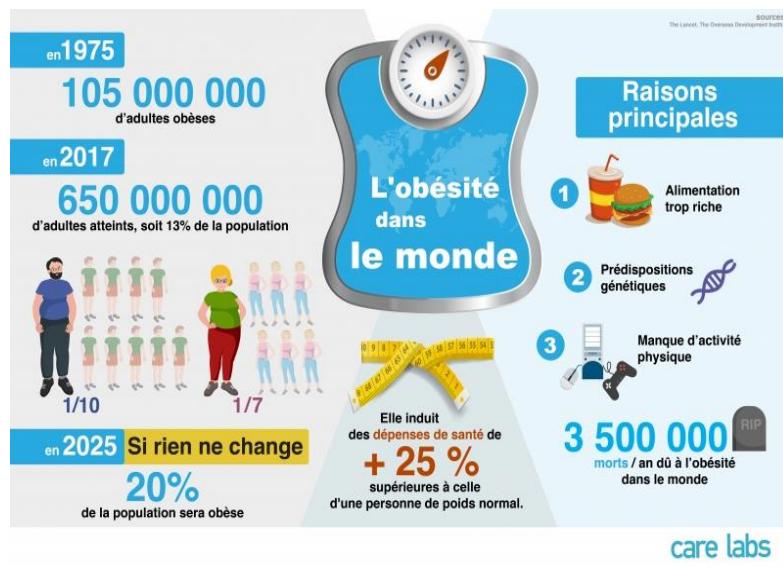


Figure 1 : Données pertinentes sur l'obésité à l'échelle mondiale [2]

L'obésité, principalement sous sa forme abdominale (déposition viscérale de la graisse), constitue un facteur de risque majeur pour certaines maladies chroniques, incluant les

maladies cardiovasculaires, le diabète de type 2, l'hypertension artérielle, les troubles du sommeil (apnée), les troubles musculo-squelettiques (arthrose) et certains types de cancer (endomètre, sein, côlon) [3, 4]. Ces complications entraînent de multiples conséquences au plan social, psychologique et économique. Heureusement, on dénote maintenant un intérêt important dans la communauté scientifique pour la recherche, dans le but de comprendre les différents mécanismes impliqués dans la balance énergétique, afin de mieux traiter et prévenir ce fléau sociétal.

## Régulation de l'homéostasie énergétique

L'étude de la physiopathologie de l'obésité requiert la compréhension des mécanismes régissant la régulation de la balance ou de l'homéostasie énergétique. Cette régulation dépend de contrôles exercés sur la prise alimentaire et la dépense énergétique (métabolisme de base, thermogénèse et activité physique volontaire) [5]. Ces contrôles mettent en jeu plusieurs mécanismes périphériques et centraux, interagissant dans le but de maintenir la stabilité des réserves énergétiques, afin de maintenir un poids corporel sain. Les signaux homéostatiques périphériques (p. ex. hormones ou nutriments) informent le cerveau de l'état des réserves énergétiques et aussi de l'état nutritionnel [6] [7] [8] (voir plus bas). Ce relai d'informations entraîne l'activation/répression de différents circuits neuronaux impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique, dans le but de réguler l'homéostasie énergétique.

## Implication de l'hypothalamus dans la régulation de l'homéostasie énergétique

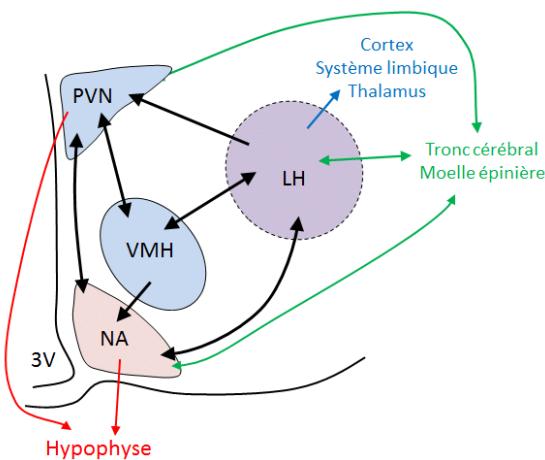


Figure 2: Principaux noyaux hypothalamiques impliqués dans l'homéostasie énergétique.

L'hypothalamus est une région cruciale impliquée dans la régulation autonome du bilan d'énergie. Situé à la partie ventrale du cerveau près de l'éminence médiane, il a une position privilégiée pour recevoir les signaux homéostatiques de la circulation périphérique qui atteigne le liquide céphalo-rachidien par les jonctions serrées, formées de cellules gliales spécialisées (tanyocytes), bordant l'éminence médiane [9, 10]. Les signaux se retrouvent alors libres de moduler l'activité des neurones adjacents.

L'un des noyaux hypothalamiques les plus importants dans la régulation du bilan d'énergie est le noyau arqué (ARC), situé à proximité de la base du troisième ventricule et de l'éminence médiane [11]. Les neurones de l'ARC se projettent vers des neurones de différentes régions cérébrales, incluant le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (*paraventricular hypothalamic nucleus* — PVH) [12]. Deux populations principales de neurones s'y retrouvent, les neurones à proopiomélanocortine (POMC) et les neurones à neuropeptide Y (NPY) et *agouti-related peptide* (AgRP), dont les rôles sur la prise alimentaire et la dépense énergétique se neutralisent [13]. Ces deux populations de neurones constituent des éléments clés du système à mélano-cortine, encore considéré comme un régulateur central de l'équilibre énergétique [14]. L'activation des neurones à POMC par les hormones homéostatiques telles que la leptine (voir plus bas) induit la libération de la molécule *l'alpha-melanocyte-stimulating hormone* ( $\alpha$ -MSH), dans le PVH. Cette molécule provenant d'un clivage protéolytique de la POMC cible les récepteurs à

mélanocortine 4 (MC4R) à la surface de certains neurones du PVH (et d'autres régions), entraînant ainsi une diminution de la prise alimentaire et une augmentation de la dépense d'énergie [15]. Les médiateurs susceptibles d'être impliqués dans la transduction des effets de l'activation de MC4R sur le contrôle de la prise alimentaire sont le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), la corticolibérine (*corticotropin-releasing factor* — CRF) et la thyrotropin-libérine (*thyrotropin-releasing hormone* — TRH) [16]. Pour leur part, les neurones NPY/AgRP, se projettent au PVH et à l'hypothalamus latéral (LH). Le NPY, exprimé majoritairement dans l'ARC, est reconnu comme étant l'un des peptides les plus orexigènes de l'hypothalamus [17]. Ce dernier cible les récepteurs Y1 et Y5 répartis à travers les noyaux de l'hypothalamus [18], causant une augmentation de la prise alimentaire et une diminution de la dépense énergétique [17]. Le neuropeptide AgRP, également orexigène, est sécrété lors du jeûne et agit en tant qu'agoniste inverse du récepteur MC4R [19]. En se liant à ce récepteur, AgRP bloque l'accès à l' $\alpha$ -MSH au récepteur MC4R et ainsi favorise une balance énergétique positive [20] [21]. L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (*gamma aminobutyric acid* — GABA) est aussi libérée par les neurones NPY/AgRP et agit en inhibant les neurones anorexigènes POMC, s'ajoutant à l'action catabolique et thermogénique des neurones NPY/AgRP dans les noyaux hypothalamiques [22].

Bien que le duo ARC-PVH constitue un circuit majeur de la régulation du bilan énergétique, plusieurs autres noyaux hypothalamiques présentent un rôle homéostatique, souvent décrit comme étant le centre de la satiété, le noyau ventromédian de l'hypothalamus (*ventromedial hypothalamic nucleus* — VMH) est l'un des plus grands noyaux de l'hypothalamus [23]. Des études pionnières démontrent que la stimulation de ce noyau s'accompagne d'une diminution de la prise alimentaire [23]. On prouva par la suite que les nombreuses projections de neurones POMC provenant de l'ARC, sont responsables de cet effet anorexigène [24]. De plus, un autre type de cellules cataboliques (réduisant les réserves énergétiques), les neurones à *steroidogenic factor 1* (SF1), largement retrouvés dans le VMH, produisent des effets cataboliques. [25]. Un autre noyau impliqué dans la régulation du bilan d'énergie est le noyau dorsomédian de l'hypothalamus (*dorsomedial hypothalamic nucleus* — DMH). Le DMH est localisé au-dessus du VMH et ses neurones, qui incluent des neurones orexigènes NPY, se projettent vers l'ARC, le PVH, le LH et le tronc cérébral [26]. Il joue le rôle d'unité fonctionnelle impliquée dans l'initiation et le maintien de la prise alimentaire [11]. Le noyau LH a d'abord été caractérisé comme étant un centre de la faim, en raison de l'effet orexigène observé suite à la stimulation de ce noyau [27]. En plus de

recevoir des projections de l'ARC, le LH possède également des neurones à orexine, des neurones à hormone de la mélanoconcentration (*melanin-concentrating hormone* — MCH), ainsi que des neurones sensibles au glucose répondant à la fluctuation de la glycémie [28].

### **Implication du tronc cérébral dans la régulation de l'homéostasie énergétique**

Le tronc cérébral constitue une autre région cruciale dans la régulation autonome du bilan d'énergie. Il comprend plusieurs sous-régions connectées à l'hypothalamus [29]. Le complexe dorso vagal (*dorsovagal complex* — DVC) est l'une des structures les plus importantes du tronc cérébral dans l'intégration des signaux métaboliques périphériques, ainsi que dans le relai de l'information homéostatique [30]. Tout comme l'éminence médiane, le noyau de l'area postrema (AP) est un organe circumventriculaire tapissé de capillaires perméables. Étant donné leur proximité avec la barrière hématoencéphalique composée de cellules gliales spécialisées, les différentes populations de neurones de l'AP se retrouvent directement exposées aux signaux homéostatiques en circulation [31]. En effet, ces populations peuvent être stimulées par des impulsions afférentes viscérales (sympathiques et vagales) provenant du tractus gastro-intestinal, ou par des hormones [32]. Les neurones de l'AP innervent directement un noyau intégrateur adjacent, nommément le noyau du tractus solitaire (NTS). Ce noyau reçoit également des projections des autres régions cérébrales, principalement du PVH, du noyau parabrachial latéral (*lateral parabrachial nucleus* — LPBN) et de la région antérieure du cerveau [33]. La population de neurones du NTS est très hétérogène, incluant les neurones catécholaminergiques, les neurones *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), ainsi que les neurones POMC et NPY. De plus, comme dans l'hypothalamus, on constate une forte expression du récepteur de la leptine (LepR) dans les noyaux du tronc cérébral, suggérant également l'influence de la leptine dans les voies de signalisation de cette région [34] (voir plus bas).

Le tronc cérébral inclut aussi le noyau parabrachial, dont le rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique est reconnu [35]. Les neurones du PVH exprimant le récepteur MC4R se projettent vers le LPBN [36]. En plus d'être impliqué dans l'aversion alimentaire conditionnée [37], le LPBN est reconnu pour intégrer les informations de l'état nutritionnel provenant de la stimulation du nerf vague. En effet, une population de neurones spécifiques à cette région, les neurones *calcitonin gene-related peptide* (CGRP), qui s'activent en

réponse aux signaux anorexigènes [38]. Une suppression complète de la prise alimentaire est observée lors de l'activation de ces neurones, confirmant le rôle des neurones MC4R dans ce noyau précis [39]. À l'inverse, les neurones orexigènes AgRP/NPY ont aussi la capacité d'induire un effet marqué en inhibant la suppression de l'appétit. Les projections des neurones NPY/AgRP atteignent le LPBN et y libère GABA, molécule inhibitrice des neurones CGRP [40] favorisant ainsi une augmentation de la prise alimentaire. Le LPBN est un relai important dans le réseau de l'appétit compte tenu des connexions avec le complexe DVC et le cerveau antérieur [41].

### **Structures corticales et limbiques impliquées dans l'homéostasie énergétique**

Les circuits de l'hypothalamus et du tronc cérébral sont reliés à des circuits corticolimbiques qui participent aussi à la régulation intégrée de la balance énergétique. De fait, la décision de consommer de la nourriture ou d'entreprendre une activité physique ne dépend pas seulement du système autonome. Des études de plus en plus nombreuses démontrent l'implication des circuits cortico- et mésolimbiques dans le contrôle de la prise alimentaire et de la dépense d'énergie [42]. Ces circuits constituent les systèmes exécutifs (de décision) et de la récompense, composés entre autres de neurones dopaminergiques, qui jouent un rôle majeur dans le contrôle les aspects motivationnels, émotionnels et hédoniques reliés au comportement alimentaire.

L'ingestion de nourriture riche en gras et en sucre active différentes régions des systèmes exécutifs corticaux et de la récompense [43]. Plus la sensibilité aux récompenses alimentaires est élevée, selon le niveau de contrôle de soi, de l'état psychologique ou de l'éducation de l'individu, plus la corrélation avec l'excès de consommation de nourriture et de gain de poids corporel sera importante [44]. Les circuits neuronaux cortico-limbiques sont aussi impliqués dans le contrôle de prise d'alcool ou de drogue [45]. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait potentiellement contribuer à l'élaboration de stratégies visant à la diminution de l'obésité.

Le contrôle hédonique et motivationnel du comportement alimentaire implique le cortex préfrontal (*prefrontal cortex* — PFC), incluant la partie antérieure du lobe frontal, ainsi que le cortex cingulaire antérieur (*anterior cingular complex* — ACC) [46]. Cette large région cérébrale reçoit l'information sensorielle, associée aux propriétés organoleptiques des

aliments, de la cavité buccale, nasale et du tractus gastro-intestinal [47]. Le PFC exécutif joue un rôle majeur dans la prise de décision, dans le comportement d'impulsivité et dans le contrôle de soi [48]. Ce circuit influence donc la décision volontaire de manger, sans que nécessairement l'organisme ressente nécessairement la faim [11].

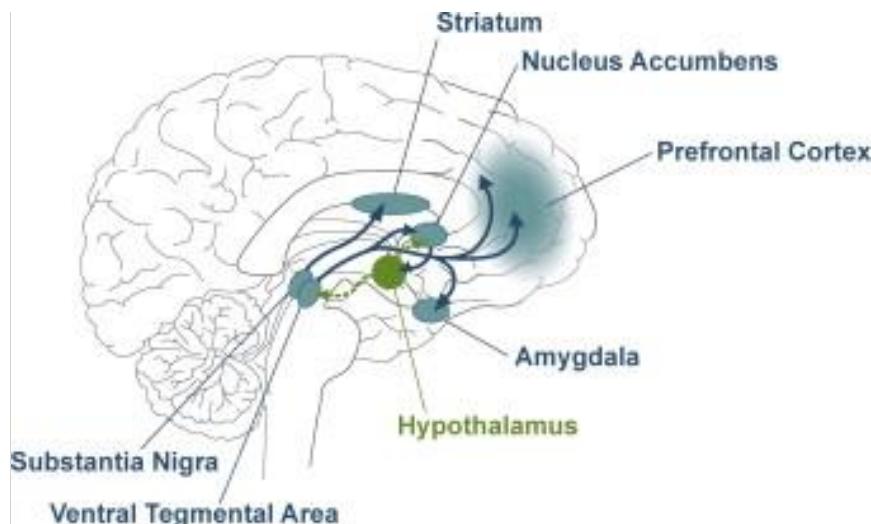
En plus du système cortical, l'aspect émotionnel et cognitif du comportement alimentaire est également contrôlé par le système mésolimbique [49]. Deux régions principales orchestrent les activités de ce circuit de la récompense; l'aire ventrale tegmentale (*ventral tegmental area* — VTA) et le noyau Accumbens (Nac). Une connexion neuronale dopaminergique importante existe entre ces deux noyaux [50]. Ces mêmes neurones dopaminergiques provenant du VTA se projettent également vers d'autres structures limbiques et corticales du cerveau [51]. Le Nac, caractérisé comme une interface entre le cortex préfrontal et mésolimbique, se situe dans la partie basale du striatum. Ce noyau participe à l'aspect de saillance incitative (attention motivationnelle) et l'aspect hédonique du comportement alimentaire via plusieurs connexions neuronales provenant de l'amygdale médiane, de l'hippocampe et du cortex préfrontal [52].

Des interactions entre les circuits autonomes et les circuits hédoniques modulent le comportement alimentaire [53]. Les neurones du circuit hédonique influencent les noyaux de l'hypothalamus et vice-versa, affectant le type et la quantité de nourriture consommée [54]. Les neurones dopaminergiques du Nac stimulent les neurones à orexine et MCH du LH, augmentant ainsi l'appétit pour la nourriture palatable [55] [56]. Réciproquement, les neurones à MCH du LH innervent le Nac, tandis que les neurones à orexine du LH innervent le VTA [57]. La région du tronc cérébral est également impliquée dans la régulation du système limbique via le noyau du tractus solitaire. De fait, les neurones GLP-1, stimulés par la présence de signaux métaboliques périphériques, se projettent vers le VTA et le Nac, activent les neurones anorexigènes locaux responsables de la diminution de la prise alimentaire et du poids corporel [58, 59].

Plusieurs hormones modulent aussi directement ou indirectement l'activité des neurones du système limbique (voir aussi le texte des sections suivantes). Le mécanisme par lequel la leptine agit sur le système de la récompense provient de l'activation des récepteurs LepR à la surface des neurones dopaminergiques [60]. La leptine stimule les neurones du LH et du VTA, causant, entre autres, une diminution du niveau de dopamine extracellulaire dans les régions limbiques [61]. Cette hormone informe les circuits hédoniques des réels besoins

physiologiques, dans le but d'inhiber les processus motivationnel et émotionnel impliqués dans l'action impulsive de manger [62]. L'insuline et la ghréline seraient également impliqués dans le contrôle de ce circuit proposant des mécanismes neuronaux similaires [54].

En plus du système dopaminergique, deux autres systèmes sont impliqués dans la régulation du comportement alimentaire hédonique, le système à opioïdes et endocannabinoïdes. Ces deux systèmes anaboliques augmentent la prise alimentaire et diminuent la dépense énergétique [63].



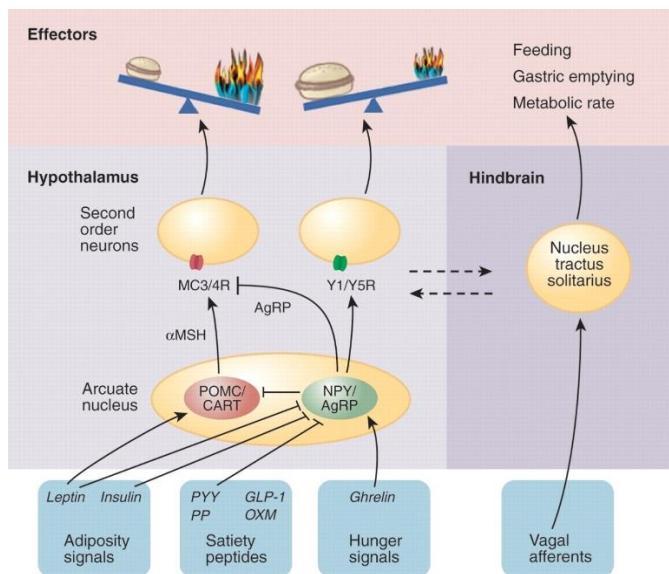
**Figure 3 : Régions cérébrales impliquées dans le circuit de la récompense et hédonique.**

Les structures cérébrales cortico- et mésolimbiques impliquées dans la régulation hédonique du comportement alimentaire.

[64]

## Hormones homéostatiques périphériques impliquées dans la régulation de la balance énergétique.

L'activité des circuits neuronaux centraux impliqués dans la régulation de la balance énergétique est influencée de manière tangible par des hormones et nutriments dont les niveaux varient selon l'état des réserves énergétiques, en particulier des réserves de graisse. Les variations de ces hormones constituent des signaux qualifiés d'homéostatiques (informant sur l'état des réserves énergétiques). Les hormones homéostatiques incluent des hormones adipocytaires et aussi des hormones gastrointestinales dont les sécrétions varient non seulement en fonction de l'état des réserves énergétiques mais aussi en fonction de l'état nutritionnel de faim ou de satiété.



**Figure 4 : Représentation des actions des signaux métaboliques sur le système à mélanocortine de l'hypothalamus et sur le noyau du tractus solitaire du tronc cérébral.**

Les signaux métaboliques rejoignent le noyau ARC en traversant la barrière hématoencéphalique. Les signaux stimulent les neurones du noyau ARC, POMC et NPY/AgRP. S'en suit une activation ou une inhibition des neurones du PVH, provoquant un effet catabolique ou anabolique sur le bilan énergétique, respectivement.

### *La leptine et l'homéostasie énergétique*

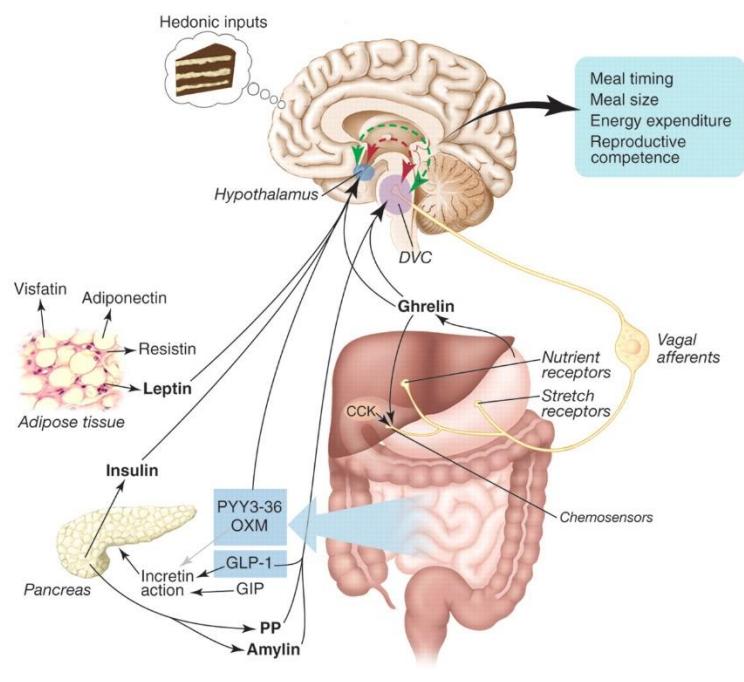
L'hormone homéostatique (réduisant les réserves énergétiques) la plus étudiée est la leptine. Cette protéine adipocytaire découverte en 1994 [66], sécrétée en proportion de la masse adipeuse [67] réduit la prise alimentaire et stimule la dépense énergétique, bien que ce dernier aspect ait été récemment remis en question [68]. La déficience en leptine cause l'obésité [69]. Des études ont en effet démontré un lien étroit entre certains types d'obésité monogénique sévère et une déficience en leptine [70]. Paradoxalement, l'excès de leptine en circulation induit la résistance à la leptine via différents mécanismes, dont la mutation de certains gènes, le changement dans le transport de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique et la perturbation de la voie de signalisation [71]. De fait, la majorité des personnes souffrant d'obésité présentent des signes de résistance à la leptine. Ces dysfonctionnements confirment le rôle important de cette hormone dans le relai d'information au système nerveux central, afin de maintenir un équilibre énergétique [67].

La leptine régule plusieurs fonctions, dont l'homéostasie énergétique, les systèmes neuroendocriniens et immunitaires, ainsi que les métabolismes du glucose et des lipides. [72] La concentration libérée dans la circulation sanguine est proportionnelle au niveau d'énergie emmagasinée dans les adipocytes et dépend de la quantité de calories ingérées [73]. La leptine module la déposition d'énergie en réduisant la prise alimentaire et en stimulant la dépense énergétique par l'activation des récepteurs neuronaux LepR. [11]. La leptine traverserait la barrière hématoencéphalique par l'éminence médiane située à proximité de l'hypothalamus [74]. L'activation des récepteurs LepR, situés à la surface des tanocytes (cellules épendymogliales bordant la base du troisième ventricule), permet le passage de la leptine dans le liquide céphalo-rachidien, suite à l'activation de différentes cascades de signalisation intracellulaire. Une fois dans les noyaux hypothalamiques, la leptine active les neurones anorexigènes POMC et inhibe les neurones orexigènes NPY/AgRP, du système à mélanocortine [75, 76]. Le VMH représente un autre site effecteur de la leptine dans l'équilibre énergétique. En effet, l'activation des neurones SF1 agit sur l'homéostasie du glucose. De plus, chez les rongeurs, des études ont démontré un effet stimulateur de la leptine sur l'expression des ARNm du gène de la protéine thermogène *Ucp-1*, corrélée avec la stimulation du noyau DMH, menant à l'activation de la thermogénèse du tissu adipeux brun (BAT). Tel que brièvement abordé précédemment, la leptine peut également agir directement sur le VTA et les structures du tronc cérébral [51],

modulant le circuit dopaminergique de la récompense [77]. L'ablation des récepteurs LepR dans ces régions augmente l'aspect gratifiant de la consommation de nourriture [78].

La ghréline acylée est une hormone gastro-intestinale qui stimule l'appétit [79]. Cette hormone est sécrétée par des cellules de l'estomac (surtout) lors du jeûne et cible les récepteurs GHS à la surface des neurones [80]. La ghréline active différents circuits neuronaux autonomes, dont les neurones orexigéniques NPY et AgRP, afin d'augmenter la prise alimentaire [81, 82]. L'effet orexigène de la ghréline se manifeste également suite à l'inhibition des neurones hypothalamiques POMC [83]. Ces neurones composent avec les neurones AgRP (qui expriment aussi NPY) et les neurones arborant le récepteur MC4R. L'activation directe des neurones du PVH par la ghréline promeut également le gain de poids corporel et de graisse adipocytaire [84]. De plus, des recherches ont démontré l'implication de la ghréline dans le circuit de la récompense mésolimbique. En effet, des récepteurs GHS ont été identifiés, notamment dans l'aire ventrale tegmentale (VTA) [85], une des principales régions du système de la récompense [86, 87]. Bien que cette hormone anabolique agisse sur le contrôle de l'appétit à court terme, sa concentration augmente de façon inversement proportionnelle au degré d'adiposité, lui conférant ainsi un rôle de modulateur énergétique à long terme [88].

À la périphérie, des récepteurs LepR sont également retrouvés dans la paroi du tractus gastro-intestinal et assurent la normalisation du taux de glycémie en ajustant le niveau de glucagon et en activant la libération de divers métabolites [69, 89].



**Figure 5 : Intégration à court et à long terme des signaux métaboliques périphériques dans l'équilibre énergétique**

Les voies de signalisation neuronale du complexe vagal dorsal reçoivent l'information de l'état énergétique par le nerf vague. Ce dernier, dont les afférences projettent dans les organes digestifs tels que l'estomac, le pancréas, l'intestin et le foie, est stimulé par la sécrétion d'hormones et de peptides (GLP-1, PYY, leptine, ghréline, insuline) [65]

### Contrôles à court terme de la prise alimentaire

Le contrôle à court terme de la prise alimentaire consiste en un enchaînement de réactions immédiates liées aux sécrétions du tractus gastro-intestinal qui constitue un organe endocrinien produisant des hormones impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire [90]. Ces hormones constituent des signaux libérés en réponse à l'ingestion, à la digestion, ainsi qu'à l'absorption des nutriments. Cette libération est maintenue selon l'intervalle interprandial et permet une communication entre le système nerveux central et le système gastro-intestinal [91]. En effet, ces signaux métaboliques modulent l'activité neuronale des circuits homéostatiques [92]. Physiologiquement, la faim survient en partie à cause d'un déficit énergétique qui se manifeste, entre autres, par une diminution de la glycémie et la sécrétion de la ghréline. Suite à l'ingestion d'aliments, l'activation des mécanorécepteurs, en réponse à une distension gastrique, entraîne le phénomène de la cascade de satiété [93]. Différents signaux anorexigènes sont ensuite libérés dans la circulation sanguine, dans

le but d'agir sur le contrôle neuronal de la prise alimentaire [94]. La cholecystokinine (CCK) est principalement synthétisée dans le duodénum et du jéjunum en réponse à l'ingestion de repas particulièrement riches en gras et en protéines [95]. En plus de son effet sur la réduction de l'appétit [96], la CCK régule également les mouvements gastro-intestinaux, participe à la sécrétion d'enzymes pancréatiques et cause la contraction de la vésicule biliaire [97]. Le GLP-1, membre de la famille des incrétines, est sécrété par les cellules entéro-endocrines de l'intestin et active des récepteurs spécifiques à la surface des cellules  $\beta$  pancréatiques. S'en suit une augmentation de la sécrétion de l'insuline de façon glucodépendante. GLP-1 joue donc un rôle majeur dans la régulation glycémique postprandiale [98]. GLP-1 agit également comme neurotransmetteur dans les circuits neuronaux du bilan énergétique [99]. Cette hormone est aussi produite au niveau du NTS et active les mécanismes de l'homéostasie du glucose, de la prise alimentaire et de la dépense énergétique, en stimulant les différentes populations de neurones de l'ARC [100, 101]. La sécrétion tardive du peptide tyrosine-tyrosine (PYY) se fait principalement au niveau distal du tractus gastro-intestinal. On constate une augmentation de la concentration du PYY environ 30 minutes après l'ingestion d'un repas, contrairement à la sécrétion précoce de la CCK et du GLP-1 dans les minutes suivant l'état postprandial. [102]. Ce peptide est reconnu pour son rôle anorexigène dans le système nerveux central [103]. Des études préliminaires ont également démontré le rôle du PYY dans la prolifération des entérocytes. [104]

## Dépense énergétique

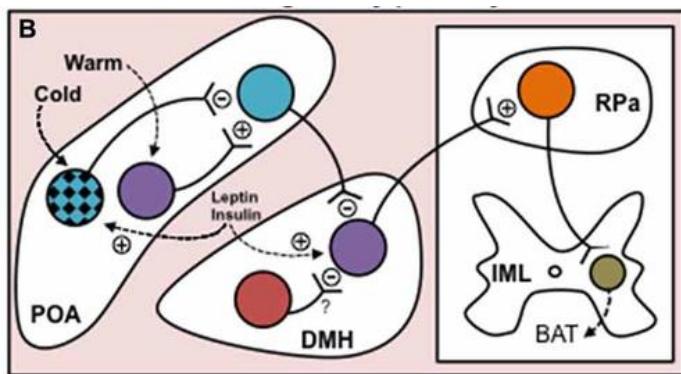
Dans un organisme, l'énergie se dissipe sous 3 formes principales : l'activité physique, le métabolisme basal et la thermogénèse adaptative [105]. Les circuits neuronaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire sont également impliqués dans la dissipation de l'énergie. Outre le circuit exécutif contrôlant les décisions d'engager une activité physique volontaire, le circuit autonome contrôle le métabolisme de base, ainsi que la thermogénèse adaptative des tissus adipeux bruns [53].

La thermogénèse adaptative (régulatrice du bilan d'énergie) implique le tissu adipeux brun (*brown adipose tissue — BAT*). Initialement localisé dans la région interscapulaire des rongeurs, le BAT se retrouve également chez l'humain, entre autres dans les régions cervicales et supraclaviculaires [106, 107]. Ce type de tissus adipeux, fortement

métabolique, se distingue du tissu adipeux blanc par sa quantité élevée de mitochondries [108]. La dissipation de l'énergie en chaleur est générée par le 'découplage' entre l'oxydation des substrats énergétique et la synthèse d'ATP, impliquant la protéine mitochondriale membranaire *uncoupling protein 1* (UCP1), exclusivement exprimée dans le tissu adipeux brun [109]. La stimulation adrénérique du récepteur  $\beta 3$  à la surface des adipocytes entraîne une entrée et une utilisation accrue des acides gras. S'en suit alors une activation d'UCP1 et une augmentation de l'activité de la chaîne de transport d'électrons et une accélération de l'oxydation des substrats lipidiques [110].

Le circuit principal du contrôle de la thermogénèse induit par le froid est le circuit *preoptic area* (POA)-DMH-raphe pallidus (RPa) [111]. Le POA, considéré comme un coordinateur majeur de la thermorégulation, est innervé d'afférences thermosensibles qui connectent avec les terminaisons nerveuses sous-cutanées [112]. Ces afférences périphériques, en réponse à une diminution de la température, stimulent les neurones GABAergiques du POA [113]. L'information se répand dans l'hypothalamus. Le noyau du DMH reçoit des afférences inhibitrices GABAergiques provenant du POA, permettant l'inhibition des neurones glutamatergiques [114], qui se projettent ensuite vers le RPa situé dans le tronc cérébral, où se trouve les neurones précurseurs des voies du système nerveux sympathique (SNS) innervant le BAT. L'activation du SNS amène la libération de la noradrénaline dans le (BAT) qui via les récepteurs  $\beta 3$  adrénériques induit l'hydrolyse des triglycérides, l'activation d'UCP1 et la thermogénèse [111]. Des études ont démontré le rôle des neurones NPY du DMH dans le contrôle négatif de la dépense énergétique, possiblement via l'inhibition des neurones glutamatergiques localisés dans le DMH lui-même [115].

Le système à mélanocortine est également une composante importante dans la dépense énergétique, via l'activation des récepteurs MC4R. [116]. D'abord, dans l'ARC, les neurones POMC se projettent vers le PVH, où une grande proportion de neurones exprimant MC4R connectent avec les voies du SNS qui atteint le tissu adipeux brun [117]. De plus, les neurones POMC sont aussi reconnus pour innérer le POA, modulant l'axe POA-DMH-RPa [53]. Le rôle des hormones cataboliques périphériques dans la thermogénèse a également été démontré, principalement par l'activation des neurones exprimant le récepteur LepR dans le DMH et le NTS [118].



**Figure 6 : Représentation des circuits neuronaux impliqués dans la régulation de la thermogénèse adaptative du tissu adipeux brun.**

Le circuit principal POA-DMH-RPa. Les neurones GABAergiques du POA, stimulés par le changement de température, projettent vers le DMH et inhibent les neurones glutamatergiques. Les neurones du DMH projettent vers le RPa, situé dans le tronc cérébral, et stimulent les neurones pré moteurs du tissu adipeux brun.

### Endozépines et homéostasie énergétique

Les benzodiazépines sont des modulateurs allostériques des récepteurs GABAergiques [119]. Ils sont reconnus notamment pour leurs effets anxiolytiques et relaxants [120]. C'est en 1985 qu'on identifia les endozépines, agonistes inverses du récepteur des benzodiazépines [121]. Initialement, plusieurs types moléculaires ont la capacité de se lier au site d'action des benzodiazépines, incluant les oléamides, les endozépines non-peptidiques et les neuropeptides [122]. Toutefois, l'endozépine le plus étudié et le plus polyvalent à ce jour est le *Diazepam Binding Inhibitor* (Dbi).

Les benzodiazépines (BZ) agissent via un site modulateur allostérique situé à la surface des récepteurs centraux GABA<sub>a</sub>R (CBR) [123]. Leur liaison module le flux d'ions chlorure en modifiant l'affinité pour la molécule GABA à son site d'action [124]. On observe alors une augmentation de l'entrée de ces ions dans la cellule et ainsi, une diminution du potentiel d'action [125]. En résumé, les BZ accroissent l'effet inhibiteur de la molécule GABA dans le système nerveux central. À l'inverse, les endozépines sont reconnus comme agonistes inverses, diminuant ainsi l'effet inhibiteur de la molécule GABA.

## Diazepam Binding Inhibitor

Le DBI est l'endozépine le plus largement étudié depuis sa découverte [126]. Le DBI est une petite protéine de 10 kDa, initialement isolée d'un échantillon de cerveau murin [126]. Sa séquence hautement conservée à travers les années et les espèces laisse présager une grande importance de fonctions dans le système nerveux central [127]. Des études ont confirmé l'expression majoritaire du DBI dans les cellules gliales, et les neurones [128]. On retrouve une forte expression du gène *Dbi* dans les parois des organes circumventriculaires du cerveau et dans les cellules Bergman du cervelet [129]. L'étude du DBI est devenue d'autant plus intéressante lors de la découverte d'une protéine possédant une séquence identique à cette dernière, déjà connue pour son rôle dans le métabolisme des acides gras, l'*Acyl-CoA Binding Protein* (ACBP) [130].

Le DBI est sécrété de manière non conventionnelle par autophagie, en réponse à différents signaux, telles la présence d'hormones stéroïdiennes, une augmentation de K<sup>+</sup> intracellulaire et la liaison avec différents ligands [131] [132] [133]. Le DBI présente plusieurs sites de clivage produisant différents fragments peptidiques, dont le triakontatetraneuropeptide (TTN, DBI<sub>(17-50)</sub>), l'octadecaneuropeptide (ODN, DBI<sub>(33-50)</sub>) et l'octapeptide (OP, DBI<sub>(43-50)</sub>) [134]. Il a été démontré que les trois peptides ont la capacité de déplacer les benzodiazépines de leur site allostérique et de moduler négativement le récepteur GABA. Le DBI et le TTN ont également la capacité de se lier à un second récepteur périphérique (PBR) [135]. Aussi connu comme étant une protéine de translocation, le PBR est un transporteur mitochondrial de cholestérol exprimé de façon ubiquitaire dans les cellules neuronales, mais également au niveau des organes périphériques [136].

## Récepteur à protéine G

La première évidence de l'existence d'un récepteur à protéine G ciblé par les endozépines a été démontrée lors d'une injection d'ODN dans une culture cellulaire d'astrocytes [137]. La présence d'ODN augmentait significativement la concentration intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> [138]. L'injection simultanée d'ODN et de l'antagoniste du récepteur GABAr, le flumazenil, ainsi que l'antagoniste du récepteur périphérique, le PK 11195, ne révélait aucun changement dans le flux d'ions intracellulaire. Par conséquent, l'existence

d'un troisième type de récepteur de l'ODN, possiblement un récepteur à protéine g (GPCR), était une option [139]. Quelques années plus tard, la découverte du rôle du DBI dans la régulation de l'équilibre énergétique via l'activation de ce potentiel récepteur à protéine G a renforcé l'intérêt pour l'étude et la caractérisation de ce récepteur [140]. En effet, l'activation d'un récepteur métabotropique positivement couplé à une phospholipase C via une protéine G sensible à la toxine pertussis (GPCR), a été confirmée par l'injection de son antagoniste, le cdLOP, supprimant l'effet énergétique observé avec le DBI [141].

## Activité biologique du DBI

Bien que DBI et ses dérivés peptidiques soient reconnus pour leurs implications dans différents mécanismes, dont ceux impliqués dans l'anxiété et le stress [139], nous traiterons ici uniquement l'activité biologique des endozépines dans la régulation autonome (essentiellement hypothalamique et par le tronc cérébral) de l'homéostasie énergétique. Une intense expression d'ARNm du DBI est observée dans différents noyaux hypothalamiques, dont le VMH, le DMH, le LH et l'ARC, ainsi qu'au niveau du tronc cérébral dans l'AP et le NTS [142, 143]. Une injection dans le ventricule latéral de différentes doses d'ODN réduit spontanément la prise alimentaire dans les 12 heures suivant l'injection. De plus, une injection chronique pendant 15 jours engendre une diminution de la prise de poids corporel, comparativement au groupe contrôle, et ce, via l'activation du récepteur à protéine G décrit ci-dessus [144]. De plus, il a été démontré que le DBI participait au contrôle hypothalamique de la détection du glucose, sans toutefois être impliqué dans la voie de signalisation de la leptine [142, 145]. De plus, les effets cataboliques du DBI sont relayés par l'activation du système à mélanocortine [146]. En effet, l'injection du DBI ou de l'ODN augmente la libération de la molécule  $\alpha$ -MSH [142]. Toutefois, l'hybridation *in situ* de *c-fos* suggère l'implication des neurones POMC du système à mélanocortine exclusivement dans le tronc cérébral. Aucune activité neuronale n'a été observée dans les noyaux hypothalamiques suite à l'injection de l'ODN [147]. Enfin, la délétion du gène *Dbi* chez la souris entraîne un phénotype d'obésité causé par l'ingestion excessive de nourriture, favorisant l'hyperphagie [148].

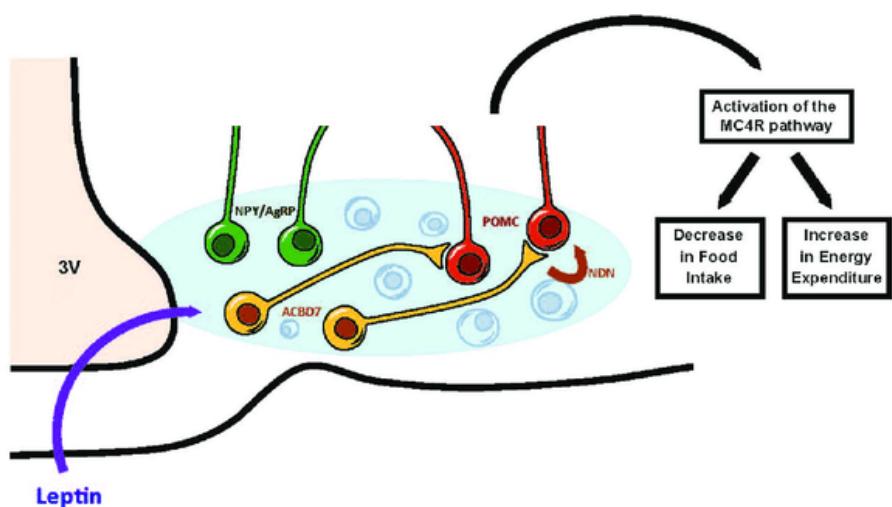
## Acyl-CoA Binding Domain 7

L'identification d'un gène parologue à 70 % d'homologie avec Dbi, exprimé dans le cerveau de souris, a suscité l'intérêt pour la caractérisation d'un nouveau membre potentiel des endozépines. En effet, en plus d'être de taille similaire au DBI, soit 10 kDa, ACBD7 est la seule protéine de la famille des Acyl-CoA Binding Domain, avec la protéine ACBP, à être exprimée majoritairement dans l'hypothalamus et à détenir qu'un seul domaine ACBP dans leur séquence [149]. Deux variantes du gène *Acbd7* existent actuellement, codant pour deux fragments peptidiques : le NDN, fragment de 19 acides aminés et le NEM 18, fragment de 18 acides aminés. À ce jour, seul le neuropeptide NDN a été étudié pour son activité biologique énergétique chez la souris.

L'analyse des composantes énergétique a été effectuée suivant l'injection de différentes doses de NDN. D'abord, on observe une diminution significative de la prise alimentaire, avec une dose optimale à 10 ng [150]. L'effet anorexigène perdure jusqu'à 6 heures post-injection. L'injection du NDN induit également une augmentation de la consommation d' $O_2$  et de la production de  $CO_2$ , sans affecter le quotient respiratoire et l'activité locomotrice globale de l'animal [151]. Concurremment à l'augmentation de la dépense énergétique, on observe également une augmentation de la production d'UCP-1 dans le tissu adipeux brun de la souris, suggérant l'activation des mécanismes de la thermogénèse [151]

Contrairement au DBI, l'ACBD7 est exprimée majoritairement dans les cellules neuronales. En effet, à l'exception des épendymocytes dorsaux entourant le troisième ventricule, les résultats d'immunohistochimie ont confirmé l'absence de co-localisation entre l'ACBD7 et le GFAP, un marqueur de cellules gliales [151]. Le rôle de l'ACBD7 dans ces épendymocytes reste encore inconnu. D'autres expérimentations ont permis de démontrer une co-localisation de l'ACBD7 avec VGAT, un marqueur de vésicules de transport GABA, ainsi que dans les neurones à POMC de l'ARC [151]. Ces résultats suggèrent une association de l'ACBD7 avec le système à mélancortine. En effet, l'injection simultanée de NDN et d'un antagoniste du récepteur MC4R inhibe complètement l'effet anorexigène de NDN. Des neurones ACBD7 sont également retrouvés dans le PVH, co-exprimant l'oxytocine et dont les projections se rendraient dans le tronc cérébral [151]. L'investigation sur le métabolisme énergétique a permis de confirmer l'influence du statut énergétique sur la production de l'ACBD7 et du NDN (augmentation de ces endozépines en état postprandial).

Enfin, il a été démontré que l'hormone adipocytaire, la leptine, stimule l'expression du NDN dans l'hypothalamus [150, 151]. Une étude a de plus confirmé la présence du récepteur de la leptine, LepR, à la surface des neurones ACBD7 [152]. Il est donc possible que les effets du NDN soient relayés par l'activation du système leptine-mélanocortine.



**Figure 7 : Circuit neuronal hypothétique illustrant l'implication d'ACBD7 dans la régulation du bilan d'énergie**

Les neurones ACBD7 se situent dans l'hypothalamus. La leptine active les neurones ACBD7, engendrant la libération de NDN. Le peptide NDN cible des récepteurs à protéines G à la surface des neurones de type POMC. L'activation de la voie de signalisation du système à mélanocortine diminue la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique.

### Problématique et objectifs de la recherche

La découverte des endozépines a permis la caractérisation d'une protéine polyvalente impliquée dans plusieurs mécanismes physiologiques, le *Diazepam Binding Inhibitor* [121]. Avant la caractérisation d'ACBD7 dans le bilan d'énergie, le DBI et ses dérivés étaient les seuls endozépines connus. Bien que l'intérêt pour le DBI demeure d'actualité dans la communauté scientifique, très peu d'études ont été faites sur l'implication d'ACBD7 dans le contrôle de l'équilibre énergétique. Des études préliminaires ont démontré

l'implication d'ACBD7 en tant que protéine anti-obésité, impliquée dans la diminution de la prise alimentaire et dans l'activation de la dépense énergétique [139, 150, 151]. Incidemment, l'élaboration de cibles thérapeutiques dans l'obésité reste à ce jour peu fructueuse et controversée. La chirurgie bariatrique demeure la meilleure option pour la perte de poids, bien que l'intervention soit complexe et invasive [153]. La compréhension des circuits neuronaux de l'équilibre énergétique et la découverte de nouveaux déterminants est importante pour le traitement et la prévention de l'obésité. Notre but est de poursuivre les études déjà entamées sur l'endozépine ACBD7, cette fois-ci chez le rat. L'étude portera principalement sur le rôle d'ACBD7 dans les circuits autonomes et hédoniques du bilan d'énergie.

## **Chapitre 1 : Article**

## **Involvement of Acyl-CoA Binding Domain 7 in the neuronal control of food intake and energy expenditure in rats**

Stéphanie Delage et Denis Richard

Institution: Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, 2725, chemin Sainte-Foy, Québec (Québec), G1V 4G5, CANADA

Keywords : Acyl-CoA Binding Domain 7, energy balance, brain, food intake, energy expenditure, fos, conditioned taste aversion

Running head : ACBD7 in energy balance

**Corresponding authors:** Dr Denis Richard, Direction de la recherche, Institut universitaire de cardiologie et de pneumologie de Québec, 2725, chemin Sainte-Foy, Québec (Québec), G1V 4G5, CANADA.

Phone: (418) 656-8711 ext. 1716

Courriel: [denis.richard@criucpq.ulaval.ca](mailto:denis.richard@criucpq.ulaval.ca)

## Résumé

La protéine Acyl-CoA Binding Domain 7 (ACBD7) appartient à la famille des Acyl-CoA Binding Domain, reconnus pour leur rôle dans le métabolisme des lipides, notamment dans la voie de la  $\beta$ -oxydation. *Acbd7* est un gène parologue au *Diazepam Binding Inhibitor* (DBI), une protéine catabolique associée à l'obésité chez l'humain. DBI code pour un fragment peptidique important, l'ODN (octadecaneuropeptide). Ces deux composés, désignés sous le terme de « Endozépines », induisent une balance énergétique négative en régulant les circuits de la prise alimentaire et de la dépense énergétique. L'expression d'ACBD7 a récemment été confirmée dans certaines populations de neurones de l'hypothalamus de la souris, impliqués dans le contrôle du bilan d'énergie. Les deux variantes du gène *Acbd7* connues à ce jour codent pour deux fragments peptidiques, le *Nonadecaneuropeptide* (NDN) et le *New Endozepine Member 18* (NEM18). Des études chez la souris ont démontré le rôle de NDN dans la régulation de l'équilibre énergétique via l'activation du système leptine-mélanocortine. Dans le présent travail, nous avons (i) vérifié l'implication d'ACBD7 dans le contrôle de la prise alimentaire et de la dépense énergétique chez le rat (ii) étudié les effets d'ACBD7 sur l'aversion gustative conditionnée et (iii) comparé l'expression cérébrale, les sites d'action neuronaux et les effets cataboliques d'ACBD7 et de DBI.

Contrairement à ce qui a été observé chez la souris, NDN n'influence pas les composantes de l'équilibre énergétique chez le rat. Les résultats suggèrent plutôt l'implication de NEM18 dans la prise alimentaire et la dépense énergétique. Toutefois, les effets observés avec NEM18 présentent des différences avec ODN. On dénote entre autres des différences significatives dans la distribution des ARNm, dans l'activation neuronale et dans les effets cataboliques chez le rat. De plus, l'expérimentation sur l'aversion gustative conditionnée avec NEM18 et ODN a permis d'écartier l'hypothèse que l'effet anorexigène proviendrait d'un malaise gastro-intestinal.

## **Abstract**

The protein Acyl-CoA Binding Domain 7 (ACBD7) belongs to the Acyl-CoA Binding Domain family, known for its role in lipid metabolism, especially in the  $\beta$ -oxidation pathway. *Acbd7* is a paralog gene to Diazepam Binding Inhibitor, a catabolic protein associated with obesity in humans. DBI codes for a peptide fragment, ODN. These two compounds, designated as Endozepines, induce a negative energy balance, by reducing food intake and increasing energy expenditure. Expression of ACBD7 was recently confirmed in hypothalamic neurons involved in regulation of energy balance. Energy balance is regulated whereas food intake and energy expenditure are controlled. The two variants of *Acbd7* code for two peptide fragments, nonadecapeptide (NDN) and the new endozepine member 18 (NEM18). Previous studies on mice have already shown the role of NDN in the regulation of energy balance via activation of leptin-melanocortin system. In this study, we first (i) confirmed the involvement of ACBD7 in the control of food intake and energy expenditure in rats, (ii) studied the effects of ACBD7 on conditioned taste aversion and (iii) compared the cerebral expression of mRNA, the neuronal action sites and the catabolic effects of ACBD7 and DBI.

Contrary to what was observed in mice, NDN did not influence components of energy balance. Results suggest the involvement of NEM18 in food intake and energy expenditure in rats. However, the effects observed with NEM18 were different compared to ODN. We observed significant differences in the mRNAs distribution, neural activation and catabolic effects in rats. In addition, analysis of the conditioned taste aversion excluded the hypothesis that the anorectic effect of NEM18 resulted from a gastrointestinal discomfort.

## Introduction

The high prevalence of obesity has more than doubled since the 1980s in industrialized countries [2]. Obesity generates social, economic and psychological impacts in addition to being a risk factor for several chronic diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, several types of cancer and musculoskeletal disorders, which all associate with abdominal obesity (fat visceral deposition) [4]. Obesity results from an energy balance and the understanding of the complex mechanisms that regulate that balance is necessary to refine the strategies to prevent or cure obesity [53]. Energy balance is regulated through controls exerted on food intake and energy expenditure. Various interconnected neural circuits govern these components, which include circuits in the hypothalamus, the main structure in energy homeostasis. The ARC, a hypothalamic nucleus extending on each side of the ventral third ventricle, is characterized as a metabolic circulating signal sensor and integrator [20]. It hosts' proopiomelanocortin (POMC) neurons, which form with the neurons producing the melanocortin receptor 4 (MC4R) key players of the melanocortin system, whose role in energy balance is key. The MC4R is found in the hypothalamic paraventricular nucleus, which forms with the ARC an important duet in the energy balance regulation [21]. The anorectic neurons POMC release  $\alpha$ -MSH and target the receptor MC4R within the PVH. Activation of MC4R leads to a decrease in food intake and an increase in energy expenditure. The ARC also includes neurons producing the agouti-related protein (AgRP), an endogenous inverse agonist of the MC4R, which promote food intake and decrease energy expenditure. AgRP neurons also express NPY, whose activation through Y1 and Y5 receptors is also anabolic [45].

Growing evidence suggests a possible role of the endozepines (EZs) in energy homeostasis [140]. EZs are derived from a glial endogenous protein, the diazepam binding inhibitor (DBI), and include the Octadecaneuropeptide (ODN), the Triakontatetraneuropeptide (TTN) and the Octaneuropeptide (OP). Previous studies showed that the catabolic role of ODN in decreasing of food intake and increasing of energy expenditure occurs via stimulation of the melanocortin system [142, 145, 147]. Recently, we identified a paralog protein of DBI, the Acyl-CoA Binding Domain 7 (ACBD7), which could also play a role in the regulation of energy balance and a role in obesity [151]. ACBD7 codes for two peptide fragments, nonadecaneuropeptide (NDN) and New endozepine member 18 (NEM18). Evidence has

already confirmed the involvement of NDN in food intake and energy expenditure in mice [151].

The present study aimed at investigating the role of ACBD7 and its encoded products (NDN and NEM18) in energy homeostasis in rats. We hypothesized a role in the control of food energy intake and energy expenditure through modulating the networks genuinely involved in energy homeostasis. In addition, this study compared catabolic effects observed with ACBD7 and DBI and investigated the possible differences between these endozepines.

## **Method**

### *Animals and surgical procedures*

Adult male Wistar rats (250-275 g) were housed at 22°C and subjected to 12h/12h dark/light cycle. They had free access to standard rodent «chow» and drinking water. For the intracerebroventricular injection, rats were stereotactically implanted with permanent 22-gauge guide cannula aimed at the right lateral ventricle using the following stereotaxic coordinates: 0.8 posterior to the bregma, 1.8 mm lateral to the bregma and 3.5 mm ventral to the skull surface. The cannula guide was stabilized with three screws and two layers of cranioplastic cement. To prevent the formation of clogging and possible cerebral infections, a sterile obturator was inserted into the cannula guide. The ventricular cannula position was verified with an Angiotensin II injection (5 ng) that led to a dipsogenic effect as positive control. Experiments were conducted according to the Laval University Animal Ethic Committee and the Canadian Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### *Rat Acbd7 and Dbi mRNA sequencing*

Rat hypothalamic mRNA was purified using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Toronto, Canada, ON), according to the manufacturer's instructions. The RNA concentrations were estimated from absorbance at 260 nm. cDNA synthesis was performed using random hexamer primers and the expand reverse transcriptase (INVITROGEN Roche Diagnostics, Laval, Canada, QC). The *Acbd7* cDNA was amplified using primers specific to the *Acbd7* sequence (Acbd7-FP: 5'-CAGCGTCCGTCTCATCA-3'; Acbd7-RP: 5'-

TGCTCAAGCAAGTAAAACCAGG-3') designed to cover the entire open reading frame of the *Acbd7* mRNA (429-bp). The *Dbi* cDNA was amplified using primers specific to the *Dbi* sequence (Dbi-FP: 5'-GATTCGACAAAGCCGCTGA-3'; Dbi-RP: 5'-AAACTCCAAAGGAAGGAGGAGC-3') designed to cover the entire open reading frame of the *Dbi* mRNA (400-bp). After purification on agarose gel, PRC product was sequenced by the proteomic platform of CRCHU of Quebec (Quebec City, Canada, QC).

#### *Acbd7 and Dbi probe design*

The rat *Acbd7* cDNA riboprobe was prepared from a 429-bp fragment of the entire open reading frame of the *Acbd7* mRNA using the previously described primers (*Acbd7*-FP and *Acbd7*-RP) and the rat *Dbi* cDNA riboprobe was prepared from a 400-bp fragment using the previously described primers (*Dbi*-FP ad *Dbi*-RP). After being subcloned, into a PGEM-T plasmid (Promega, Madison, Wisconsin), and linearized with *AatII* and *SpeI* for *Acbd7* and with *NcoI* and *PstI* for *Dbi* (New England Biolabs, Whitby, Canada, ON), for antisense and sense probes respectively, radioactive riboprobes was synthesized by incubating the linearized plasmid (250 ng) in 10 mM NaCl, 10 mM 1,4-dithiothreitol, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM Tris (pH 7.9), 0.2 mM ATP/GTP/CTP, 100 mCi a-35S-UTP (PerkinElmer, Foster City, California), 40 U RNase inhibitor (Roche Diagnostics), and 20 U of RNA polymerase (SP6 or T7 for antisense and sense probes, respectively) for 60 min at 37°C. DNase solution (100 µl) was added to the riboprobes. The riboprobes was purified using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), eluted in 150 ml of water, and incorporated in a hybridization solution containing 10<sup>7</sup> cpm of 35S probe (per ml), 52% formamide, 330 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, pH 8, Denhardt's solution 1x, 10% dextran sulfate, 0.5 mg/ml tRNA, 10 mM 1,4-dithiothreitol, and diethyl pyrocarbonate-treated water. This solution was mixed and heated at 65°C before being spotted on slides. The specificity of the probe was confirmed by the absence of positive signals in sections hybridized with the sense probe.

#### *In situ* hybridization

For the *c-fos* in situ hybridization, 4-hour fasted animals were icv injected with vehicle solution (aCSF), NDN (250 ng), NEM18 (250 ng) or ODN (1000 ng). The sacrifice was made 1 hour after the injection. After having been harvested, brains were kept in

paraformaldehyde (4%) for 7 days, transferred into a solution containing paraformaldehyde (4%) and sucrose (10%) and thereafter cut using a sliding microtome (Histoslide 2000, Heidelberger, Germany). Brain sections (30 mm) were taken from the olfactory bulb to the brainstem and stored at -30°C in a cryoprotective solution containing sodium phosphate buffer (50 mM), ethylene glycol (30%), and glycerol (20%). They were mounted onto poly-L-Lysine-coated slides. The *Acbd7*mRNA as well as *Dbi* and *c-fos* mRNAs were located by *in situ* hybridization as previously described (Baraboi et al., 2010). After hybridization, the slides were exposed on X-ray film (Eastman Kodak, Rochester, New York) for 6 days (*Acbd7*), 12 hours (*Dbi*) and for 1 day (*c-fos*). Once removed from the autoradiography cassettes, the slides were defatted in toluene and dipped in NTB2 nuclear emulsion (Kodak, Oakville, Canada, ON). The slides were exposed for 6 weeks (*Acbd7*), 4 days (*Dbi*) and for 1 week (*c-fos*) before being developed in D19 developer (Kodak) for 3.5 min at 14–15°C and fixed in rapid fixer (Kodak) for 5 min. Finally, tissues were rinsed in running distilled water for 2–3 hours, counterstained with thionin (0.25%), dehydrated through graded concentrations of alcohol, cleared in toluene, and coverslipped with dibutylphthalate-xylol (DPX) mounting medium.

#### *Drug injections*

Intracerebroventricular injections were performed in a final volume of 3 µl of artificial cerebrospinal fluid (aCSF; Harvard Apparatus, Saint-Laurent, Canada, QC). Synthetic NEM18 (34-51) (H-Gln-Ser-Val-Ile-Gly-Asp-Ile-Asn-Ile-Ala-Cys-Pro-Ala-Met-Leu-Asp-Leu-Lys-OH; Inserm U1239 and the Platform for Cell Imaging of Normandy, University of Rouen, France) fragment was injected at doses between 62.5 ng and 1000 ng for dose-response evaluation and 250 ng for the other experiments. Synthetic NDN (H-Gln-Ser-Val-Ile-Gly-Asp-Ile-Asn-Ile-Gly-Ala-Cys-Pro-Ala-Met-Leu-Asp-Leu-Lys-OH; Inserm U1239 and the Platform for Cell Imaging of Normandy, University of Rouen, France) corresponding to the ACBD789 (34-52) fragment was injected at doses between 62.5 ng and 1000 ng for dose-response evaluation and 250 ng for the other experiments. Synthetic ODN (H-Gln-Ala-Thr-Val-Gly-Asp-Val-Asn-Thr-Asp-Arg-Pro-Gly-Leu-Leu-Asp-Leu-Lys-OH; Inserm U1239 and the Platform for Cell Imaging of Normandy, University of Rouen, France) corresponding to the DBI (34-51) was injected at doses between 250 ng to 2500 ng for dose-response evaluation and 1000 ng for the other experiments. The intraperitoneal injections of LiCl 0.15 M (1.33

$\mu$ l/100 g of body weight) were performed in saline solution (NaCl, 0.9%) containing 10% DMSO.

#### *Food intake experiments*

Fasted rats (total 18 hr) had access to a weighed food pellet (25 g) 20 min after the intracerebroventricular injection for NDN and NEM18 and 45 min after the intracerebroventricular injection for ODN. Cumulative food intake was measured by briefly (less than 20s) removing and weighing the pellet at the indicated time points as previously described [140, 142].

#### *Indirect calorimetry*

After 48 hours of acclimation in metabolic cages, rats were monitored for a basic 24-hour measurement (ZT2 to ZT26, Zeitgeber time (ZT), where ZT0 = lights on and ZT12 = lights off,) with free access to standard rodent chow and drinking water. At ZT26, food was removed for the metabolic cages and rats were icv injected with vehicle solution (aCSF), NDN (250 ng), NEM18 (250 ng) or ODN (250 ng) at ZT30 and individually monitored by indirect calorimetry to analyze O<sub>2</sub> consumption, CO<sub>2</sub> production, respiratory quotient and energy expenditure. Rats were refed at ZT32. Measurements were made continuously over 24 hours (ZT30 to ZT54) in an open circuit system with an oxygen analyzer (IntegraME system, AccuScan Instruments, Inc., USA)

#### *Two-bottle preference test*

A two-bottle preference test was performed as previously described [154]. At ZT15, water was removed from the cage until ZT27. After the 12 hours without water access, animals were trained to drink water in a graduated bottle for a 30 min period (900–930 h) each day for 7 days to reduce the effects of neophobia to the novel test solution. This is important because there must be enough liquid intake during treatment to create an association with injected drugs and the test solution. On the eighth day, animals were

randomly divided into test groups and given a novel 0.15% sucrose solution to drink for 30 min. They were then injected icv with vehicle solution (aCSF), NEM18 (250 ng) or ODN (1000 ng) and ip with saline 0.9% or LiCl 0.15 M, and returned to their home cages. The animals were then put back on the restricted drinking schedule with water for the next 48 h until the two-bottle preference test was conducted. The animals were offered two graduated bottles attached to their cages side-by-side. One bottle contained control liquid and the other sucrose solution paired with drugs or vehicle. Liquid intake was measured after 30 min. To reduce the influence of the bottle placement, the procedure was repeated the next day with the bottle position reversed.

#### *Statistical analysis*

All data are expressed as mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Student's t test or the one-way ANOVA (Prism 6 software, GraphPad, La Jolla, California). For each test, a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

#### *Cumulative food intake*

One of the primary aims of this study was to demonstrate a potential anorectic effect induced by ACBD7 in rats. Indeed, a previous study [151] had confirmed a decrease in food intake with an icv injection of 10 ng of NDN in mice. The effect lasted approximately 6 hours, after which the latter lessened. Assuming that the concentration factor of active doses in rats is about 10 times higher than in mice, a dose of 0.1  $\mu$ g diluted in CSF was used in a group of fasted (18 hours) rats. No significant results were observed within 6 hours post-injection. Doses of 0.05  $\mu$ g, 0.25  $\mu$ g (Figure 1), 0.5  $\mu$ g and 1  $\mu$ g were therefore tested. None of the doses showed a significant anorectic effect.

Given that *Acbd7* does not only code for the fragment NDN but also for that of NEM18, it became relevant to replicate food intake data with the injection of different doses of this alternative neuropeptide. A decrease in food intake was seen in a significant way with 0.125

$\mu$ g of NEM18 (Figure 2A), 3 hours after the injection. The 0.25  $\mu$ g dose of NEM18 (Figure 2B) leads to an even greater reduction in food intake than that observable with 0.125  $\mu$ g and from the second hour post-injection. The lower and higher doses to that latter, 0.0625  $\mu$ g, 0.5  $\mu$ g and 1  $\mu$ g did not produce anorectic effects.

For ODN, one of DBI's proteolysis products, some studies have already demonstrated an anorectic effect with different doses in rats [147]. These results were replicated in the current study. The icv injection of 1  $\mu$ g (Figure 3) leads to a decrease in food intake between 2 hours and 9 hours post-injection.

According to studies already published in the field [146], and unlike ACBD7, whose activity occurred during the first 6 hours post-injection, the anorectic activity of DBI seemed to hold longer. No significant effects were seen with the injection of 0.25  $\mu$ g and 2.5  $\mu$ g of ODN (data not shown).

#### *Effect of intracerebroventricular injection on conditioned taste aversion (CTA) of sucrose solution*

The decrease in food intake in treated groups with specific doses of NEM18 and ODN confirmed the anorectic effect of these two peptides in the adult rat. However, the mRNAs expression of *Acbd7* and *Dbi*, seen with *in situ hybridization*, in specific regions of the brain involved in the conditioned taste aversion (see below) suggested that the reduction in food intake could relate to a potential discomfort in the animal after the peptide icv injection [155]. Therefore, a two-bottle preference test was performed to validate if a possible aversion could lead to the observed decreases in food intake.

The results were expressed as a percentage of the volume of sucrose solution on the total liquid consumed on the day of the test. Following the injection of 0.25  $\mu$ g of NEM18 (Figure 4A), 55 % of the volume corresponded to the sucrose solution. For the negative control group receiving an icv injection with aCSF and an ip injection with saline, 67 % of the ingested volume corresponded to the sucrose solution, an expected result given the basic preference of rodents without aversion. For the positive control group receiving a aCSF icv injection and a LiCl ip injection, an aversive solution, only 13 % of the total consumed volume

corresponded to the sucrose solution, which confirmed the presence of aversion induced by lithium. We observed a 10 % decrease in the volume of the sucrose solution consumed in the NEM18 treated group compared to the negative control group. However, the difference between data of the treated group and the positive control group was significant, which confirmed the lack of aversion created by NEM18.

For the injection of 1 µg of ODN (Figure 4B), the lack of aversion was also observed in the treated group. Indeed, the negative control group consumed 76 % of sucrose solution, the positive control group, 9% and the treated group, 64%, therefore providing data relatively similar to those obtained with the injection of NEM18.

#### *Energy expenditure*

We assessed the effect of 0.25 µg of NDN, 0.25 µg de NEM18 and 1 µg of ODN on the overall energy expenditure in kcal/h using indirect calorimetry ( $O_2$  consumption ( $VO_2$ ),  $CO_2$  production ( $VCO_2$ ) and respiratory quotient). The effect on the data of respiratory quotient ( $VCO_2/VO_2$ ) of the three studied peptides did not demonstrate significant differences from the control group. (data not shown). Figure 5A represents the 24-hour data of the  $O_2$  consumption in  $ml \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$  ( $VO_2$ ) before and after the icv injection of 0.25 µg of NDN. In addition to the lack of effect on the respiratory quotient, there was no significant effect on the  $O_2$  consumption by hour (14h00-24h00). The same pattern is seen in the Figure 5B, which shows 24-hour  $CO_2$  production data, and in the Figure 5C, which illustrates 24-hour energy expenditure data in kcal/h.

Regarding the injection of 0.25 µg of NEM18, the  $VO_2$  data were significantly increased in the treated group, up to six hours after the injection of the peptide (Figure 6A-B). After six hours, a reduction in the effect on  $O_2$  consumption occurred and data were comparable to those obtained in the control group. A similar, but less important trend was observed in the analysis of energy expenditure in kcal/h (EE) (Figure 6D-E). Despite the upward trend which continued up to 8 hours post-injection in the treated group, only one significant point of energy expenditure was observable. As for the effects of injection of NEM18 on RQ, no difference in the production of  $CO_2$  was noticed (Figure 6C).

Finally, the ICV injection of 1 µg of ODN also led to a significant effect on  $VO_2$  (Figure 7A-B). The peptide activated energy expenditure pathways in a more sustained way than

NEM18. Indeed, the most significant differences were observable after 5 hours and lasted up to 12 hours after the injection. Unlike the peptides derived from ACBD7, ODN caused an increase in VCO<sub>2</sub> (Figure 7C-D). The effect of the treated group was, however, less significant than that observed on O<sub>2</sub> consumption. The energy expenditure in kcal/h also shows an increase in response to the injection of ODN up to 12 hours post-injection (Figure 7E-F).

#### *RNA expression profile of Acbd7 and Dbi in the rat brain*

The mRNA expression of *Acbd7* in the rat brain was relatively weak compared to the mRNA expression of *Dbi*. Figure 8A-B present the expression of each protein according to brain regions of interest.

*The Acbd7* hybridization signal was observed in different regions of the autonomic and limbic circuits involved in energy homeostasis. In the hypothalamic and the brainstem nuclei, we observed a signal in the neurons of the PVH, the ARC and the AP. *Acbd7* mRNAs were also expressed in the ependymocytes which are dorsal glial cells of the third ventricle.

Regarding the limbic system, a strong expression of *Acbd7* was found in the Locus Coeruleus region, a neuronal structure mainly expressing noradrenaline. We also observed a moderate to low expression in the piriform cortex, the supraoptic nuclei, the median amygdala, the hippocampus (C3 and DG region), the median habenula and in the interpeduncular nucleus.

Analysis of the expression of mRNAs was also carried out with the *Dbi* probe. A general distribution was seen in the rat brain compared to *Acbd7*, which was more selective. Indeed, the expression of *Dbi* had already been confirmed in all glial cells, mainly in astrocytes [147], a type of glial cell ubiquitously present in the central nervous system. However, a strong expression of mRNAs was seen in the area postrema, the Bergmann cells of the cerebellum, the tanyctyes of the median eminence and the glial cells of the vascular organ of lamina terminalis. A moderate signal was expressed in the nuclei of the tracts solitary, the nuclei of Raphe Pallidus and in the tanyctyes of the 4th ventricle.

In addition to the area postrema region, other similarities in the distribution of *Dbi* and *Acbd7* in rats were observed, especially in the supraoptic nuclei, the median habenula and in the interpeduncular nuclei. No labelling was observed when the *Acbd7* and *Dbi* cDNA specific sense riboprobe were used (data not shown), confirming the specificity of the *Acbd7* and *Dbi* riboprobe.

*Effect of intracerebroventricular injection of 0.25 µg of NDN, 0.25 µg of NEM18 and 1 µg of ODN on mRNA c-fos expression in the rat brain.*

Due to cerebral lesions caused by the cannula insertion in the lateral ventricle, we observed neurons and damaged glial cells of the brain expressing c-fos. [156] In fact, due to this trauma, the neurons and damaged glial cells of the brain undergo a cellular depression leading to the induction of c-fos in the cells. The only significantly different regions between the control and the treated group with the injection of 0.25 µg of NDN were the PVN ( $p = 0.029$ ) (Figure 9B) and the Raphe nucleus ( $p = 0.0107$ ) (Figure 9E). With the injection of 0.25 µg of NEM18, the increase in neural signals was noticeably present in the PVH ( $p = 0.0272$ ) (Figure 9B) and in the Raphe nucleus ( $p = 0.0103$ ) (Figure 9E), but also in the ARC ( $p = 0.0202$ ) (Figure 9C) and the nucleus of the solitary tract ( $p = 0.0005$ ) (Figure 9F). The data obtained during food intake and indirect calorimetry with the injection of NEM18 were consistent with the neural activation of these regions.

Regarding the increase in the signal density with the injection of 1 µg of ODN, the activation of regions distinct from those observed with NDN and NEM18 was seen. Indeed, in addition to the increase of the c-fos expression in the RPa ( $p = 0.001$ ) (Figure 9E) and the NST ( $p = 0.0023$ ) (Figure 9F), an increase in the median preoptic nucleus ( $p = 0.0404$ ) (Figure 9A) and in glial cells in the wall of the third ventricle ( $p = 0.0169$ ) (Figure 9D) was found. No significant differences were observed in the hypothalamic nuclei.

## Discussion

The discovery of a population of ARC neurons involved in energy homeostasis and expressing ACBD7 have led to characterization of a potential new endozepine member. Previous studies by Lanfray et al. have shown a significant catabolic effect following the icv injection of 10 ng of NDN (ACBD7<sub>89 (34-52)</sub>) in mice [151]. The present study aimed to (i) confirm the implication of ACBD7 in the energy balance in rats (ii) compare the brain expression of *Acdb7* and the catabolic effect induced by ACDB7 with another well-known endozepine, *Dbi* [139] and (iii) verify the possible role of conditioned taste aversion in the anorectic effects of ACDB7.

Considering the proteomic analysis done on the rat hypothalamus, 65% of the ACBD7 isoform corresponded to NDN compared to 70% in mice. These results led us to think that NDN would also have a significant catabolic effect in rats. The measurement of food intake was first carried out over a total of 6 hours following the icv injection of different doses of NDN in rats to confirm the anorectic effect observed in mice [151]. However, none of the doses used produced any significant effects. Given these unexpected preliminary results, the measurements were then carried out with different doses of NEM18 (ACBD7<sub>88 (34-51)</sub>), another biological active fragment generated by ACBD7. A reduction in food intake was observed with specific doses of 125 ng and 250 ng. Consequently, these results suggest the involvement of NEM18 in the control of food intake in rats. The presence of a glycine residue at the active site of NDN could possibly decrease the interaction between the peptide and the receptor in rats. Thereby, a difference in the structural conformation of the g protein receptor probably exists between mice and rats [151].

As we know, previous studies also demonstrated the involvement of ODN (DBI<sub>(33-50)</sub>), one of the first characterized endozepine in energy balance of rats [140, 147]. The anorectic effects seen following the icv injection of 1 µg of ODN in this study corresponded to those previously described. However, compared to NEM18, the dose used was 10 times higher and the anorectic effects caused by ODN seemed to last longer, which suggests that NEM18 and ODN may act via different sites. In fact, *Dbi* is mainly expressed by glial cells, while *Acbd7* seems to be expressed by neurons [139].

Mechanisms whereby NEM18 and ODN exerts catabolic effects remain incompletely elucidated. Preliminary data with *in situ* hybridization suggested the presence of mRNAs of *Acbd7* and *Dbi* in nuclei involved in the acquisition of conditioned taste aversion, a behaviour that occurs when the consumption of a new substance is followed by a discomfort. We observed *Acbd7* mRNAs expression in the median amygdala, the hippocampus, the area postrema and the solitary nucleus. The activation of NTS and AP neurons was reported in response to a variety of aversive inputs [157-159]. It therefore seemed relevant to determine whether the anorectic effects were due to a food aversion caused by the injection of the peptide or a physiological action on appetite neural circuits [160, 161].

During the CTA protocol with the icv injection of NEM18 and ODN, a reduction of ingested sucrose solution was observable in both treated groups compared to the control group. However, the difference was not significant and could not prove the aversive role of those neuropeptides. In addition, treated groups did not present signs of discomfort, which was apparent in the group injected with LiCl. Consequently, the presence of these mRNAs could be involved in the activation of hedonic mechanisms, excluding the aversion.

Analysis by indirect calorimetry was done to confirm the involvement of the Endozepines in energy expenditure. As we know, hypothalamic and brainstem autonomous circuits regulate energy expenditure via adaptive thermogenesis [20]. The results obtained with the injection of 250 ng of NDN confirmed the lack of effect of this peptide in the control of energy expenditure in rats. Indeed, none of the 4 parameters measured shown variations between groups injected with aCSF and the active peptide. Accordingly, NDN does not seem to activate neuronal circuits involved in the regulation of energy balance, or too weakly to see variations in metabolism.

On the other hand, we could confirm that energy expenditure in rats was stimulated by NEM18 in rats. Indeed, energy expenditure was increased with injection of NEM18, suggesting the stimulation of the basal metabolism or thermogenesis neural circuits.

Our results may confirm the hypothesis put forward by Alquier T. et al., which states that ODN activates a subset of POMC neurons and that higher doses ( $>0.1 \mu\text{g}$ ) are required to affect energy expenditure [146]. Our results confirmed that an injection of 1  $\mu\text{g}$  of ODN increased energy expenditure in rats. However, ODN seemed to activate energy

expenditure circuits later, to last for a longer period and to be more significant than NEM18. Those results support the involvement of different mechanisms whereby the peptide influences energy expenditure.

The analysis of both components of the energy balance confirmed the involvement of ODN and NEM18 at different degrees in the control of food intake and energy expenditure in rats. The reasons for the distinct effects of the peptides could be the different sites of action. *Dbi* is known to be expressed by several glial cells, but the scientific community is still debating the possibility that ODN could also be expressed by neurons [146]. The few studies done with *Acbd7* have found expression almost exclusively in neurons. We found relevant to study the distribution of the mRNAs and the neuronal activation, to confirm the possible difference in the cell type expressing both peptides, and to understand the neuronal circuits involved in the action of *Acbd7* and *Dbi* in energy homeostasis.

*In situ* hybridization of *Acbd7* and *Dbi* confirmed some differences in the localization of the mRNAs in the autonomous circuits. We observed a significant expression of *Acbd7* in the ARC and PVH, both hypothalamus nuclei involved in the regulation of energy homeostasis through the activation of the melanocortin system [162]. In contrast, no signal was found in the PVH with ODN and the signal in the ARC seemed to come from glial cells of the wall of the ventricle, known as tanycytes. This first observation could predict the absence of the hypothalamic leptin-melanocortin pathway in the regulation of energy with ODN. Differences in leptin pathway is already known for ODN and NEM18. Leptin injection increases *Acbd7* expression [151], while no effect was observed in DBI expression [147].

Neurons of the parabrachial nucleus, which is known to be activated by POMC neurons, express *Acbd7*, but not *Dbi* [11]. In the brainstem, we observed an ODN signal in the RP, but no detection of *Acbd7*. This result supports the hypothesis that *Dbi* could be expressed by neurons. RP has been reported to be involved in the control of the energy expenditure and receives projections from the hypothalamus. Food intake is also controlled by GABAergic neurons from this region [35]. However, similar expression with *Acbd7* and *Dbi* were observed in the AP, one of the structures of the vagal complex that integrates peripheral homeostatic signals [11]. Signal is also observed in the NTS, which receives afferents of POMC neurons from the ARC, which are involved in the control of thermogenesis [163].

A *Dbi* signal was also observed in regions involved in the mesolimbic circuit. This dopaminergic neural circuit controls the motivational, emotional and hedonic aspects of the eating behaviour [54]. Results shown an expression of *Acbd7* in MHb, hippocampus, MeA, LC and IPn regions. *In situ* hybridization of *Dbi* revealed a poor *Dbi* signal in the reward system. Only the regions of MHb and IPn expressed mRNAs, which suggests a weak implication of *Dbi* in the mesolimbic circuit, contrary to *Acbd7*. Further investigations will be necessary to understand the involvement of both peptides in the hedonic and motivational circuits. In summary, significant differences have to be considered in the distribution of mRNA of *Acbd7* and *Dbi* in the rat brain, even if both genes are paralog.

Finally, a portrait of neuronal activation (*c-fos*) was carried out in the rat brain following the injections of NDN, NEM18 and ODN, in order to highlight the differences in the distribution of the ACBD7 and DBI receptor [140, 151]. This *in situ* hybridization protocol with *c-fos* also allowed for a better understanding of the circuits activated by these neuropeptides. Following the results obtained from the analysis of the regulation of energy balance with NDN, the involvement of the peptide in the control of food intake and energy expenditure seems almost nonexistent in rats. We expected few neural activities in the circuit of energy homeostasis. Indeed, a slight increase of neuronal signals was observed in only two regions, namely the PVN and the RPa, and appear to be not enough to induce effect on energy balance. The hypothesis for the activated regions following the injection with NEM18 was obviously contrary to that of NDN. The significant decrease in food intake and the increase in certain indirect calorimetry variables suggested a significant activation of the energy expenditure circuit. We observe an increase in the signal in the hypothalamic nuclei, mainly the ARC and the PVN. The injection of 0.25 µg of NEM18 in rats could possibly activate the neurons of the melanocortin system involved in the regulation of food intake, specifically anorectic neurons POMC. In addition, an increase in the signal in the NTS, a primary integration site for homeostatic signals [164] and in the RPa, an area required for the central melanocortin-induced thermogenesis [165] was observed, which also confirm the activation of different regions of the brainstem involved in energy expenditure.

The differences in homeostasis actions observed in this study between NEM18 and ODN were also confirmed in the expression of *c-fos*. Contrary to NEM18, ODN did not increase the *c-fos* expression in the hypothalamus, which excludes ODN as a modulator of the hypothalamic melanocortin system. However, a significant signal was observed in tanyocytes

of the third ventricle and in NTS. Studies already hypothesized that ODN expressing cells could act as sensors of circulating compounds, in turn, release ODN, and modify excitability of NTS neurocircuitries involved in food intake [147]. Regions involved in the control of energy expenditure and thermogenesis were also increased with the injection of ODN, respectively RPa and the MnPO, potentially accounting for the results obtained with the indirect calorimetry.

In summary, the results presented in this study described for the first time the involvement of ACBD7 as an actor in the regulation of the energy balance in rats. Contrary to what was observed in mice with NDN, NEM18 seemed to be the active neuropeptide involved in the reduction of food intake and in the increase in energy expenditure in rats. The *in situ* hybridization results also suggested the involvement of neurons from the autonomous and mesolimbic circuits in the effects of NEM18. Additionally, we compared the effect of the two endozepines, ACBD7 and DBI in rats, on the energy balance. We also demonstrated differences in the mRNA distributions of *Acbd7* and *Dbi* in the rat brain and the differences in neural activation they produced. We now have a better understanding of the endozepines expressed in the rat brain, and about the neural systems expressing them and their biological mechanisms.

## Figures and Tables

**Figure 1:** Effect of NDN on the cumulative food intake. Effect of 0.25 µg injection of NDN in the lateral ventricle on the cumulative food intake in a group of 18-hour fasted rats ( $n=8$ ). Animals were injected with substances diluted in CSF and had access to food 15 minutes after the injection. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA, test Fisher's: \* $p< 0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

**Figure 2:** Effects of NEM18 on food intake. Effects of (a) 0.125 µg and (b) 0.25 µg injection of NEM18 in the lateral ventricle on the cumulative food intake in a group of 18-hour fasted rats. Animals were injected icv with substances diluted in CSF and had access to food 15 minutes after the injection. Data are expressed in means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA, test Fisher's: \* $p< 0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

**Figure 3:** Effects of ODN on food intake. Effect of 1 µg injection of ODN in the lateral ventricle on the cumulative food intake in a group of 18-hour fasted rats ( $n=9$ ). Animals were injected icv with substances diluted in CSF and had access to food 45 minutes after the injection. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA, test Fisher's: \* $p< 0.05$ : \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

**Figure 4:** Effects of NEM18 and ODN on the acquisition of conditioned taste aversion to a 0.15% sucrose solution. Two-bottle preference choice tests between water and sucrose solution. Quantity of ingested liquid in 30 min in the controls vs. treated group with (a) 0.25 µg of NEM18 and (b) 1 µg of ODN, expressed as a percentage of the total volume. Unpaired t test: \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .

**Figure 5:** Effects of an icv injection of NDN on energy expenditure. Effects of an icv injection of 0.25 µg of NDN on (a) O<sub>2</sub> consumption, (b) CO<sub>2</sub> production and (c) energy expenditure in kcal/h. Data are shown per hour before and after the icv injection of NDN. Data between 8 am and 2 pm were not available and corresponded to the fasting time. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. The unpaired t test: p< 0.05: \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

**Figure 6:** Effects of an icv injection of NEM18 on energy expenditure. Effects of an icv injection of 0.25 µg of NEM18 on (a-b) O<sub>2</sub> consumption, (c) CO<sub>2</sub> production and (d-e) energy expenditure in kcal/h. Data are shown per hour before and after the icv injection of NEM18

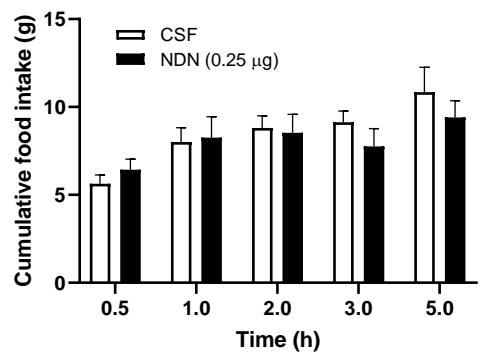
(a, c and d). Data between 8 am and 2 pm were not available and corresponded to the fasting time. Data are shown for each hour post-injection of NEM18 (b and e). Data are expressed as means  $\pm$  SEM. The unpaired t test: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ .

**Figure 7:** Effects of icv injection of ODN on energy expenditure. Effects of icv injection of 1  $\mu$ g of ODN on (a-b)  $O_2$  consumption (c-d)  $CO_2$  production and (e-f) energy expenditure in kcal/h. Data are shown per hour before and after the icv injection of NEM18 (a-c-e). Data between 8 am and 2 pm were not available and corresponded to the fasting time. Data are shown for each hour post-injection of NEM18 (b-d-f). Data are expressed as means  $\pm$  SEM. The unpaired t test: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

**Figure 8:** Relative (a) *Acbd7* and (b-c) *Dbi* mRNA levels in the rat brain structures.

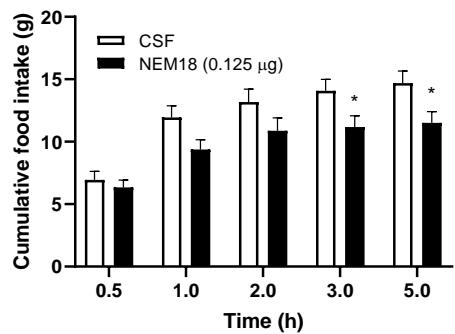
**Figure 9:** Effects of icv injections of 0.25  $\mu$ g of NDN, 0.25  $\mu$ g of NEM18 and 1  $\mu$ g of ODN on c-fos mRNAs expression in rat brain. Data represent the optical density of *in situ* hybridization signal of c-fos mRNAs in brain regions. Density was calculated for (a) MnPO, (b) PVH, (c) ARC, (d) wall of the third ventricle, (e) RPa and (f) NTS. The other regions did not show density difference with CSF control group. The unpaired t test: \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ .

**Figure 1:**

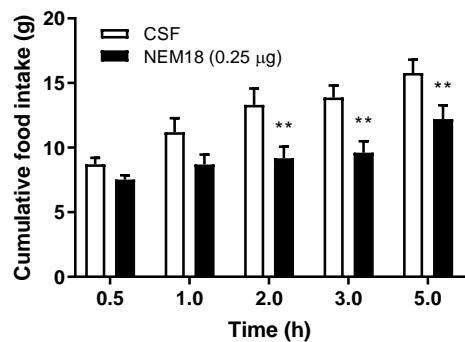


**Figure 2:**

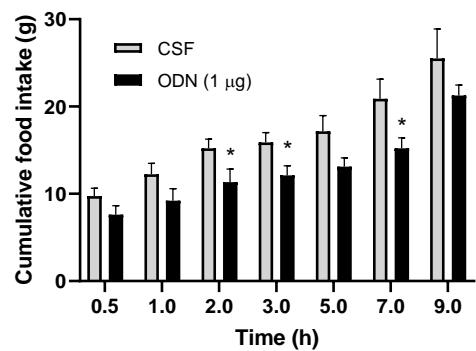
A



B

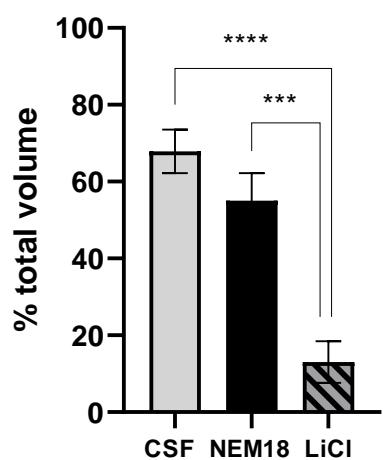


**Figure 3:**

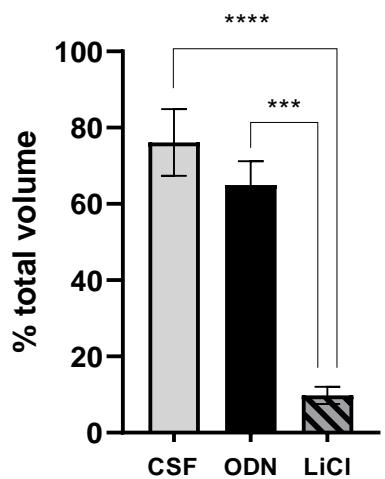


**Figure 4:**

A

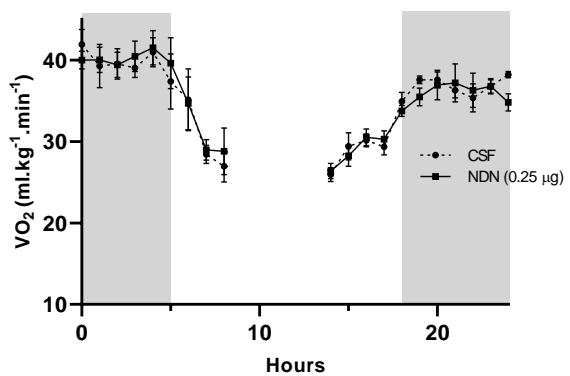


B

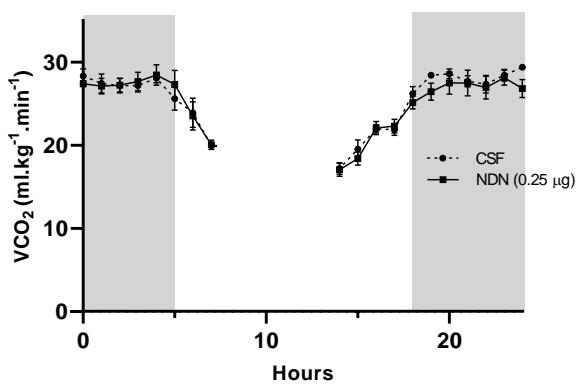


**Figure 5:**

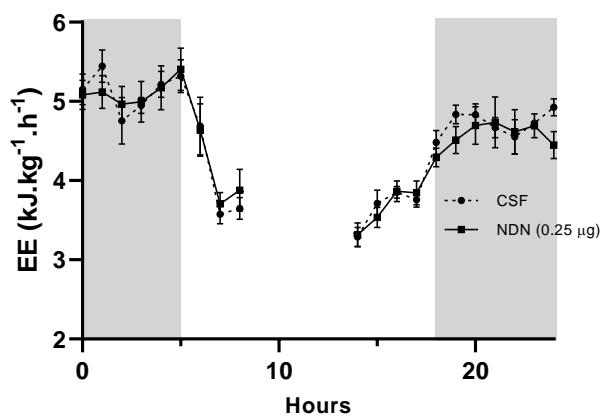
A



B

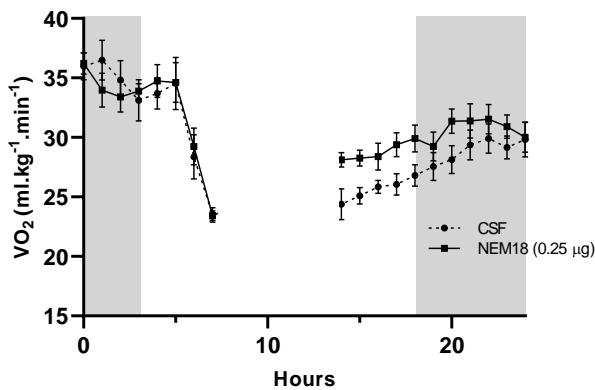


C

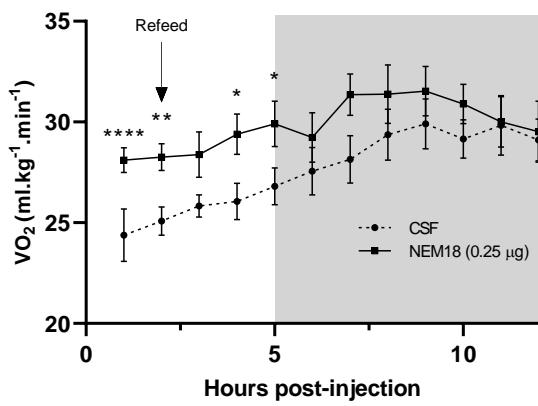


**Figure 6:**

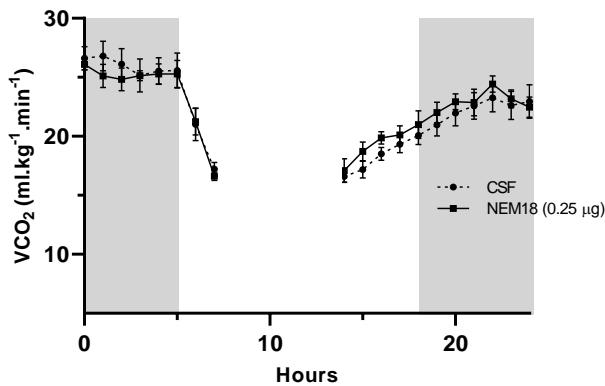
A



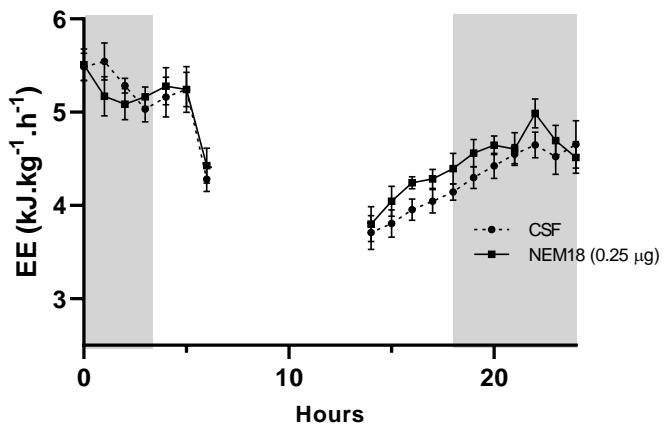
B



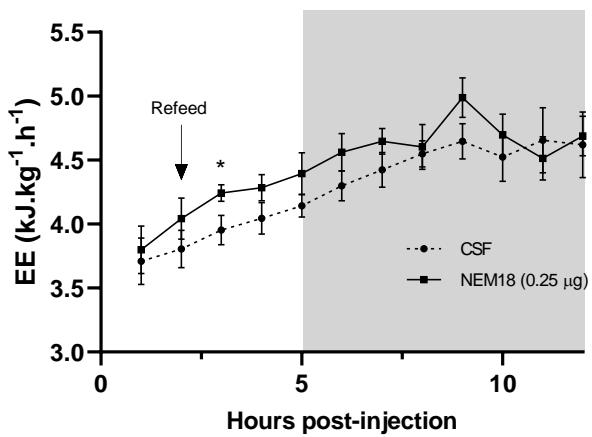
C



D

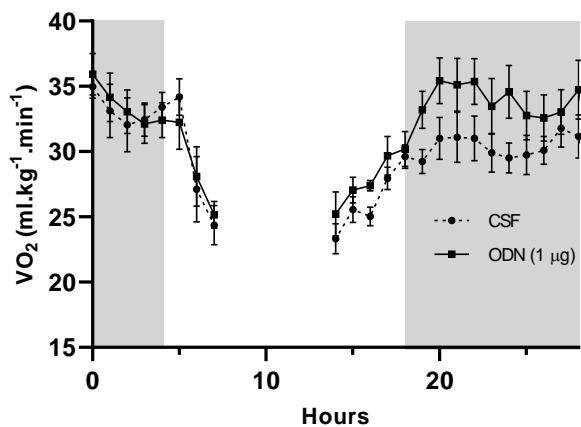


E

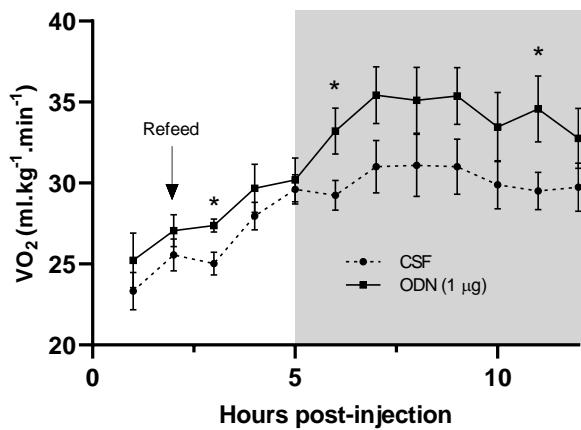


**Figure 7:**

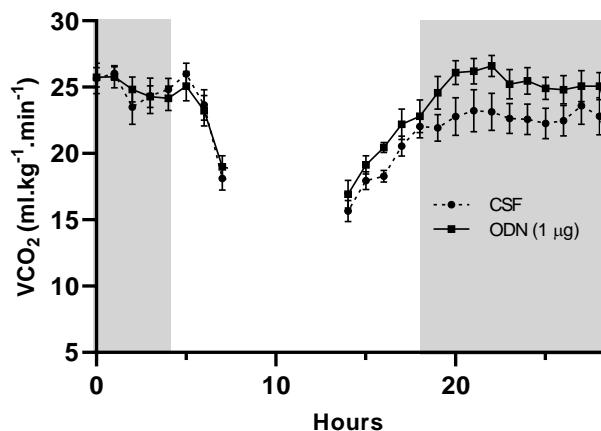
A



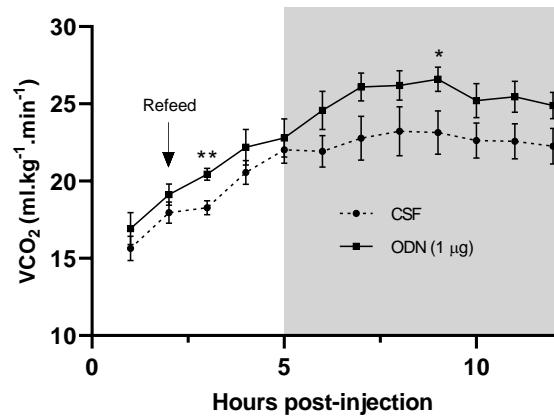
B



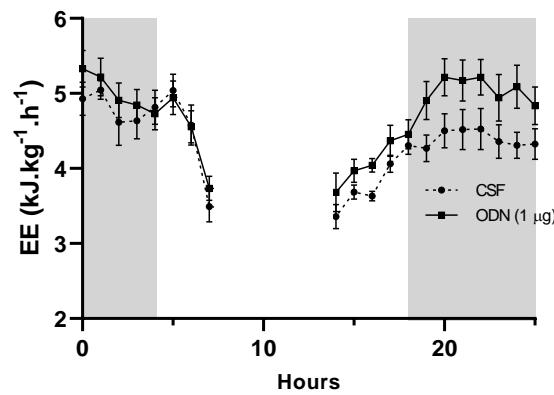
C



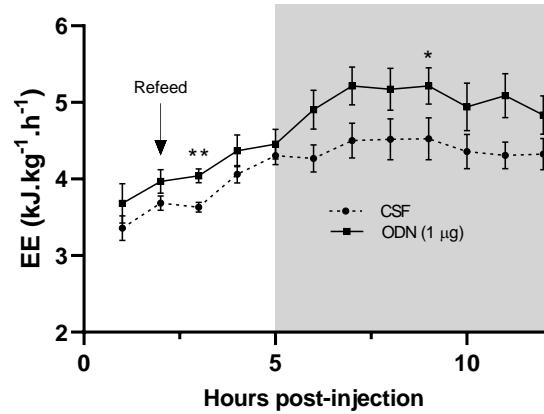
D



E



F



**Figure 8:**

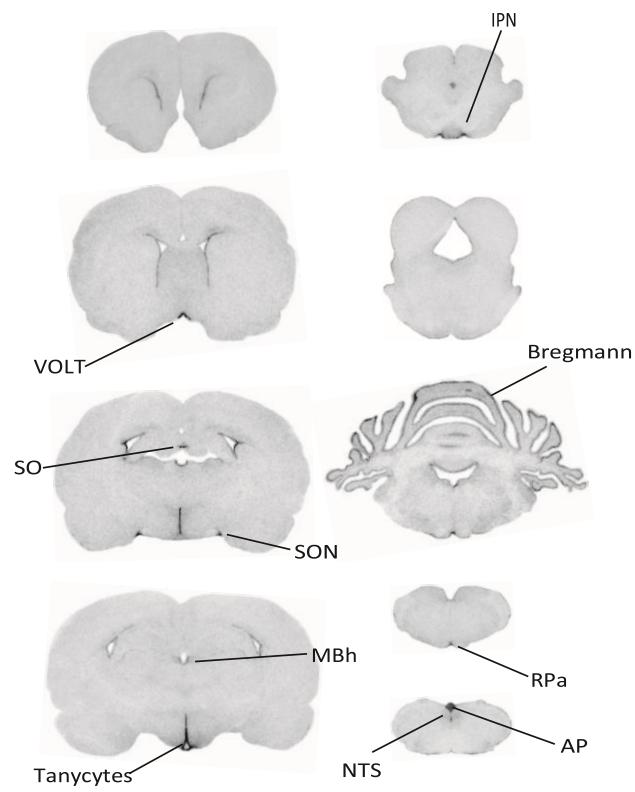
A

Brain structures	Relative level of <i>Acbd7</i> mRNAs
Piriform cortex	++
Paraventricular nucleus (PVN)	++
Supraoptic nucleus (SON)	+
Median amygdala	+
Arcuate nucleus (ARC)	++
Hippocampus	++
Ependymocytes	++
Median Habenula (MBh)	++
Intrapeduncular nucleus (IPN)	+
Locus Coeruleus (LC)	++
Area Postrema (AP)	+

B

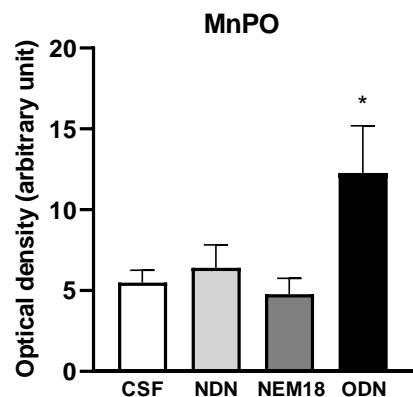
Brain structures	Relative level of <i>Dbi</i> mRNAs
Vascular organ of lamina terminalis (VOLT)	+++
Supraoptic nuclei (SON)	++
Subfornical organ (SO)	+
Tanycytes (third ventricle)	++
Tanycytes (median eminence)	+++
Median Habenula (MBh)	++
Interpeduncular nucleus (IPN)	+
Bregmann (cerebellum)	+++
Nucleus Raphe pallidus (Rpa)	++
Area postrema (AP)	+++
Nucleus of the solitary tract (NTS)	+

C

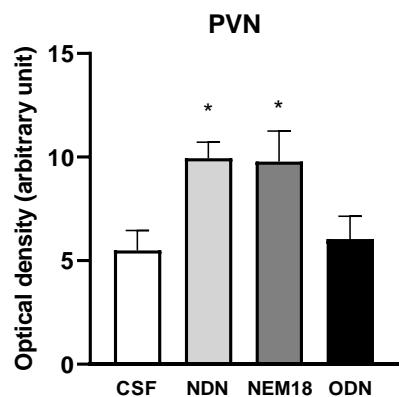


**Figure 9:**

A

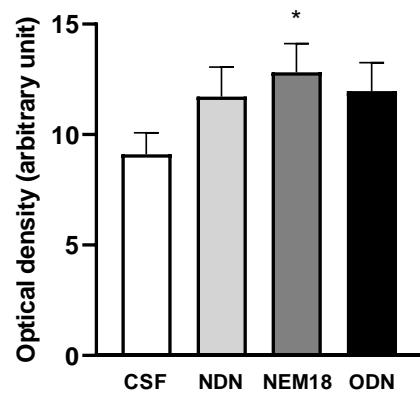


B



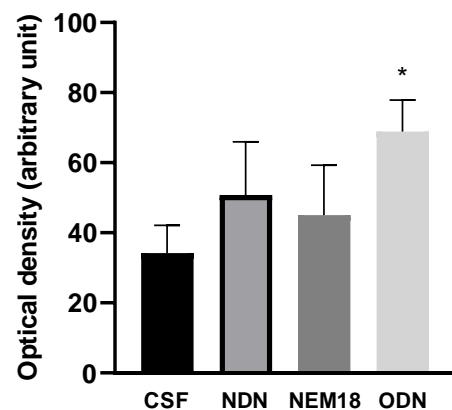
C

**ARC**



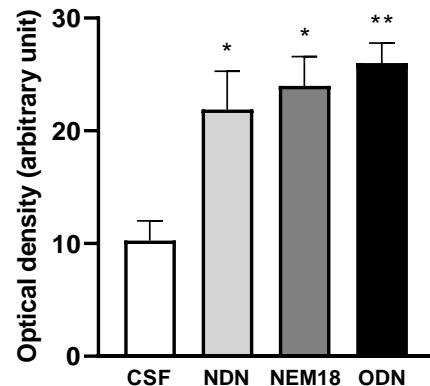
D

**Wall of the third ventricle**

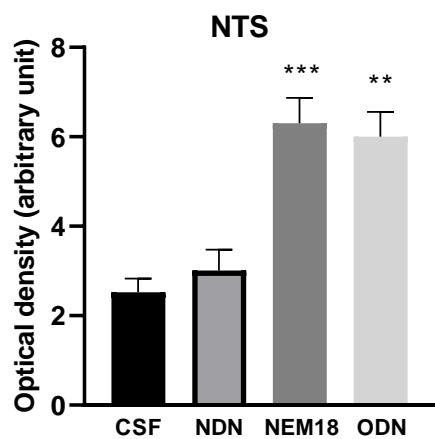


E

**RPa**



F



## Chapitre 2 : Discussion générale

La découverte du site de liaison des benzodiazépines à la surface des récepteurs GABA a permis la caractérisation d'un ligand endogène, le *Diazepam Binding Inhibitor* (DBI) [122]. Des études ont démontré la capacité de DBI à déplacer les benzodiazépines de leur site d'action et ainsi, agir, entre autres, au niveau des comportements anxiogènes [166]. Le gène *Diazepam Binding Inhibitor* code pour divers fragments peptidiques actifs, dont l'ODN, également reconnu comme modulateur allostérique du récepteur GABA [167]. Toutefois, outre les récepteurs GABA et TSPO (translocator protein) [139], ODN active également un récepteur à protéine G, entraînant une modification des composantes du bilan d'énergie. Le séquençage de la protéine DBI a permis de déceler une séquence d'acides aminés identique à l'*Acyl-CoA Binding Protein* (ACBP), d'où l'intérêt pour l'étude des mécanismes neuronaux de l'obésité et l'implication des protéines de la famille des *Acyl-CoA Domain* [168].

Récemment, l'expression d'une protéine parologue à plus de 70% d'homologie de séquence avec DBI, ACBD7, a été observée dans certaines populations de neurones de l'hypothalamus de souris. [151] Les deux protéines sont de tailles identiques (10 kDa) et expriment le seul et même domaine ACBP à leur surface, justifiant leur analogie de structure et de fonction [169]. De la même façon que le peptide ODN est issu d'un clivage peptidique de DBI, ACBD7 code pour deux fragments actifs, soit le Nonadecaneuropeptide (NDN) et le New Endozepine Member 18 (NEM18) [151]. Cette découverte a influencé l'équipe du Dr Denis Richard à étudier l'effet d'ACBD7 et de ses fragments dans le contrôle neuronal des composantes énergétiques chez la souris. Les résultats obtenus ont permis de démontrer l'implication de NDN dans la régulation du bilan d'énergie via l'activation du système leptine-mélanocortine. En effet, NDN induit une balance énergétique négative en activant les circuits hypothalamiques de la prise alimentaire et de la dépense énergétique [150, 151].

Le but de cette présente étude était d'abord de confirmer l'implication d'ACBD7 dans la régulation du bilan d'énergie chez le rat. Une mesure de prise alimentaire sur 6 heures a été effectuée suite à l'injection de 100 ng de NDN, dose potentiellement optimale chez le rat, considérant celle préalablement déterminée chez la souris. Étonnamment, aucune diminution de la prise alimentaire n'a été observée. Toutefois, il a été confirmé chez la souris que l'action du peptide NDN résulte en une courbe dose-réponse en forme de U, suggérant

une absence d'effet lors de concentrations trop faibles ou trop élevées [151]. Différentes doses ont donc été testées entre 62.5 ng et 1000 ng, démontrant néanmoins les mêmes résultats négatifs. Le peptide NDN n'étant pas le seul fragment issu d'ACBD7, l'hypothèse que NEM18 soit le peptide susceptible de causer des effets sur la régulation du bilan d'énergie chez le rat était envisageable. En effet, l'injection icv de 250 ng de NEM18 à engendré une diminution significative de la prise alimentaire sur 5 heures. La différence d'effet observée entre NDN et NEM18 chez le rat s'expliquerait au niveau de la séquence du site actif. On constate la présence d'un résidu glycine additionnel dans la séquence de NDN, ce qui contribuerait potentiellement à diminuer l'interaction entre le peptide et le récepteur chez le rat, contrairement à ce qui est observé chez la souris. Par ailleurs, il est probable qu'une différence de conformation dans la structure du récepteur chez le rat et la souris explique la différence d'effet observée entre les deux modèles animaux.

Un groupe a également été injecté avec 1 µg d'ODN dans le but de comparer les effets anorexigènes engendrés par ces deux endozépines. D'abord, contrairement au NEM18, la dose optimale efficiente avec l'ODN est 10 fois plus élevée, démontrant une différence dans les mécanismes d'action des deux peptides. De plus, l'effet anorexigène observé avec l'ODN semble perdurer sur un plus long laps de temps, soit plus de 9h.

Les mesures de la prise alimentaire ont permis de confirmer les effets anorexigènes engendrés par les peptides NEM18 et ODN chez le rat. Toutefois, les mécanismes d'action responsables de cet effet ne sont pas complètement élucidés. En effet, une diminution de la prise alimentaire peut être causée par l'acquisition d'une aversion gustative conditionnée [158]. Il est donc pertinent de déterminer si l'effet anorexigène résulte de l'activation physiologique des circuits neuronaux de l'appétit ou d'un simple malaise causé par l'injection des peptides d'intérêts. Un test de conditionnement avec une solution de sucre a confirmé l'absence de malaise chez le groupe traité avec les peptides. Il est donc possible d'affirmer que les effets anorexigènes observés avec le NEM18 et l'ODN ne sont pas causés par une aversion.

L'analyse par calorimétrie indirecte a été utilisée afin de déterminer l'implication d'ACBD7 et de DBI dans le contrôle des circuits neuronaux de la dépense énergétique. D'abord, l'injection de NDN n'a démontré aucun effet sur la dépense énergétique mesurée à partir des valeurs de consommation d' $O_2$ , confirmant l'inactivité de NDN dans la régulation de la

prise alimentaire et de la dépense énergétique chez le rat. L'injection de NEM18 a en contrepartie amené une augmentation significative de la consommation d' $O_2$  et de la dépense énergétique globale en kcal/h. L'augmentation des valeurs de ces paramètres suggère une activation des circuits de la thermogénèse, considérant l'absence d'effet sur les valeurs de l'activité locomotrice dans le groupe traité avec NEM18. Enfin, l'analyse a également été effectuée suite à l'injection de 1000 ng d'ODN. En plus de générer une augmentation significative de la consommation d' $O_2$  et de la dépense énergétique globale en kcal/h, le neuropeptide élève également la production de  $CO_2$ . Ainsi, différents effets sur la dépense énergétique sont observés suite à l'injection de NEM18 et d'ODN. L'activation des mécanismes physiologiques de la dépense d'énergie suite à l'injection d'ODN semble retardée comparativement à NEM18, considérant le délai d'apparition des effets des deux neuropeptides. De plus, les effets cataboliques observés avec ODN persistent jusqu'à 12 h post-injection, soit deux fois plus longtemps que ceux observés avec NEM18.

Les différences observées lors de l'analyse des composantes énergétiques suite à l'injection de NEM18 et d'ODN suscitent plusieurs interrogations concernant leurs mécanismes d'action dans la régulation du bilan d'énergie chez le rat. L'analyse de la distribution des ARNm d'*Acbd7* et de *Dbi*, ainsi que l'analyse de l'activité neuronale permettent l'identification des circuits neuronaux impliqués, et par le fait même, une meilleure compréhension des mécanismes d'action impliqués.

Certaines études antérieures ont permis d'identifier les types cellulaires exprimant *Dbi* et *Acbd7*[128, 151]. Les ARNm de *Dbi* sont exprimés majoritairement dans les cellules gliales du système nerveux central, dont les astrocytes [170]. Toutefois, certaines évidences récentes suggèrent l'expression neuronale des ARNm de *Dbi* également [139]. À l'opposé, *Acbd7* est exprimé principalement par diverses populations de neurones GABAergiques.

La différence dans les types cellulaires se confirme lors de l'analyse de l'hybridation *in situ* dans le cerveau de rat. On observe un signal de base avec la sonde *Dbi*, étant donné la présence ubiquitaire des cellules gliales dans le cerveau, contrairement à la sonde *Acbd7* qui génère un signal localisé provenant de populations de neurones bien précises. D'abord, un signal significatif est observé avec *Acbd7* dans l'ARC et le PVN, deux noyaux hypothalamiques importants dans la régulation du bilan d'énergie. Au contraire, aucun signal n'est présent dans le PVN avec *Dbi* et le signal observé à proximité de l'ARC semble

provenir des cellules gliales de la paroi du 3<sup>e</sup> ventricule. Cette observation suggère une possible implication du système leptine-mélanocortine hypothalamique dans la régulation du bilan d'énergie avec NEM18, mais pas avec ODN. Des différences existent déjà dans le mécanisme d'action de la leptine, soutenant cette hypothèse. En effet, l'injection de leptine est reconnue pour augmenter l'expression d'ACBD7 dans l'hypothalamus, tandis qu'aucun effet n'est observé dans l'expression de DBI [151]. De plus, *Acbd7* est également exprimé dans le noyau parabrachial, reconnu pour recevoir les projections des neurones POMC de l'hypothalamus, tandis qu'aucune expression d'ODN n'a été observée dans cette région. On observe toutefois un signal significatif avec la sonde *Dbi* dans le RPa, suggérant l'implication des circuits neuronaux de la thermogénèse. Une expression analogue des ARNm des deux endozépines est observée dans l'AP, le NTS et le SON, trois régions impliquées dans la régulation autonome de la prise alimentaire et de la dépense énergétique.

Une autre différence d'expression se retrouve dans les régions du circuit hédonique et motivationnel du comportement alimentaire. En effet, un signal significatif avec la sonde *Acbd7* est présent entre autres dans le cortex piriforme, l'hippocampe, l'amygdale médiane et le NTS. Toutefois, aucune de ces régions n'exprime *Dbi*, suggérant un rôle négligeable du circuit hédonique dans le contrôle de la prise alimentaire avec ODN, contrairement à NEM18.

Enfin, la mesure de l'activité neuronale avec le proto-oncogène *c-Fos* permet d'identifier les circuits neuronaux activés par les molécules d'intérêt, soit ACBD7 et DBI. Ce protocole d'hybridation *in situ* permet également de démontrer la distribution des récepteurs ciblés par ces molécules.

D'abord, on observe une augmentation du signal de l'activité neuronale dans le PVN et le RPa suite à l'injection de NDN. Ces résultats sont cohérents avec l'analyse des composantes énergétiques préalablement obtenue, soit aucun effet significatif sur la prise alimentaire et la dépense énergétique. L'activation de certains neurones du PVH et du RPa ne semble pas suffisante pour générer des effets marqués sur la balance énergétique à eux seuls. Cette évidence se confirme en observant l'augmentation du signal neuronal suite à l'injection de NEM18, le peptide actif issu d'ACBD7 chez le rat. En plus d'une augmentation de signal dans le PVH et le RPa tel qu'observé avec le NDN, le NEM18 active également des neurones de l'ARC et du NTS, deux régions importantes dans le contrôle indispensable

pour engendrer les effets observés avec le NEM18 sur la prise alimentaire et la dépense énergétique. Enfin, l'analyse de l'activité neuronale a permis d'expliquer en partie les différents effets observés avec NEM18 et ODN. D'abord, confirmant l'hypothèse que la régulation du bilan d'énergie avec ODN ne dépendrait pas de l'activation du système à mélanocortine hypothalamique; aucune augmentation significative de signal neuronal n'a été observée dans le noyau de l'ARC. Toutefois, en plus du NTS et du RPa, on dénote une forte augmentation du signal dans la paroi du 3<sup>e</sup> ventricule. Les tanyocytes tapissant cette paroi jouent le rôle d'interface entre la circulation périphérique et le système nerveux central. En plus de détenir le rôle de senseur, ces cellules spécialisées permettent la diffusion de différents signaux métaboliques impliqués dans la régulation du bilan d'énergie [171]. Ce résultat suggère donc un rôle d'ODN dans les voies de signalisation des tanyocytes. Une augmentation du signal avec ODN est également observée dans le noyau MnPO, reconnu entre autres pour son implication dans le contrôle de la dépense énergétique. Par conséquent, la différence dans la distribution des signaux *c-Fos* dans les cerveaux injectés avec NEM18 et ODN confirme une différence dans les circuits activés par les deux endozépines et ainsi, justifie les effets observés sur la prise alimentaire et la dépense énergétique.

## Conclusion générale

En résumé, cette présente étude a permis de décrire pour la première fois l'implication d'ACBD7 dans la régulation de la balance énergétique chez le rat. Contrairement à ce qui a été observé chez la souris, le neuropeptide NDN ne semble pas induire de changement dans la prise alimentaire et la dépense énergétique. Toutefois, le fragment peptidique NEM18, à une dose de 250 ng, semble activer les circuits neuronaux impliqués dans la régulation du bilan d'énergie. Jusqu'à 6 heures suivant l'injection, NEM18 diminue la prise alimentaire et augmente la dépense énergétique de façon significative. L'analyse des composantes énergétiques a également été effectuée avec ODN et les résultats confirment un effet catabolique significatif. Toutefois, des différences dans les effets cataboliques engendrés par l'action de NEM18 et ODN ont été observées. Une hybridation *in situ* avec les sondes *Acbd7* et *Dbi* a démontré une différence dans la distribution des ARNm respectifs. De plus, on constate également une différence dans l'activité neuronale avec *c-fos* suite à l'injection des deux endozépines d'intérêt. Ces analyses ont permis de démontrer

une différence dans les circuits neuronaux activés par NEM18 et ODN, expliquant en partie les différents effets cataboliques observés suite à l'injection de ces deux endozépines.

## Perspectives

Cette étude nous a permis de démontrer le rôle de NEM18 dans la régulation de la balance énergétique chez le rat, ainsi que l'absence d'effet du peptide NDN, contrairement à ce qui a été observé chez la souris. Les expérimentations effectuées sur la prise alimentaire cumulative et sur la dépense énergétique ont démontré des effets significatifs sur 6 heures suivant l'injection ICV de 250 ng de NEM18. Toutefois, l'injection chronique sur plusieurs jours n'a pas été effectuée. Ce protocole permettrait d'abord de valider l'effet du peptide NEM18 sur la variation du poids corporel chez le rat. De plus, il serait intéressant de déterminer si l'injection répétée engendre une désensibilisation ou une diminution de l'effet chez le rat. Pour cette étude, les rats étaient sous diète classique *Chow*. Il serait pertinent de reproduire les mêmes expérimentations, mais sous un régime riche en graisse. Étant donné que le métabolisme de base peut varier selon l'état énergétique de l'animal, principalement au niveau des résistances à l'insuline et à la leptine, ainsi qu'au niveau de la sécrétion des signaux métaboliques en circulation, l'élaboration de ce modèle pourrait nous informer sur les mécanismes d'actions de NEM18 lors de différentes situations métaboliques. Enfin, les objectifs initiaux pour ce projet étaient d'étudier ACBD7 dans le comportement alimentaire. Il serait donc intéressant de poursuivre sur l'étude des circuits hédoniques et motivationnels avec NEM18.

## Bibliographie

1. santé, O.m.d.l. *Surpoids et obésité: définitions*. 2020 [cited 2020 03 feb].
2. santé, O.m.d.l. *Obésité et surpoids*. 2018 [cited 2018 16 feb].
3. Engin, A., *The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome*. Adv Exp Med Biol, 2017. **960**: p. 1-17.
4. Tchernof, A. and J.P. Despres, *Pathophysiology of human visceral obesity: an update*. Physiol Rev, 2013. **93**(1): p. 359-404.
5. Yoo, S., *Dynamic Energy Balance and Obesity Prevention*. J Obes Metab Syndr, 2018. **27**(4): p. 203-212.
6. Miller, G.D., *Appetite Regulation: Hormones, Peptides, and Neurotransmitters and Their Role in Obesity*. Am J Lifestyle Med, 2019. **13**(6): p. 586-601.
7. Roh, E. and M.S. Kim, *Brain Regulation of Energy Metabolism*. Endocrinol Metab (Seoul), 2016. **31**(4): p. 519-524.
8. Kim, K.S., R.J. Seeley, and D.A. Sandoval, *Signalling from the periphery to the brain that regulates energy homeostasis*. Nat Rev Neurosci, 2018. **19**(4): p. 185-196.
9. Vigh, B., et al., *Cerebrospinal fluid-contacting neurons of the central canal and terminal ventricle in various vertebrates*. Cell Tissue Res, 1983. **231**(3): p. 615-21.
10. Rodriguez, E.M., J.L. Blazquez, and M. Guerra, *The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: the former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid*. Peptides, 2010. **31**(4): p. 757-76.
11. Richard, D., *Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(8): p. 489-501.
12. Ferguson, A.V., K.J. Latchford, and W.K. Samson, *The paraventricular nucleus of the hypothalamus - a potential target for integrative treatment of autonomic dysfunction*. Expert Opin Ther Targets, 2008. **12**(6): p. 717-27.
13. Ellacott, K.L. and R.D. Cone, *The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1471): p. 1265-74.
14. Elias, C.F., et al., *Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area*. Neuron, 1999. **23**(4): p. 775-86.
15. Shen, W.J., et al., *Melanocortin neurons: Multiple routes to regulation of metabolism*. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017. **1863**(10 Pt A): p. 2477-2485.
16. Fekete, C., et al., *alpha-Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus*. Neurosci Lett, 2000. **289**(2): p. 152-6.
17. Mercer, R.E., M.J. Chee, and W.F. Colmers, *The role of NPY in hypothalamic mediated food intake*. Front Neuroendocrinol, 2011. **32**(4): p. 398-415.
18. Brothers, S.P. and C. Wahlestedt, *Therapeutic potential of neuropeptide Y (NPY) receptor ligands*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(11): p. 429-39.
19. Broberger, C., et al., *The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AGRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 15043-8.
20. Caron, A. and D. Richard, *Neuronal systems and circuits involved in the control of food intake and adaptive thermogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 2017. **1391**(1): p. 35-53.
21. Beckers, S., et al., *The role of the leptin-melanocortin signalling pathway in the control of food intake*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2009. **19**(4): p. 267-87.
22. 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.
23. Choi, Y.H., et al., *Revisiting the Ventral Medial Nucleus of the Hypothalamus: The Roles of SF-1 Neurons in Energy Homeostasis*. Front Neurosci, 2013. **7**: p. 71.

24. Carter, M.E., et al., *Genetic identification of a neural circuit that suppresses appetite*. Nature, 2013. **503**(7474): p. 111-4.
25. Zhao, L., et al., *Central nervous system-specific knockout of steroidogenic factor 1 results in increased anxiety-like behavior*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(6): p. 1403-15.
26. Zhang, N., et al., *Activation of Dorsomedial Hypothalamic Neurons Promotes Physical Activity and Decreases Food Intake and Body Weight in Zucker Fatty Rats*. Front Mol Neurosci, 2018. **11**: p. 179.
27. Schwartz, M.W., et al., *Central nervous system control of food intake*. Nature, 2000. **404**(6778): p. 661-71.
28. Yao, Z. and K. Scott, *Glucose-Sensing Neurons Reciprocally Regulate Insulin and Glucagon*. Trends Neurosci, 2020. **43**(1): p. 2-5.
29. Schneeberger, M., R. Gomis, and M. Claret, *Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance*. J Endocrinol, 2014. **220**(2): p. T25-46.
30. Grijalva, C.V. and D. Novin, *The role of the hypothalamus and dorsal vagal complex in gastrointestinal function and pathophysiology*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **597**: p. 207-22.
31. Lutz, T.A., *Effects of amylin on eating and adiposity*. Handb Exp Pharmacol, 2012(209): p. 231-50.
32. Gross, P.M., et al., *Microvascular specializations promoting rapid interstitial solute dispersion in nucleus tractus solitarius*. Am J Physiol, 1990. **259**(6 Pt 2): p. R1131-8.
33. Zheng, H., et al., *Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(1): p. R247-58.
34. Ellacott, K.L., I.G. Halatchev, and R.D. Cone, *Characterization of leptin-responsive neurons in the caudal brainstem*. Endocrinology, 2006. **147**(7): p. 3190-5.
35. Nectow, A.R., et al., *Identification of a Brainstem Circuit Controlling Feeding*. Cell, 2017. **170**(3): p. 429-442 e11.
36. Zhan, C., et al., *Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively*. J Neurosci, 2013. **33**(8): p. 3624-32.
37. Campos, C.A., et al., *Cancer-induced anorexia and malaise are mediated by CGRP neurons in the parabrachial nucleus*. Nat Neurosci, 2017. **20**(7): p. 934-942.
38. Essner, R.A., et al., *AgRP Neurons Can Increase Food Intake during Conditions of Appetite Suppression and Inhibit Anorexigenic Parabrachial Neurons*. J Neurosci, 2017. **37**(36): p. 8678-8687.
39. Campos, C.A., et al., *Parabrachial CGRP Neurons Control Meal Termination*. Cell Metab, 2016. **23**(5): p. 811-20.
40. Wu, Q., M.P. Boyle, and R.D. Palmiter, *Loss of GABAergic signaling by AgRP neurons to the parabrachial nucleus leads to starvation*. Cell, 2009. **137**(7): p. 1225-34.
41. Hajnal, A., R. Norgren, and P. Kovacs, *Parabrachial coding of sapid sucrose: relevance to reward and obesity*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1170**: p. 347-64.
42. Waterson, M.J. and T.L. Horvath, *Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding*. Cell Metab, 2015. **22**(6): p. 962-70.
43. de Macedo, I.C., J.S. de Freitas, and I.L. da Silva Torres, *The Influence of Palatable Diets in Reward System Activation: A Mini Review*. Adv Pharmacol Sci, 2016. **2016**: p. 7238679.
44. Davis, C., S. Strachan, and M. Berkson, *Sensitivity to reward: implications for overeating and overweight*. Appetite, 2004. **42**(2): p. 131-8.
45. Saper, C.B., T.C. Chou, and J.K. Elmquist, *The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating*. Neuron, 2002. **36**(2): p. 199-211.
46. Swanson, L.W., *Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior*. Brain Res, 2000. **886**(1-2): p. 113-164.
47. Berthoud, H.R., *Multiple neural systems controlling food intake and body weight*. Neurosci Biobehav Rev, 2002. **26**(4): p. 393-428.
48. Fuster, J.M., *The prefrontal cortex and its relation to behavior*. Prog Brain Res, 1991. **87**: p. 201-11.
49. Palmiter, R.D., *Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors: lessons from dopamine-deficient mice*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1129**: p. 35-46.

50. Hyman, S.E., R.C. Malenka, and E.J. Nestler, *Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory*. Annu Rev Neurosci, 2006. **29**: p. 565-98.
51. Morton, G.J., et al., *The action of leptin in the ventral tegmental area to decrease food intake is dependent on Jak-2 signaling*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009. **297**(1): p. E202-10.
52. Berridge, K.C., 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. Physiol Behav, 2009. **97**(5): p. 537-50.
53. Rui, L., *Brain regulation of energy balance and body weight*. Rev Endocr Metab Disord, 2013. **14**(4): p. 387-407.
54. Fernandes, M.F., et al., *Nutritional controls of food reward*. Can J Diabetes, 2013. **37**(4): p. 260-268.
55. Harris, G.C., M. Wimmer, and G. Aston-Jones, *A role for lateral hypothalamic orexin neurons in reward seeking*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 556-9.
56. Sakurai, T., et al., *Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior*. Cell, 1998. **92**(4): p. 573-85.
57. Bielajew, C. and P. Shizgal, *Evidence implicating descending fibers in self-stimulation of the medial forebrain bundle*. J Neurosci, 1986. **6**(4): p. 919-29.
58. Alhadeff, A.L., L.E. Rupprecht, and M.R. Hayes, *GLP-1 neurons in the nucleus of the solitary tract project directly to the ventral tegmental area and nucleus accumbens to control for food intake*. Endocrinology, 2012. **153**(2): p. 647-58.
59. Dossat, A.M., et al., *Glucagon-like peptide 1 receptors in nucleus accumbens affect food intake*. J Neurosci, 2011. **31**(41): p. 14453-7.
60. Liu, J., et al., *Selective deletion of the leptin receptor in dopamine neurons produces anxiogenic-like behavior and increases dopaminergic activity in amygdala*. Mol Psychiatry, 2011. **16**(10): p. 1024-38.
61. Krugel, U., et al., *Basal and feeding-evoked dopamine release in the rat nucleus accumbens is depressed by leptin*. Eur J Pharmacol, 2003. **482**(1-3): p. 185-7.
62. DiLeone, R.J., *The influence of leptin on the dopamine system and implications for ingestive behavior*. Int J Obes (Lond), 2009. **33 Suppl 2**: p. S25-9.
63. Cota, D., et al., *Cannabinoids, opioids and eating behavior: the molecular face of hedonism?* Brain Res Rev, 2006. **51**(1): p. 85-107.
64. Billes, S.K., P. Sinnayah, and M.A. Cowley, *Naltrexone/bupropion for obesity: an investigational combination pharmacotherapy for weight loss*. Pharmacol Res, 2014. **84**: p. 1-11.
65. Badman, M.K. and J.S. Flier, *The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars*. Science, 2005. **307**(5717): p. 1909-14.
66. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
67. Farr, O.M., A. Gavrieli, and C.S. Mantzoros, *Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity?* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2015. **22**(5): p. 353-9.
68. Fischer, A.W., et al., *Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis*. Cell Rep, 2016. **14**(7): p. 1621-1631.
69. Wang, M.Y., et al., *Leptin therapy in insulin-deficient type I diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(11): p. 4813-9.
70. Paz-Filho, G., et al., *Congenital leptin deficiency: diagnosis and effects of leptin replacement therapy*. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2010. **54**(8): p. 690-7.
71. Gruzdeva, O., et al., *Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2019. **12**: p. 191-198.
72. Dalamaga, M., et al., *Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives*. Cell Metab, 2013. **18**(1): p. 29-42.
73. Chan, J.L., et al., *The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men*. J Clin Invest, 2003. **111**(9): p. 1409-21.
74. Di Spiezo, A., et al., *The LepR-mediated leptin transport across brain barriers controls food reward*. Mol Metab, 2018. **8**: p. 13-22.

75. Cowley, M.A., et al., *Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus*. Nature, 2001. **411**(6836): p. 480-4.
76. Park, H.K. and R.S. Ahima, *Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism*. Metabolism, 2015. **64**(1): p. 24-34.
77. Cota, D., J.G. Barrera, and R.J. Seeley, *Leptin in energy balance and reward: two faces of the same coin?* Neuron, 2006. **51**(6): p. 678-80.
78. Belgardt, B.F. and J.C. Bruning, *CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1212**: p. 97-113.
79. Wren, A.M., et al., *Ghrelin causes hyperphagia and obesity in rats*. Diabetes, 2001. **50**(11): p. 2540-7.
80. Delporte, C., *Structure and physiological actions of ghrelin*. Scientifica (Cairo), 2013. **2013**: p. 518909.
81. Nakazato, M., et al., *A role for ghrelin in the central regulation of feeding*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 194-8.
82. Willesen, M.G., P. Kristensen, and J. Romer, *Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat*. Neuroendocrinology, 1999. **70**(5): p. 306-16.
83. 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.
84. Yanagi, S., et al., *The Homeostatic Force of Ghrelin*. Cell Metab, 2018. **27**(4): p. 786-804.
85. Gnanapavan, S., et al., *The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(6): p. 2988.
86. Fladung, A.K., et al., *A neural signature of anorexia nervosa in the ventral striatal reward system*. Am J Psychiatry, 2010. **167**(2): p. 206-12.
87. Miller, J.L., et al., *Enhanced activation of reward mediating prefrontal regions in response to food stimuli in Prader-Willi syndrome*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2007. **78**(6): p. 615-9.
88. Thompson, N.M., et al., *Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor*. Endocrinology, 2004. **145**(1): p. 234-42.
89. Kelesidis, T., et al., *Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications*. Ann Intern Med, 2010. **152**(2): p. 93-100.
90. Karra, E. and R.L. Batterham, *The role of gut hormones in the regulation of body weight and energy homeostasis*. Mol Cell Endocrinol, 2010. **316**(2): p. 120-8.
91. Camilleri, M., *Peripheral mechanisms in appetite regulation*. Gastroenterology, 2015. **148**(6): p. 1219-33.
92. Levin, B.E., et al., *Metabolic sensing and the brain: who, what, where, and how?* Endocrinology, 2011. **152**(7): p. 2552-7.
93. Blundell, J., et al., *Appetite control: methodological aspects of the evaluation of foods*. Obes Rev, 2010. **11**(3): p. 251-70.
94. Zhang, Y., et al., *Gut hormones and the brain*. J Diabetes, 2010. **2**(3): p. 138-45.
95. Gibbs, J., R.C. Young, and G.P. Smith, *Cholecystokinin decreases food intake in rats*. 1973. Obes Res, 1997. **5**(3): p. 284-90.
96. Little, T.J., M. Horowitz, and C. Feinle-Bisset, *Role of cholecystokinin in appetite control and body weight regulation*. Obes Rev, 2005. **6**(4): p. 297-306.
97. Dockray, C.J., *Polypeptides in brain and gut: cholecystokinin-like peptides*. Adv Exp Med Biol, 1978. **106**: p. 263-7.
98. Ranganath, L.R., *Incretins: pathophysiological and therapeutic implications of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagon-like peptide-1*. J Clin Pathol, 2008. **61**(4): p. 401-9.
99. Card, J.P., et al., *GLP-1 neurons form a local synaptic circuit within the rodent nucleus of the solitary tract*. J Comp Neurol, 2018. **526**(14): p. 2149-2164.
100. Timper, K. and J.C. Bruning, *Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity*. Dis Model Mech, 2017. **10**(6): p. 679-689.

101. de Heer, J., et al., *Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, inhibits glucagon secretion via somatostatin (receptor subtype 2) in the perfused rat pancreas*. Diabetologia, 2008. **51**(12): p. 2263-70.
102. Adrian, T.E., et al., *Human distribution and release of a putative new gut hormone, peptide YY*. Gastroenterology, 1985. **89**(5): p. 1070-7.
103. De Silva, A. and S.R. Bloom, *Gut Hormones and Appetite Control: A Focus on PYY and GLP-1 as Therapeutic Targets in Obesity*. Gut Liver, 2012. **6**(1): p. 10-20.
104. Zhang, W., et al., *Peptide YY induces enterocyte proliferation in a rat model with total enteral nutrition after distal bowel resection*. Pediatr Surg Int, 2008. **24**(8): p. 913-9.
105. Muller, M.J., J. Enderle, and A. Bosy-Westphal, *Changes in Energy Expenditure with Weight Gain and Weight Loss in Humans*. Curr Obes Rep, 2016. **5**(4): p. 413-423.
106. Cypess, A.M., et al., *Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans*. N Engl J Med, 2009. **360**(15): p. 1509-17.
107. Enerback, S., *Brown adipose tissue in humans*. Int J Obes (Lond), 2010. **34 Suppl 1**: p. S43-6.
108. Saito, M., *Brown adipose tissue as a regulator of energy expenditure and body fat in humans*. Diabetes Metab J, 2013. **37**(1): p. 22-9.
109. Ricquier, D. and F. Bouillaud, *The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP*. Biochem J, 2000. **345 Pt 2**: p. 161-79.
110. Richard, D. and F. Picard, *Brown fat biology and thermogenesis*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 1233-60.
111. Labbe, S.M., et al., *Hypothalamic control of brown adipose tissue thermogenesis*. Front Syst Neurosci, 2015. **9**: p. 150.
112. Morrison, S.F., C.J. Madden, and D. Tupone, *Central control of brown adipose tissue thermogenesis*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**(5).
113. Sethi, J., M. Sanchez-Alavez, and I.V. Tabarean, *Loss of histaminergic modulation of thermoregulation and energy homeostasis in obese mice*. Neuroscience, 2012. **217**: p. 84-95.
114. Morrison, S.F., C.J. Madden, and D. Tupone, *Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure*. Cell Metab, 2014. **19**(5): p. 741-756.
115. 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.
116. Almundarij, T.I., et al., *Physical Activity, Energy Expenditure, and Defense of Body Weight in Melanocortin 4 Receptor-Deficient Male Rats*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 37435.
117. Song, C.K., et al., *Melanocortin-4 receptor mRNA expressed in sympathetic outflow neurons to brown adipose tissue: neuroanatomical and functional evidence*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **295**(2): p. R417-28.
118. Rezai-Zadeh, K. and H. Munzberg, *Integration of sensory information via central thermoregulatory leptin targets*. Physiol Behav, 2013. **121**: p. 49-55.
119. Griffin, C.E., 3rd, et al., *Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects*. Ochsner J, 2013. **13**(2): p. 214-23.
120. Kaufmann, W.A., et al., *Compartmentation of alpha 1 and alpha 2 GABA(A) receptor subunits within rat extended amygdala: implications for benzodiazepine action*. Brain Res, 2003. **964**(1): p. 91-9.
121. Farzampour, Z., R.J. Reimer, and J. Huguenard, *Endozepines*. Adv Pharmacol, 2015. **72**: p. 147-64.
122. Costa, E. and A. Guidotti, *Endogenous ligands for benzodiazepine recognition sites*. Biochem Pharmacol, 1985. **34**(19): p. 3399-403.
123. Haefely, W., et al., *Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines*. Adv Biochem Psychopharmacol, 1975(14): p. 131-51.
124. Succol, F., et al., *Intracellular chloride concentration influences the GABAA receptor subunit composition*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 738.
125. Seeburg, P.H., et al., *The GABAA receptor family: molecular and functional diversity*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1990. **55**: p. 29-40.

126. Guidotti, A., et al., *Isolation, characterization, and purification to homogeneity of an endogenous polypeptide with agonistic action on benzodiazepine receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(11): p. 3531-5.
127. Lohrmann, I., et al., *Frog diazepam-binding inhibitor: peptide sequence, cDNA cloning, and expression in the brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 6899-903.
128. Alho, H., et al., *Immunohistochemistry of diazepam binding inhibitor (DBI) in the central nervous system and peripheral organs: its possible role as an endogenous regulator of different types of benzodiazepine receptors*. Neuropharmacology, 1991. **30**(12B): p. 1381-6.
129. Yanase, H., et al., *Cellular localization of the diazepam binding inhibitor in glial cells with special reference to its coexistence with brain-type fatty acid binding protein*. Arch Histol Cytol, 2002. **65**(1): p. 27-36.
130. Knudsen, J., *Acyl-CoA-binding and transport, an alternative function for diazepam binding inhibitor (DBI), which is identical with acyl-CoA-binding protein*. Neuropharmacology, 1991. **30**(12B): p. 1405-10.
131. Ferrarese, C., et al., *Subcellular location and neuronal release of diazepam binding inhibitor*. J Neurochem, 1987. **48**(4): p. 1093-102.
132. Loomis, W.F., et al., *Pregnenolone sulfate and cortisol induce secretion of acyl-CoA-binding protein and its conversion into endozepines from astrocytes*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21359-65.
133. Masmoudi, O., et al., *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates endozepine release from cultured rat astrocytes via a PKA-dependent mechanism*. FASEB J, 2003. **17**(1): p. 17-27.
134. Ferrero, P., et al., *A diazepam binding inhibitor (DBI)-like neuropeptide is detected in human brain*. Brain Res, 1986. **399**(1): p. 136-42.
135. Slobodyansky, E., et al., *The endogenous allosteric modulation of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: a role for the neuronal posttranslational processing products of rat brain DBI*. Adv Biochem Psychopharmacol, 1990. **46**: p. 51-60.
136. Verma, A. and S.H. Snyder, *Peripheral type benzodiazepine receptors*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1989. **29**: p. 307-22.
137. Hamdi, Y., et al., *The stimulatory effect of the octadecapeptide ODN on astrogliant antioxidant enzyme systems is mediated through a GPCR*. Front Endocrinol (Lausanne), 2012. **3**: p. 138.
138. Lamacz, M., et al., *The endogenous benzodiazepine receptor ligand ODN increases cytosolic calcium in cultured rat astrocytes*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. **37**(1-2): p. 290-6.
139. Tonon, M.C., et al., *Endozepines and their receptors: Structure, functions and pathophysiological significance*. Pharmacol Ther, 2019: p. 107386.
140. do Rego, J.C., et al., *Pharmacological characterization of the receptor mediating the anorexigenic action of the octadecapeptide: evidence for an endozepinergic tone regulating food intake*. Neuropsychopharmacology, 2007. **32**(7): p. 1641-8.
141. Patte, C., et al., *The endozepine ODN stimulates polyphosphoinositide metabolism in rat astrocytes*. FEBS Lett, 1995. **362**(2): p. 106-10.
142. Lanfray, D., et al., *Gliotransmission and brain glucose sensing: critical role of endozepines*. Diabetes, 2013. **62**(3): p. 801-10.
143. Bouyakdan, K., et al., *A novel role for central ACBP/DBI as a regulator of long-chain fatty acid metabolism in astrocytes*. J Neurochem, 2015. **133**(2): p. 253-65.
144. de Mateos-Verchere, J.G., et al., *The octadecapeptide [diazepam-binding inhibitor (33-50)] exerts potent anorexigenic effects in rodents*. Eur J Pharmacol, 2001. **414**(2-3): p. 225-31.
145. Compere, V., et al., *Acute food deprivation reduces expression of diazepam-binding inhibitor, the precursor of the anorexigenic octadecapeptide ODN, in mouse glial cells*. J Mol Endocrinol, 2010. **44**(5): p. 295-9.
146. Bouyakdan, K., et al., *The gliotransmitter ACBP controls feeding and energy homeostasis via the melanocortin system*. J Clin Invest, 2019. **129**(6): p. 2417-2430.

147. Guillebaud, F., et al., *Glial Endozepines Inhibit Feeding-Related Autonomic Functions by Acting at the Brainstem Level*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 308.
148. Leprince, J., et al., *Synthesis, conformational analysis and biological activity of cyclic analogs of the octadecaneuropeptide ODN. Design of a potent endozepine antagonist*. Eur J Biochem, 2001. **268**(23): p. 6045-57.
149. Fan, J., et al., *Acyl-coenzyme A binding domain containing 3 (ACBD3; PAP7; GCP60): an emerging signaling molecule*. Prog Lipid Res, 2010. **49**(3): p. 218-34.
150. Lanfray, D. and D. Richard, *Emerging Signaling Pathway in Arcuate Feeding-Related Neurons: Role of the Acbd7*. Front Neurosci, 2017. **11**: p. 328.
151. Lanfray, D., et al., *Involvement of the Acyl-CoA binding domain containing 7 in the control of food intake and energy expenditure in mice*. Elife, 2016. **5**.
152. Allison, M.B., et al., *TRAP-seq defines markers for novel populations of hypothalamic and brainstem LepR<sup>b</sup> neurons*. Mol Metab, 2015. **4**(4): p. 299-309.
153. Wolfe, B.M., E. Kvach, and R.H. Eckel, *Treatment of Obesity: Weight Loss and Bariatric Surgery*. Circ Res, 2016. **118**(11): p. 1844-55.
154. Baraboi, E.D., et al., *Brain activation following peripheral administration of the GLP-1 receptor agonist exendin-4*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **301**(4): p. R1011-24.
155. Garcia, J., D.J. Kimeldorf, and R.A. Koelling, *Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation*. Science, 1955. **122**(3160): p. 157-8.
156. Dragunow, M., et al., *Induction of c-fos mRNA and protein in neurons and glia after traumatic brain injury: pharmacological characterization*. Exp Neurol, 1990. **107**(3): p. 236-48.
157. Spencer, C.M., et al., *Area postrema lesions attenuate LiCl-induced c-Fos expression correlated with conditioned taste aversion learning*. Physiol Behav, 2012. **105**(2): p. 151-60.
158. Swank, M.W., *Coordinate regulation of Fos and Jun proteins in mouse brain by LiCl*. Neuroreport, 1999. **10**(17): p. 3685-9.
159. Yamamoto, T., et al., *C-fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of lithium chloride*. Neuroreport, 1992. **3**(12): p. 1049-52.
160. Yamamoto, T., *Brain regions responsible for the expression of conditioned taste aversion in rats*. Chem Senses, 2007. **32**(1): p. 105-9.
161. Yamamoto, T. and K. Ueji, *Brain mechanisms of flavor learning*. Front Syst Neurosci, 2011. **5**: p. 76.
162. Bolze, F. and M. Klingenspor, *Mouse models for the central melanocortin system*. Genes Nutr, 2009. **4**(2): p. 129-34.
163. Yu, S., et al., *The Hypothalamic Preoptic Area and Body Weight Control*. Neuroendocrinology, 2018. **106**(2): p. 187-194.
164. Grill, H.J. and J.M. Kaplan, *The neuroanatomical axis for control of energy balance*. Front Neuroendocrinol, 2002. **23**(1): p. 2-40.
165. Fan, W., et al., *Thermogenesis activated by central melanocortin signaling is dependent on neurons in the rostral raphe pallidus (rRPa) area*. Brain Res, 2007. **1179**: p. 61-9.
166. Bormann, J., *Electrophysiological characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) on GABA<sub>A</sub> receptors*. Neuropharmacology, 1991. **30**(12B): p. 1387-9.
167. Matsuda, K., et al., *The octadecaneuropeptide exerts an anxiogenic-like action in goldfish*. Neuroscience, 2011. **181**: p. 100-8.
168. Knudsen, J., et al., *The function of acyl-CoA-binding protein (ACBP)/diazepam binding inhibitor (DBI)*. Mol Cell Biochem, 1993. **123**(1-2): p. 129-38.
169. Neess, D., et al., *Long-chain acyl-CoA esters in metabolism and signaling: Role of acyl-CoA binding proteins*. Prog Lipid Res, 2015. **59**: p. 1-25.
170. Tong, Y., D. Toranzo, and G. Pelletier, *Localization of diazepam-binding inhibitor (DBI) mRNA in the rat brain by high resolution *in situ* hybridization*. Peptides, 1991. **20**(1): p. 33-40.
171. Ebling, F.J.P. and J.E. Lewis, *Tanycytes and hypothalamic control of energy metabolism*. Glia, 2018. **66**(6): p. 1176-1184.